

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ –
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ БИОФИЗИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ А.И. БУРНАЗЯНА»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНСТВА

На правах рукописи

БРУНЧУКОВ ВИТАЛИЙ АНДРЕЕВИЧ

Экспериментальное применение клеточных технологий
при радиационных ожогах

1.5.1. Радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
руководитель центра биомедицинских и
аддитивных технологий,
доктор медицинских наук, профессор
Астрелина Татьяна Алексеевна

Москва – 2024

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Воздействие радиации на живые ткани	12
1.2 Местные лучевые поражения.....	14
1.2.1 Лечение местных лучевых поражений	16
1.3 История открытия мезенхимальных стромальных клеток	18
1.3.1 Классификация столовых клеток.....	19
1.3.2 Миграция в зону поражения	22
1.3.3 Применение МСК в медицине	23
1.3.4 Мезенхимальные стромальные клетки в терапии МЛП	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	51
2.1 Описание использованных лабораторных животных	51
2.2 Введение в наркоз и эвтаназия животных	53
2.3 Выделение и культивирование МСК слизистой десны крысы	53
2.4 Культивирование МСК плаценты и слизистой десны человека.....	54
2.5 Оценка иммунологических характеристик МСК.....	54
2.6 Определение жизнеспособности МСК	55
2.7 Получение концентрата культуральной и кондиционированных сред	55
2.8 Облучение животных.....	56
2.9 Введение МСК, кондиционированных сред и культуральной среды лабораторным животным	57

2.10 Оценка повреждения кожи и ее придатков	58
2.11 Гистологическое исследование.....	58
2.12 Иммуногистохимическое исследование	58
2.13 Статистический анализ	59

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ РАДИАЦИОННЫХ ОЖОГАХ.....	60
--	----

3.1 Изучение влияние МСК и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред на регенерацию кожного покрова при МЛП у лабораторных животных	60
--	----

3.2 Исследование гистологических особенностей регенерации кожного покрова при МЛП.....	76
---	----

3.3 Исследование иммуногистохимических особенностей регенерации кожного покрова при МЛП.....	93
---	----

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
--	----

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
------------------	-----

ВЫВОДЫ	105
--------------	-----

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	107
---	-----

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109
------------------------	-----

Приложение Акт внедрения	135
--------------------------------	-----

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Заживление язвенной поверхности кожи с сохранением ее анатомической целостности и функциональной активности при местном лучевом поражении (МЛП) остается серьезной проблемой в науке и клинике [1]. Несмотря на достижения в понимании механизма патогенеза МЛП, не всегда удается достигнуть полноценного излечения при использовании стандартных методов лечения [2].

МЛП характеризуются частым рецидивирующим ходом течения заболевания, что снижает качество жизни пациента [3], требуют постоянного ухода за очагом поражения и негативно сказываются на трудоспособности пациента [4].

Повреждения базальных стромальных клеток эпидермиса и сосудов микроциркуляторного русла обуславливают степень повреждения кожи при МЛП. Исход течения заболевания будет зависеть от соотношения повреждений и репаративных процессов в данных структурах [5]. Регенеративная медицина является перспективным направлением современной медицины, способным улучшить качество жизни пациента, увеличить продолжительность его жизни, восстановить поврежденные функции и структуры его органов и тканей. В регенеративной медицине существует несколько направлений, способствующих восстановлению органов и дефектов тканей: стимуляция регенерации тканей различными веществами, использование органов и тканей для трансплантации, трансплантация клеток [6].

В качестве терапевтического источника для МЛП возможно применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК) [1, 7-9]. МСК способны самообновляться и могут дифференцироваться в различные виды тканей [10]. Доказана эффективность МСК в заживлении раневой поверхности кожи и ее придатков [11], сердца [12], скелетных мышц и хряща [13, 14] и др. Применение МСК приводит к усилению процессов ангиогенеза, эпителизации, уменьшению

процессов фиброзирования, улучшению грануляций, сокращению сроков заживления ран, восстановлению волосяного покрова. При этом основной терапевтический эффект МСК связан с действием их паракринного профиля, регулирующего межклеточные взаимодействия [1, 15-19].

Однако на сегодняшний день данные по применению МСК из различных источников и их паракринных факторов для терапии МЛП противоречивы, что делает настоящее исследование актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Степень разработанности темы исследования вследствие отсутствия единого научно обоснованного подхода к эффективному лечению МЛП с применением клеточной терапии для заживления и сохранения анатомической целостности и функциональной активности кожных покровов, что является серьезной проблемой в науке и клинике. МЛП характеризуются длительным периодом заживления, сохраняя непрерывный воспалительный процесс, что приводит к деградации факторов, участвующих в заживлении раны. Например, активно изучается эффективность комбинированного подхода лечения МЛП в сочетании с применением клеточной терапии, включающей использование мезенхимальных стромальных клеток (МСК), их клеточных продуктов, минимально-манипулированных клеточных продуктов и др (Huang Y.Z., 2020; Yamanaka S., 2020; Su X, 2020 и др.).

Одним из важных вопросов вследствие отсутствия данных применения МСК слизистой десны человека, плаценты и их паракринных факторов для терапии МЛП делает важным внедрение понимания механизмов регенерации кожного покрова при местных лучевых поражениях и применение МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты для лечения местных лучевых поражений.

Цель исследования

Целью настоящего исследования являлось изучение эффективности применения МСК плаценты человека, слизистой десны человека и их паракринных факторов в составе концентратов кондиционированных сред при местных лучевых поражениях кожи у лабораторных животных.

Задачи

1. Изучить влияние МСК плаценты человека, слизистой десны человека и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред на регенерацию кожного покрова при МЛП у лабораторных животных.

2. Исследовать морфологические и иммуногистохимические особенности регенерации кожного покрова при МЛП у лабораторных животных после применения МСК плаценты человека, слизистой десны человека и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред

3. Изучить влияние МСК слизистой десны крысы и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред, на регенерацию кожного покрова при МЛП у лабораторных животных

4. Исследовать морфологические и иммуногистохимические особенности регенерации кожного покрова при МЛП у лабораторных животных после применения МСК слизистой десны крысы и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред.

5. Сравнить эффективность применения МСК плаценты человека, слизистая десны человека, слизистая десны крысы и их паракринных факторов в терапии кожного покрова при МЛП у лабораторных животных.

Научная новизна

1. Впервые показано, что применение МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека с 14 по 112 сутки после облучения приводит к сокращению язвенной поверхности местных

лучевых поражений у лабораторных животных к концу эксперимента на 87%, 85,7% и 95,4% соответственно.

2. Применение МСК слизистой десны человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 по 112 сутки после облучения приводит к улучшению васкуляризации (увеличение экспрессии VEGF) и увеличению числа нервных волокон (увеличение PGP 9.5).

3. Впервые показано, что применение МСК слизистой десны крысы и концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны крысы с 14 суток по 112 сутки после облучения не приводит к существенному сокращению местных лучевых поражений и способствует увеличению макрофагальной инфильтрации у лабораторных животных (увеличение маркера CD 68).

4. Установлено, что применение МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека, а также концентрата культуральной среды показало наибольшую эффективность – полное заживление язвенно поверхности на 112 сутки после облучения в 60% и 40% случаев, соответственно. Применение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, МСК плаценты человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой крысы приводит к полному заживлению в 20% случаев; применение МСК слизистой десны крысы и отсутствие терапии (в группе контроль) не приводит к полному заживлению.

5. Впервые показано, что применение МСК слизистой десны человека, слизистой десны крысы, плацента человека при местных лучевых поражениях с 21 по 112 сутки после облучения приводит к усилению процессов неоангиогенеза (увеличение экспрессии CD31). Применение МСК слизистой десны человека и МСК слизистой десны крысы приводит к усилению процессов ангиогенеза (увеличение VEGF в эндотелии и строме).

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты исследований применения мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны и концентрата кондиционированной среды

мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны в зависимости от донора биоматериала (человек и крыса) противоположно различаются, которые можно использовать для дальнейшего изучения влияния и оценки методов лечения на процессы регенерации и заживления местных лучевых поражений. Результаты проведенных исследований демонстрируют сокращение язвенной поверхности (от 85 до 95%) местных лучевых поражений у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения при применении мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека. Полученные результаты имеют важное теоретическое значение для радиобиологии, комбустологии, хирургии, регенеративной медицины и клеточной терапии, так как вносят существенный вклад в понимание механизмов регенерации кожного покрова при местных лучевых поражениях.

Полученные результаты исследований позволяют рекомендовать для применения мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток плаценты для эффективного лечения местных лучевых поражений.

Методология и методы исследования

На протяжении всего исследования проводились методы выделения и культивирования мезенхимальных стромальных клеток из различных источников; методы концентрирования паракринных факторов из кондиционированных сред от мезенхимальных стромальных клеток из различных источников; моделирование местных лучевых поражений у лабораторных животных на рентгеновской установке; планиметрические, иммунологические и иммуногистохимические методы для оценки регенерации кожных покровов после облучения; оценка мезенхимальных стромальных клеток из различных источников с помощью проточной цитофлуориметрии; наблюдение за лабораторными животными.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft), Statistica 6 (StatSoft), ImageTool (UTHSCSF). Значимость статистических различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Исследование проведено на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна».

Положения, выносимые на защиту

1. Применение мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани человека, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека являются эффективными методами лечения местных лучевых поражений, приводящие к сокращению язвенной поверхности и обеспечивающие наибольшую эффективность полного заживления местных лучевых поражений у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения.

2. Применение мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения обеспечивает улучшение васкуляризации, увеличение экспрессии VEGF, и увеличению числа нервных волокон (увеличение экспрессии PGP 9.5).

3. Отсутствие эффективности (волнообразное сокращение и отсутствие заживления) применения мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны крысы и концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны крысы при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения сопровождается с увеличением воспалительного процесса за счет увеличения маркера клеток макрофагального ряда CD68 в тканях.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Результаты диссертационной работы Брунчукова В.А. «Экспериментальное применение клеточных технологий при радиационных ожогах» соответствуют паспорту специальности 1.5.1 – Радиобиология, в частности к пунктам 1. «Взаимодействие различных видов ионизирующих излучений с веществом. Прямое и косвенное действие ионизирующих излучений на биологические объекты. Медикобиологические последствия действия радиации и разработка методов их минимизации. Стохастические и не стохастические эффекты; зависимости: дозаэффект и время-эффект»; п. 3 «Физико-химические и молекулярные механизмы первичных и начальных процессов лучевых нарушений, протекающих с момента возникновения ионизированных и возбужденных атомов и молекул до появления структурных и функциональных изменений в организме. Физические и биологические основы действия ионизирующего излучения. Острое и хроническое действие радиации», п. 5 «Молекулярная радиобиология. Механизмы действия ионизирующих излучений на ДНК, РНК, белки и клеточные мембраны; молекулярные механизмы репарации лучевых повреждений; механизмы радиационного гормезиса».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечивается четкой постановкой задач, достаточным объемом исследования, применением современных лабораторных методов исследования, корректной статистической обработкой данных и всесторонней оценкой полученных результатов в сравнении с данными научной литературы.

Апробация диссертационной работы проведена 22.06.2022 г. на заседании секции № 2 Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Публикации

По материалам работы опубликовано 12 печатных работ, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 5 статей – в изданиях, включенных в международные базы цитирования, и 1 патент.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, содержащих литературный обзор, описание используемых материалов и методов исследования, главы результатов исследований экспериментального обоснования применения клеточных технологий при радиационных ожогах, главы обсуждения результатов и заключение, выводов, списка используемой литературы, акта внедрения. Указатель литературы содержит 21 отечественных и 214 зарубежных источников. Диссертационная работа иллюстрирована 14 таблицами и 28 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Воздействие радиации на живые ткани

В 1896 г. российский ученый И.Р. Тарханов проводил эксперименты по изучению воздействия рентгеновских лучей на живые объекты, в ходе которых он выявил нарушение физиологических процессов в организме земноводных [20]. В этом же году появились первые данные о возникновении дерматитов после воздействия X-лучей на кожные покровы в процессе рентгенодиагностики. П. Кюри [21] провел эксперимент, в ходе которого в течение 10 ч испытывал на себе воздействие радия. В результате у него сформировалась язва в области предплечья, которая не заживала в течение двух месяцев. К 1902 г. было зарегистрировано около 172 поражений кожи при воздействии на нее ионизирующего излучения [22].

В XX веке широко распространилось использование радиоактивных веществ в науке, медицине и промышленности [23]. После бомбардировки Хиросимы и Нагасаки, техногенной Кыштымской катастрофы и аварии на Чернобыльской АЭС стали активно изучать процессы патогенеза и особенности течения лучевой болезни [24]. Это послужило дальнейшему развитию исследований в науке, медицине, военной промышленности, геологии, космических исследований в области противорадиационной защиты, лучевой терапии, радиофармацевтической и медицинской промышленности, радиоэкологии и других сфер науки.

В настоящее время после действия ионизирующего излучения разделяют следующие этапы течения биологического ответа [25]:

1. Ионизация, возбуждение и диссоциация молекул – физический процесс;
2. Распределение поглощенной энергии внутри и между молекул, разрыв слабых химических связей, образование неспаренных электронов – физико-химический процесс;

3. Реакции между свободными радикалами, образование большого числа молекул с нарушением структуры и функциональных свойств – химический процесс;

4. Развитие повреждений на всех уровнях биологической организации: от проявления биомолекулярных повреждений (микросекунды – часы) до проявления отдаленных биологических последствий (годы) – биологический процесс [24].

Первые три этапа относят к первичным радиационным изменениям молекул. Механизм развития первичных реакций объясняют либо теорией прямого действия ионизирующего излучения, когда повреждение молекулы наступает в результате непосредственного поглощения энергии, или теорией косвенного воздействия, когда повреждения происходят за счет поглощения энергии от других молекул или в результате взаимодействия с продуктами радиационного разложения окружающей воды и др. [26].

В процессе изучения основных механизмов радиационного поражения клеток предложено несколько гипотез («принцип попаданий» или «принцип мишеней», гипотеза «выхода ферментов», гипотеза «цепных реакций с разветвляющимися цепями», «эффект свидетеля» и др.), однако, наиболее аргументированной считают структурно-метаболическую гипотезу о радиационно-химических реакциях, которые нарушают состав макромолекул и надмолекулярных структур, приводящие к нарушению механизмов репликации ДНК и транскрипции РНК, процессов клеточного обмена и системы внутриклеточной репарации и повторном воздействии образовавшихся токсических веществ [27].

После облучения в клетке в зависимости от дозы происходит изменение вязкости цитоплазмы, ее вакуолизация, повышение коэффициента лучевого преломления, изменение степени окрашивания; нарушение ядерных структур; происходит смена реакции на изменение рН среды; повышение проницаемости клеточной мембраны для воды и электролитов [26]. Происходящие процессы в клетке могут привести к летальному исходу (репродуктивная и интерфазная

клеточная гибель) или к нелетальному исходу (клетка восстанавливается после повреждения за счет собственного репаративного потенциала или за счет стимуляции репаративных процессов при терапии).

Клетки организма различных типов и в пределах одной ткани имеют разную чувствительность к радиации. В 1906 г. учеными И. Бергонье и Л. Трибондо был сформулирован основной закон радиочувствительности тканей: «радиочувствительность тканей прямо пропорциональна пролиферативной активности клеток и обратно пропорциональна степени их дифференцировки». Критерием чувствительности к радиации считается зависимость гибели клеток от величины поглощенной дозы: чем ниже поглощенная доза, вызывающая гибель клеток, тем выше радиочувствительность. Наиболее радиочувствительными структурами организма при внешнем облучении являются лимфатическая ткань, костный мозг, тимус, селезенка, половые железы, желудочно-кишечный тракт. Кожа и органы зрения относятся к среднерadiочувствительным; а сердце, легкие, почки, печень, кости, центральная нервная система, мышцы — к низкорadiочувствительным структурами организма.

1.2 Местные лучевые поражения

В результате радиационных аварий, ошибок в проведении научных исследований, диагностических и терапевтических процедур в медицине, включающих использование источников ионизирующего излучения, при неправильном хранении, транспортировании или утилизации радиоактивных веществ, могут возникнуть местные лучевые поражения (МЛП/ местные лучевые реакции/местные радиационно-индуцированные поражения) [28]. МЛП являются специфическим радиационным поражением кожи, других подлежащих тканей и структур, включая внутренние органы, находящихся в проекции действия на тело пучка глубоко проникающего ионизирующего излучения [2]. Изменение кожи включает гипо- и гиперпигментацию кожи, атрофию кожи, гиперкератоз, потерю придатков кожи, волосяных фолликулов, сальных и потовых желез и пр. [29]. В 85-95% случаев [4, 30-33] у пациентов с онкологическими заболеваниями,

получавших лучевую терапию, развивается МЛП. При МЛП происходит повреждение фибробластов и стромальных клеток в базальных слоях эпидермиса дермы: клетки либо разрушаются от количества поглощенной энергии, либо индуцируется блокировка митоза, в результате чего нарушаются процессы клеточного обновления и не происходит замещение утраченных клеток в верхних слоях эпидермиса. С другой стороны происходит функциональное нарушение сосудов микроциркуляторного русла, выраженное стазом сосудов и ангиоспазмом. Повышенное давление в капиллярах приводит к нарушению процессов микроциркуляции и вызывает развитие гипоксии и усиление склеротических процессов в результате перехода части крови из артериального звена в венозное [34]. В результате недостаточности питания дермы развивается атрофия вышележащего эпидермиса, развитие воспалительной реакции, запускаются процессы фиброзирования тканей, изъязвление и некроз [35].

Выделяют 4 степени развития МЛП по клиническим признакам:

1. Легкая степень – характеризуется наличием слабовыраженной первичной эритемы. Вторичная эритема сопровождается локальной гипертермией, сухостью и шелушением, отеком кожи.
2. Средняя степень – сформировавшаяся вторичная эритема с признаками экссудативной реакции, отеком ткани с наличием сливающихся друг с другом пузырей, заполненных серозной жидкостью. Сопровождается зудом, болевым синдромом.
3. Тяжелая степень – увеличение отека до подкожной клетчатки с образованием эрозий и длительно незаживающими и рецидивирующими язвами и выраженным болевым синдромом.
4. Крайне тяжелая степень - характеризуется первичной эритемой в разгар заболевания с отеком кожи, кровоизлияниями, сепсисом, некрозом и увеличением глубины ожога до костной ткани.

1.2.1 Лечение местных лучевых поражений

На сегодняшний день заживление ран кожи с сохранением их анатомической целостности и функциональной активности при МЛП остается серьезной проблемой в науке и клинике. В клинической практике не существует стандартизированных терапевтических протоколов и научно обоснованных подходов в лечении МЛП [2]. Стратегия ухода за МЛП направлена на регуляцию воспалительной реакции, ускоренную реэпителизацию и улучшение общего заживления раны [36]. Обычно терапия МЛП включает в себя комбинированный подход, сочетающий консервативную и хирургическую тактику лечения пациентов для полноценного восстановления пораженных участков [2]. Консервативное лечение, как правило, помогает добиться восстановления поверхностного повреждения, уменьшить обезболивание и воспаление, снизить инфекционную нагрузку и минимизировать фиброз [37]. Из-за поздних эффектов, вызванных ионизирующим излучением, васкуляризация изъязвленных участков обычно очень слабая и не поддается консервативному лечению, так как не позволяет достичь удовлетворительных результатов [38], поэтому в таких случаях оправдано применение хирургических методов лечения и пластическое ремоделирование анатомических структур [39]. Хирургические методы включают в себя иссечение некротической ткани или язв с последующей пересадкой собственной расщепленной, донорской или искусственной кожи [40, 41]. При поглощении большой дозы велик риск рецидивирования лучевых ожогов, что говорит о необходимости дальнейшего поиска эффективных методов лечения (Таблица 1) [1].

Хронические раны характеризуются длительным периодом заживления, сохраняя непрерывный воспалительный процесс с повышенным количеством нейтрофилов, что приводит к деградации факторов, участвующих в заживлении раны [42-44]. В последние годы активно изучается эффективность комбинированного подхода лечения МЛП в сочетании с применением клеточной терапии, включающей использование мезенхимальных стромальных клеток

(МСК), их клеточных продуктов, минимально-манипулированных клеточных продуктов и др.

Таблица 1 – Методы лечения МЛП [2, 37]

Подход	Варианты лечения
Консервативное лечение	
Обезболивание	Системные анальгетики, местное охлаждение
Уменьшение воспаления	Кортикостероиды, пантенол, антигистаминовые препараты
Очистка раны, предотвращение заражения	Ежедневные повязки, дезинфицирующие растворы
Улучшение микроциркуляции	Пентоксифиллин, гипербарическая оксигенотерапия
Ускорение заживления	Тетрахлордекаоксид
Лечение кератоза	Ретинноиды
Лечение язв	Ежедневные повязки, вымоченные в растворах антисептиков, антибиотиков при вторичных инфекциях
Уменьшение фиброза	Пентоксифиллин, α -токоферол, интерферон- γ , супероксиддисмутаза
Хирургическое лечение	
Реконструктивная и пластическая хирургия	Иссечение, пересадка кожи на всю толщину, пересадка расщепленной кожи, донорской кожи, искусственной кожи или кожных матриц, кожно-мышечного лоскута или лоскута на ножке
Ампутация	

1.3 История открытия мезенхимальных стромальных клеток

Стволовыми клетками называются неспециализированные клетки организма, которые могут дифференцироваться в различные клетки организма и способны самообновляться [45].

Впервые предположение о возобновлении тканей за счет самовозобновляемого пула стромальных клеток было сформулировано более века назад. Родоначальником становления об изучении стромальных клеток можно считать Максимова Александра Александровича – выдающегося русского ученого, одного из создателей теории кроветворения. А.А. Максимов во многом предопределил направление развития мировой науки в области клеточной биологии [46]. Термин "стволовая клетка" А.А. Максимов предложил еще в 1908 году, чтобы объяснить механизм быстрого самообновления клеток крови. Он выступил с новой теорией кроветворения в Берлине на съезде гематологов, этот год можно считать началом истории развития исследований стромальных клеток. Каждые сутки в крови погибают несколько миллиардов клеток, а им на смену приходят новые популяции эритроцитов, лейкоцитов и лимфоцитов. Максимов предположил, что обновление клеток крови – особая технология, которая отличается от простых клеточных делений. Если бы клетки крови самообновлялись простым клеточным делением, это потребовало бы больших размеров костного мозга [46].

В дальнейшем профессор А.Я. Фриденштейн подтвердил теоретическое предположение коллеги А.А. Максимова и, изучая возможности этих особых клеток, стал разрабатывать сферу их применения. Первые эксперименты по практическому использованию стромальных клеток были начаты еще в начале 1950-х годов. Именно тогда было доказано, что с помощью трансплантации костного мозга (основного источника стромальных клеток) можно спасти животных, получивших смертельную дозу радиоактивного облучения. Понадобилось около 20 лет, чтобы трансплантация костного мозга вошла в арсенал практической медицины. К концу 60-х были получены данные о

возможности применения трансплантации костного мозга при лечении острых лейкозов. В 60-х годах советские ученые Александр Фриденштейн и Иосиф Чертков заложили основы науки о стромальных клетках костного мозга [47-49], доказав, что именно там главным образом и находится своеобразное депо замечательных клеток [50]. Дальнейшее изучение стромальных клеток позволило установить, что часть стромальных клеток мигрирует в крови, есть они и в различных тканях, в частности в кожной и жировой [51, 52].

1.3.1 Классификация стволовых клеток

Существуют различные классификации стволовых клеток, так по способности к дифференцировке выделяют [45]:

- Тотипотентные стволовые клетки – способны делиться и дифференцироваться в различные клетки всего организма. Они имеют наиболее высокий потенциал к дифференцировке и могут формировать как эмбриональные, так и внеэмбриональные структуры. К таким клеткам можно отнести зиготу. Эти клетки способны развиваться в направлении одного из трех зародышевых листков (экто-, мезо-, энтодерма), либо образовывать плаценту.

- Плюрипотентные стволовые клетки – способны дифференцироваться во все клетки зародышевых листков, однако лишены возможности дифференцироваться во внеэмбриональные структуры. Примером таких клеток является эмбриональные стволовые клетки. Также обладающими свойствами плюрипотентных стромальных клеток являются индуцированные стволовые клетки, которые получают с помощью репрограммирования из уже дифференцированных клеток путем эктопической экспрессии некоторых факторов транскрипции (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) [53, 54].

- Мультипотентные стволовые клетки – способны дифференцироваться во все клетки одного зародышевого листка.

- Олигопотентные стволовые клетки – могут дифференцироваться в несколько типов клеток одного зародышевого листка. К такому типу относятся клетки лимфоидного и миелоидного рядов.

- Унипотентные – обладают самым низким потенциалом к дифференцировке, являются клетками-предшественниками, поэтому образуют только один тип клеток, но способны многократно делиться.

Вторая классификация основана на источниках происхождения стромальных клеток:

- Эмбриональные стволовые клетки – получают из внутренней клеточной части бластоцисты, сформированной на 4-7 сутки после оплодотворения. К источникам относят абортивный материал и материал, оставшийся после искусственного оплодотворения. Основная часть стромальных клеток будет считаться плюрипотентной [55-57].

- Фетальные стволовые клетки – получают от абортивного материала 9-12 недели гестации. Являются смесью мульти- и унипотентных стромальных клеток.

- Стволовые клетки пуповинной и плацентарной ткани – получают из пуповинной крови. Являются уникальным источником плюрипотентных клеток для биомедицинской страховки.

- Стволовые клетки взрослого организма (постнатальные) – наиболее изученные и применяемые в трансплантологии клетки, за счет возможности получения практически из любого типа ткани с градацией потентности от мульти- до унипотентных стромальных клеток. Наиболее простыми в выделении и получении большого количества считаются мезенхимальные стволовые клетки [58, 59].

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) изначально были выделены из костного мозга (КМ), но в настоящий момент их можно выделить из других источников: пуповина и пуповинная кровь, жировая ткань, кожа, менструальная кровь, слизистая ткань десны и роговицы глаза, моча и др. [45, 59-71]. Они способны к самообновлению и многолинейной дифференцировке – обладают мультипотентными свойствами и способны дать начало различным типам тканей.

Первоначальные методики выделения МСК из различных тканей не позволяли получить клетки с идентичными характеристиками, поэтому были предложены минимальные критерии для МСК [10, 72]. К этим критериям относят способность МСК прикрепляться к пластику, демонстрировать дифференцировку в трех направлениях (остеогенном, хондрогенном и адипогенном), отсутствие экспрессии гемопоэтических маркеров (CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79, HLA II класса) на своей поверхности, наличие экспрессии мезенхимальных маркеров (CD73, CD90, CD105).

Развивающиеся в остеогенном направлении МСК синтезируют белки, связанные с остеобластическим фенотипом (остеопонин, катепсин К, костный сиалопротеин) и приобретают остеобластную морфологию. Затем происходит отложение внеклеточного матрикса богатого гидрокси-1-эпатита, характерного для развития костной ткани [62, 73]. При дифференцировке в хондрогенном направлении МСК начинают активно продуцировать состоящий из протеогликаны аггрекана и коллагена II и X типов матрикс [74]. Развитие МСК в адипогенном направлении сопровождается экспрессией различных генов, связанных с дифференцировкой в жировую ткань, например, рецептор γ , активируемый пролифератором пероксисом, транспортер глюкозы 4, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, вследствие чего начинают накапливаться липидные вакуоли в цитоплазме МСК [62].

МСК играют стратегическую роль в регенеративной медицине и занимают центральное место в регуляции кроветворения и моделировании иммунного ответа против алло- и аутотрансплантатов благодаря секреции различных паракринных факторов и своим межклеточным взаимодействиям. МСК легче применить в клинических целях, так как их использование не ограничено этическими соображениями, и при их получении не требуется специфических манипуляций *in vitro*, что снижает риск возникновения специфических мутаций, которые могут возникнуть, например, при традиционных методиках для получения индуцированных плюрипотентных стромальных клеток [76-79].

1.3.2 Миграция в зону поражения

На миграцию МСК в зону поражения влияет механическое воздействие и хемокиновые факторы. Так, например, взаимосвязь SDF-1/ CXCR4 играет важную роль в регуляции миграции МСК в зону поражения. Ряд исследователей утверждает, что при повреждении тканей повышается уровень экспрессии SDF-1, влекущий за собой привлечение МСК, несущих на своей поверхности CXCR4 [80, 81]. С повышением концентрации SDF-1 увеличивается количество мигрировавших МСК, однако при прохождении определенного порогового уровня концентрации происходит обратная зависимость [82-84].

Остеопонин также является белком, вырабатываемым в ответ на повреждение различных органов и тканей. Усиление миграции МСК также зависит от концентрации остеопонина [85, 86]. Изучение данного процесса позволило установить, что остеопонин увеличивает экспрессию интегрина-1 β на поверхности МСК и способствует миграции МСК через лигирование в интегрин-1 β [85]. *In vitro* было показано, что применение остеопонина уменьшало количество организованных актиновых цитоскелетов посредством FAK-ERK1/2, что способствовало усилению миграции МСК за счет уменьшения жесткости клеток [87]; посредством FAK-ERK1/2 снижается и экспрессия Lamin A/C, регулирующего жесткость ядра [88].

Факторы роста помимо своего участия в восстановлении тканей за счет регулирования процессов пролиферации, дифференциации и синтеза внеклеточного матрикса играют роль и в миграции клеток. Низкие концентрации bFGF так же приводят к усилению миграции МСК в поврежденные участки, в то время как высокие концентрации приводят к ингибированию данного процесса [89]. VEGF-A способен усилить миграцию и пролиферацию МСК за счет стимуляции рецепторов фактора роста тромбоцитов (PDGFRs) [90]; усиленная экспрессия VEGF приводит к повышению SDF-1, что является стимулирующим эффектом мобилизации и миграции МСК [91]. С повышением экспрессии IGF-1 увеличивается привлечение и выживаемость МСК в зону поражения [92]. Было

доказано, что IGF-1 приводит к повышению экспрессии рецептора CXCR4 на поверхности МСК, что, в свою очередь, активирует путь миграции через SDF-1 [93]. Усиление хемотаксического эффекта в МСК происходит и в ответ на PDGF [94, 95]. МСК, несущие на своей поверхности рецептор PDGFR- β , активнее вживляются в исеченную рану на модели лабораторных мышей в отличие от МСК, у которых отсутствовали данные рецепторы [96]. Значительное привлечение МСК в зону поражения достигается за счет TGF- β 1, т.к. в ответ на TGF- β 1 активируются сигнальные пути через N-кадгерин, PI3K/Akt, ERK1/2, FAK и p38 [97]. При этом важно отметить, что TGF- β 1 при воспалении в нормальной ткани контролирует пролиферацию и дифференцировку многих типов клеток, заживление ран и синтез белков внеклеточного матрикса.

1.3.3 Применение МСК в медицине

Благодаря современным методам выделения и культивирования МСК нашли свое применение практически во всех сферах медицины. Так, в случае естественного заживления организма, МСК, находящиеся в покое в КМ, воспринимают сигнал о повреждении из травмированных тканей. Посредством различных химических и механических факторов МСК мобилизуются и мигрируют в поврежденные ткани через периферическое кровообращение. Заживление поврежденного участка достигается за счет паракринных факторов, выделяемых самими МСК, и (или) с помощью их направленной дифференцировки [98]. Основное клиническое применение МСК связано с восстановлением поврежденных тканей (кожа, опорно-двигательный аппарат, роговица глаза и др.).

Так одним из примеров является восстановление костной ткани. Такие повреждения могут возникнуть в результате травмы, операции по удалению опухоли кости, артропластики. Применение аутологичной костной трансплантации имеет ряд недостатков: отсутствие безграничного запаса аутологичной кости, продолжительное время операции, кровопотери, боли и нарушение структуры костной ткани в месте изъятия [99]. Применение МСК

может являться оптимальным вариантом для восстановления костной ткани [13, 100-104]. Так, например, матрицы, засеянные МСК, успешно применили для устранения дефектов трубчатой кости [103, 104], реконструкции челюсти и терапии альвеолярной расщелины [105-107]. Терапия МСК не приводила к осложнениям, сокращала сроки заживления и приводила к функциональным улучшениям.

Восстановление хрящевой ткани. Хрящевая ткань не способна полноценно самовосстанавливаться, это ограничено бессосудистой природой самого хряща и пролиферацией зрелых хондроцитов [108]. Восстановление хрящевой ткани требует использования нескольких пунктов: наличия подходящей ниши, клеток и стимулирующих факторов [109]. Благодаря использованию гидрогелей [110] и электроспрядных каркасов [111], обладающих отличной биосовместимостью и содержащих высокое количество воды, можно создать оптимальную трехмерную среду, регулирующую дифференциацию и пролиферацию МСК, способствуя восстановлению хрящевой ткани [110]. Трансплантация МСК проста в своем исполнении, она приводит к улучшению качества хрящевой ткани [14, 112-115], показала свою безопасность [116] и позволяет снизить болевые ощущения в области сустава [117]. В случаях регенерации мениска применение МСК снижает показатели боли в коленных суставах по шкале OARSI и VAS в сравнении с исходным уровнем [118, 119] и улучшает заживление разрывов радиального мениска [120].

Восстановление ткани ЦНС. Повреждения ЦНС необратимы, так как ЦНС взрослого человека лишена возможности восстанавливать поврежденные нейроны. Терапия МСК основана на 2 вариантах поражения МСК: повреждения ЦНС, вызванные травмой и продолжительной ишемией, и поражения ЦНС, связанные с неврологическими заболеваниями. МСК способны к дифференциации в нейрональном направлении [121, 122]. Применение МСК приводит к уменьшению рубцов и размеров поражения в области повреждения спинного мозга и способствует развитию аксонов [123]. Дифференцированные нейроны МСК экспрессируют множество факторов, способствующих

восстановлению нейронов и аксонов [124]. Проведены исследования, показывающие эффективность применения МСК для восстановления опорно-двигательного аппарата при травме спинного мозга [125], и доказана безопасность применения МСК при данной патологии [126, 127].

Регенерация тканей сердечно-сосудистой системы. Заболевания сердечно-сосудистой системы почти всегда связаны с недостаточностью кровоснабжения критических областей, приводящих к повреждению и некрозу миокарда. Обширные повреждения кардиомиоцитов, вызванные катастрофическим инфарктом миокарда, не способны к самостоятельному восстановлению из-за ограниченной регенеративной способности миокарда. МСК способны дифференцироваться в кардиомиоциты [128-130] и оказывать регенеративный эффект для кардиомиоцитов благодаря своей миогенной и ангиогенной способности за счет подавления фиброза миокарда и высвобождению большого количества ангиогенных, антиапоптотических и митогенных факторов [131-134]. На модели лабораторных крыс предварительно обработанные IGF-1 МСК показали способность защитить миокард от фиброза кардиомиоцитов и апоптоза, а также уменьшили размер инфаркта [135]. Культивирование МСК с IL-7 привело к усиленному слиянию МСК с кардиомиоцитами, что способствовало регенерации сердечной ткани и улучшению ее функций [12]. Таким образом, применение МСК возможно в терапии инфаркта миокарда, дилатационной кардиомиопатии, легочной гипертензии, ишемических заболеваний периферических сосудов [133, 136-138].

Восстановление роговицы глаза. Роговица глаза является хрупкой структурой, которая постоянно подвергается прямому воздействию внешних факторов. В связи с этим могут возникнуть различной степени тяжести термические, механические, химические и радиационные повреждения глаза. При обширном повреждении может произойти частичная или полная потеря зрения, вызванная васкуляризацией, рубцеванием, помутнением роговицы, развитием конъюнктивита. Использование эпителиальных стромальных клеток роговицы приводило к восстановлению поврежденной поверхности и улучшению зрения, но

не являлось оптимальным [139]. Дополнительное применение МСК из различных источников оказывало иммуносупрессивный эффект при трансплантации роговицы [140-143], что, в свою очередь, приводило к снижению ангиогенеза и уменьшению воспалительных процессов после трансплантации [144]. Также доказан эффект применения МСК, культивированных в кондиционированной среде от кератиноцитов, приводящий к дифференциации в кератоцитоподобные клетки [141].

Регенерация кожи. Восстановление повреждений кожи не всегда может быть реализовано в случаях поражения большой площади. Это связано с невозможностью использовать большое количество кожи для аутотрансплантации. Применение аутотрансплантатов сопряжено с потенциальным риском отторжения ткани или развитием инфекционных осложнений. Альтернативным терапевтическим источником служат МСК [145-148]. Изолированное применение МСК приводило к улучшению ангиогенеза раны и улучшало состояние раны. Секретируемый TSG-6 МСК уменьшает активацию макрофагов, фиброз, воспаление и способствует заживлению ран [21]. VEGF способствует нео- и ангиогенезу, что улучшает трофику тканей и приводит к ускорению заживления [149]. Применение МСК в составе каркасов различной природы [150-154] и модифицированных различными факторами [155-160] также оказывает ранозаживляющее действие дефектов кожи, вызванных различными факторами. Ауто- и аллотрансплантация МСК приводит к стимуляции заживления дефектов кожи при термических ожогах тяжелой степени, диабетических язвах, перинатальной фистуле, дистрофическом буллезном эпидермолизе и лучевых поражениях кожи [9, 191-164].

1.3.4 Мезенхимальные стромальные клетки в терапии МЛП

Местные лучевые поражения (МЛП), с которыми приходится сталкиваться в клинической практике, трудно поддаются стандартным методам лечения. Развитие МЛП может сопровождаться системными реакциями организма, которые будут усугублять процессы заживления. Терапия радиационно-

индуцированных поражений клеточными продуктами является многообещающим методом, но до сих пор нельзя дать однозначно точного ответа, что будет играть главную роль – сами клетки или их паракринные факторы. Многочисленные исследования, проведенные за последние годы, свидетельствуют о перспективе применения клеточных продуктов в терапии местных лучевых ожогов и устранении последствий воздействия ионизирующего излучения, как при местном, так и при системном введении [165] (Таблица 2). МСК являются мультипотентными соматическими клетками-предшественниками, которые можно выделить из различных источников и размножить до многомиллионного количества, сохраняя фенотип и характеристики. Уже доказана эффективность применения МСК из костного мозга и жировой ткани в терапии лучевых ожогов [9, 166-174]. Использование МСК в клинической практике в совокупности с другими видами терапии приводит к ускоренной регенерации раневых поверхностей, восстановлению кровоснабжения тканей, уменьшению болевых ощущений, снижению процессов фиброзирования и, таким образом, помогает пострадавшим вернуться к прежней жизни (Таблица 3). Введение МСК приводило к снижению С-рекативного белка в крови, что связывают с их противовоспалительным действием и иммуномодулирующими свойствами, благодаря чему они активно используются в регенеративной медицине [175-189].

Положительные эффекты трансплантированных МСК не всегда связаны с заменой поврежденных клеток. Их действие также обусловлено паракринными факторами. Паракринные факторы инициируют стимуляцию МСК реципиента, запуская процессы регенерации поврежденных тканей. Так, к цитокинам, участвующим в регуляции воспалительного процесса, относятся IL-1 β , 4, 6, 10, 12, 17, TNF- α , TGF- β 1, PGE-2, PDGF, HGF, SDF-1 и др. [30, 175-184, 190, 194]; за неоангиогенез отвечают VEGF, FGF-2, EGF, TGF- α , HGF, IGF-1 и др. [175, 181-186, 194, 195], а регуляция процессов фиброзирования тканей происходит при участии IL-4, 16, TGF- β 1, HGF, bFGF и др [18, 178, 187, 203, 212]. МСК участвуют в реэпителизации ран за счет увеличения толщины эпидермиса и стимуляции регенерации придатковых структур, повышения скорости эпителизации. За счет

секреции такого фактора, как, например, EGF, улучшается дифференцировка, миграция и пролиферация, повышается выживаемость клеток, участвующих в реэпителизации раны [220-222]. Введение секрета МСК в виде кондиционированных сред, содержащих внеклеточные везикулы, также обладают положительными эффектами, как и применение самих МСК [15-17, 184-186, 188, 214]. Дальнейшая оценка паракринного потенциала МСК может открыть новые методы лечения острых и хронических форм МЛП кожи.

Таким образом, на сегодняшний день, из представленных литературных данных показано, что источниками МСК могут быть различные ткани человека (костный мозг, жировая ткань, кожа, пупочный канатик, амниотическая мембрана и др.). Внутривенное, местное введение и аппликационное применение МСК способствовало сокращению некротических изменений, уменьшению воспаления, значительному улучшению процессов грануляции, реэпителизации, нео- и ангиогенезу и восстановлению волосяного покрова. При этом основной терапевтический эффект МСК связан с действием их паракринного профиля, регулирующего межклеточные взаимодействия. Учитывая противоречивость литературных данных по применению МСК из различных источников и их паракринных факторов для терапии МЛП делает настоящее исследование актуальным.

Таблица 2 – Доклиническое применение клеточных продуктов в терапии радиационно-индуцированных поражений

Авторы, год	Объект исследования	Вид повреждения	Терапевтический источник	Результат терапии (безопасность и эффективность)
1	2	3	4	5
Christine Linard и др., 2015 [196]	Мыши: 1. Облученный контроль (n=10) 2. Группа с имитацией облучения (n=10) 3. Облучение с последующим введением МСК КМ. Выведение на 28 сутки после облучения (n=10) 4. Облучение с последующим применением МСК КМ. Выведение на 50 сутки после облучения (n=10) 5. Облучение с последующим применением фибробластов десны человека. Выведение на 28 сутки после облучения (n=10)	МЛП кожи (30 Гр)	Фибробласты десны человека (ксеногенно)	Индукирование раннего развития толстого, полностью регенерированного эпидермиса, придатков кожи, волосных фолликулов по сравнению с МСК КМ. Период наблюдения 50 дней.

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	6. Облучение с последующим применением фибробластов десны человека. Выведение на 50 сутки после облучения (n=10)			
Yi-Xing Chen и др., 2015 [197]	Крыса 1. Контроль (n=5) 2. Облучение с последующим введением DMEM (n=5) 3. Облучение с последующим применением MCK KM (n=5)	МЛП печени (20 Гр)	MCK KM (аллогенно)	Предварительная инъекция MCK перед облучением способствовала повышению жизнеспособности облученных синусоидальных эндотелиальных клеток и улучшает гистопатологические характеристики в облученной печени. Введение MCK привело к снижению экспрессии провоспалительных цитокинов и повышению количества противовоспалительных факторов. Период наблюдения 4 недели.

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Hong-Gang Duan и др., 2015 [198]	Морская свинка 1. Контроль без облучения (n=20) 2. Контроль с облучением (n=20) 3. Облучение с последующим применением МСК ПК (n=20)	МЛП слизистой носа (5 Гр/неделя/ 5 недель)	МСК ПК человека (ксеногенно)	Через 1 неделю после проведенной терапии регистрировали улучшение времени выведения слизи, через 1 месяц регистрировали уменьшение отека слизистой оболочки носа. Улучшений в морфологии зарегистрировано не было.
Masayoshi Оно и др., 2015 [199]	Крыса 1. Контроль без облучения (n=6) 2. Контроль с облучением (n=6) 3. Облучение с последующим введением МСК (n=6)	Радикацион- но-индуци- рованный проктит (5 Гр/сутки/ 5 дней)	МСК амниотической мембраны человека (ксеногенно)	Трансплантация МСК значительно снизила повреждения эпителия и инфильтративные изменения клеток в прямой кишке. Период наблюдения 8 дней.
Chengcheng Xia и др., 2015 [200]	Мышь 1. Облучение с дальнейшим применением физиологического раствора (n=25)	МЛП легких (18 Гр)	МСК КМ человека (ксеногенно)	Применение МСК улучшило регенерацию легких, выживаемость и гистопатологические

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	2. Облучение с дальнейшим применением МСК (1×10^3) (n=25) 3. Облучение с дальнейшим применением МСК (5×10^3) (n=25) Облучение с дальнейшим применением МСК (1×10^4) (n=25)			характеристики у облученных мышей. Инъекции низкими дозами МСК уменьшили отложения коллагена и способствовали функциональному восстановлению у мышей с радиационно-индуцированным повреждением легких. Период наблюдения 1 месяц.
Sinan Öksüz и др., 2015 [201]	Крыса 1. Контроль. Облучение с дальнейшим обкалыванием DMEM (n=8) 2. Облучение с терапией МСК КМ (n=8) 3. Облучение с терапией МСК КМ, модифицированными VEGF (n=8)	МЛП кожи (30 Гр)	МСК КМ и МСК КМ, трансфицированные геном VEGF (аллогенно)	Использование МСК КМ и МСК-VEGF стимулировало ангиогенез и увеличило процессы васкуляризации. Увеличилась толщина эпидермиса после лечения клеточными продуктами. Сохранялась экспрессия CD31 и VEGF в месте ожога по сравнению со здоровыми тканями,

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Xinping Jiang и др., 2015 [202]	Крыса 1. Облучение с последующим применением PBS (n=30) 2. Облучение с последующей терапией МСК ЖТ (n=30) 3. Контроль без облучения (n=30)	МЛП легких (15 Гр)	МСК ЖТ крысы (аутологично)	повышалась экспрессия PCNA. Период наблюдения 30 дней.
				В результате применения МСК ЖТ удалось добиться ослабления течения радиационно-индуцированного повреждения легких. МСК ЖТ обладали противовоспалительным эффектом, оказывая антифиброзное действие (уменьшения экспрессии IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β 1, Collag1, увеличение количества IL-10 в облученной ткани легких), и поддерживали целостность эпителия легких. Период наблюдения 28 дней.

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Song Gao и др., 2016 [203]	Крыса 1. Фиктивно облученная группа (n=6) 2. Облучение без дальнейшей терапии (n=12) 3. Облучение с последующим введением МСК через 2 недели (n=15) 4. Облучение с последующим введением МСК через 4 недели (n=15) 5. Облучение с последующим введением МСК через 6 недель (n=15) 6. Облучение с последующим введением МСК через 8 недель (n=15)	МЛП сердца (18 Гр)	МСК КМ крысы (аллогенно)	Применение МСК КМ способствовало уменьшению воспалительного процесса и облегчению течения радиационно-индуцированного фиброза, а также повышению репарации поврежденных ДНК. Период наблюдения 3 месяца.

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Osama Muhhamad Maria и др., 2016 [204]	Мышь 1. Облучение без дальнейшей терапии (n=6) 2. Облучение с дальнейшей терапией МСК (n=6) 3. Облучение с дальнейшей терапией фибробластами (n=6)	Радиационно -индуциро- ванный мукозит полости рта (18 Гр)	МСК ЖТ мыши (аллогенно)	Терапия МСК ЖТ минимизировала потерю веса, вызвала сокращение продолжительности язвы 70%, размера язвы, а также уменьшила высоту эпителия на дне язвы. Терапия МСК ЖТ не стимулировала развитие раковых клеток головы и шеи in vitro. Период наблюдения 21 сутки.
Gui-Hua Wang и др., 2016 [205]	Мышь 1. Контроль. Фиктивное облучение (n=10) 2. Облучение с последующим введением PBS (n=10) 3. Облучение с дальнейшим применением нимодипина (n=10) 4. Облучение с дальнейшей терапией МСК ПК (n=10)	МЛП головного мозга (15 Гр)	МСК ПК человека + нимодипин (ксеногенно)	В результате инъекций МСК ПК и комбинированной терапии происходило восстановление массы тела, улучшение когнитивных и двигательных способностей, снизился % некроза нейронов и астроцитов. Комбинированная терапия обладала более выраженным

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	5. Облучение с дальнейшим оказанием терапии МСК с нимодипином (n=10)			эффектом. У мышей данной группы было обнаружено понижение экспрессии проапоптотических индикаторов (p53, Bax) и повышение антиапоптотического индикатора Bcl-2. Период наблюдения 3 месяца.
Sabine François и др., 2017 [206]	Крысы 1. Контроль без облучения (n=10) 2. Облучение в дозе 25 Гр (n=10) 3. Облучение в дозе 35 Гр (n=10) 4. Облучение в дозе 45 Гр (n=10) 5. Облучение в дозе 55 Гр (n=10) 6. Облучение в дозе 65 Гр (n=10) 7. Облучение в дозе 75 Гр (n=10)	МЛП кожи (25-75 Гр)	МСК КМ + ВМР-2 (аллогенно)	Проведенная терапия привела к ускоренному заживлению ран, усилению восстановления эндотелия, нормализации эпидермиса, восстановлению волосяных фолликул и саллярных желез. Также регистрировали увеличение плотности коллагеновых волокон и

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	8. Облучение в дозе 55 Гр с последующей инъекцией МСК КМ (2×10^4) через 7 дней ($n=10$) 9. Облучение в дозе 55 Гр с последующей инъекцией МСК КМ (2×10^5) через 7 дней ($n=10$) 10. Облучение в дозе 55 Гр с последующей инъекцией МСК КМ (2×10^6) через 7 дней ($n=10$) 11. Облучение в дозе 55 Гр с последующей инъекцией МСК КМ (2×10^7) через 7 дней ($n=10$) 12. Облучение в дозе 55 Гр с последующей инъекцией PBS через 21 сутки ($n=10$) 13. Облучение в дозе 55 Гр с последующей инъекцией МСК КМ (2×10^5) через 21 сутки ($n=10$)			кровеносных сосудов. Период наблюдения 52 дня.

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	14. Облучение в дозе 55 Гр с последующей инъекцией МСК КМ и ВМР-2 (2×10^4) через 21 сутки (n=10)			
Christine Linard и др., 2017 [207]	Мини-пиги 1. Облученным животным производили только иссечение некротизированной ткани (n=3) 2. Облучение с дальнейшим применением кожно-фасциального лоскута (n=4) 3. Облучение с дальнейшим использованием кожно-фасциального лоскута и МСК КМ (n=4)	МЛП кожи (90 Гр)	МСК КМ мини-пига + пластическая хирургия (аутологично)	Данный метод обеспечил полное заживление язвы (результаты через 1 год). Уровень Col1/ Col3, экспрессия декорина и фибронектина в области заживления были аналогичны в сравнении с необлученной кожей, не имевшей воспаления и обладающей стабильностью сосудов.
Christine Linard и др., 2018 [208]	Мини-пиги: 1. Облученные животные применением кожно-	МЛП крупа (90 Гр)	МСК КМ (аутологично)	В опытной группе регистрировали улучшение восстановления регенерации и увеличение

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	фасциального лоскута (n=4) 2. Облученные животные с применением кожно-фасциального лоскута и МСК КМ (n=4)			количества капилляров в сравнении с контрольной группой. Период наблюдения 12 месяцев.
Yuhui Nao и др., 2018 [209]	Собаки: 1. Контрольная группа. Облучение с последующим физиологического раствора (n=4) 2. Опытная группа. Облучение с последующим применением МСК ПК (n=4)	МЛП легких (15 Гр)	МСК ПК человека (ксеногенно)	Трансплантация МСК снизила окислительный стресс, воспалительные реакции и активацию пути TGF- β -Smad2/3, уменьшая повреждение легких. In vitro было показано, что кондиционированная среда от МСК ПК эффективно ингибирует повышение уровней Smad2/3 и TGF- β 1. По результатам КТ также можно утверждать, что в группе с использованием МСК степень поражения легких была более легкой. Период наблюдения 180 дней.

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Christian Grønhøj и др., 2018 [210]	Пациент 1. Группа плацебо (n=15) 2. Группа с применением МСК ЖТ (n=15)	Радиационно-индуцированная серостомия (26-39 Гр)	МСК ЖТ (аутологично)	Инъекция МСК ЖТ способствовала увеличению потока слюнных желез через 1 месяц
Zhongshan Liu и др., 2018 [211]	Крысы 1. Контроль. Симмуляция облучения (n=12) 2. Контроль. Облучение (n=12) 3. облучение с последующей терапией МСК ПК (n=12)	МЛП кожи (45 Гр)	МСК ПК человека (ксеногенно)	Трансплантация МСК ПК улучшила заживление язв кожи, способствовала неоваскуляризации и реэпителизации, образованию кератина и пролиферации кератиноцитов в областях язвы, увеличила экспрессию CD31 и VEGF. Период наблюдения 28 дней.
Daming Liu и др., 2018 [212]	Мышь 1. Облучение с инъекцией PBS через 6 ч. (n=20)	МЛП легких (60 Гр)	МСК ПК человека,	Применение МСК способствовало уменьшению количества лимфоцитов в зоне поражения,

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	2. Облучение с введением МСК, модифицированных декорином Ad (E1-).Null через 6ч. (n=20) 3. Облучение с введением МСК, модифицированных декорином Ad (E1-).DCN через 6ч. 4. Облучение с введением МСК, модифицированных декорином Ad (E1-).Null через 28 дней (n=13) 5. Облучение с введением МСК, модифицированных декорином Ad (E1-).DCN через 28 дней (n=13) 6. Применение МСК, модифицированных декорином Ad (E1-).Null без облучения (n=10)		модифицированные декорином (ксеногенно)	повышало пролиферативную активность эпителиальных клеток и ингибировало фиброз на поздней стадии. МСК, модифицированные докорином, обладали более выраженным терапевтическим потенциалом, были более эффективны в индукции INF-γ и Col3α1 в тканях легких, облегчали течение радиационно-индуцированного фиброза. Период наблюдения до 3 месяцев.

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	7. Применение МСК, модифицированных декорином Ad (E1-).DCN без облучения (n=10)			
Jia Yang Sun и др., 2018 [15]	Крысы 1. Негативный контроль (n=12) 2. Облучение с последующим применением EGF-гидрогеля (n=12) 3. Облучение с последующим применением кондиционированной среды от МСК ПК (n=12)	МЛП кожи (40 Гр)	Кондиционированная среда от МСК вартонова студня (ксеногенно)	Кондиционированная среда оказала положительный эффект в развитии ангиогенеза и регенерации салых желез. Способствовала ускоренному заживлению ран без образования рубцов или с образованием рубцов, но меньшего размера в сравнении с группой контроля. Период наблюдения 2 месяца.
Zhu-Yue Chen и др., 2018 [16]	Фибробласты миокарда человека 1. Контроль без облучения 2. Контроль с облучением	Радиационно-индуцированное	Кондиционированная среда МСК ПК	Кондиционированная среда способствовала повышению жизнеспособности клеток и

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	3. Облученные клетки с применением кондиционированной среды МСК ПК	повреждение клеток (8 Гр)	(аллогенно)	антиоксидативного статуса, вызывала уменьшение отложений коллагена, предотвращала окислительный стресс. Способствовала снижению индуцированных облучением уровням профиброзных цитокинов (TGF- β 1, IL-6, IL-8) за счет ингибирования сигнального пути NF-kB. Период наблюдения 7 дней.
Chunwei Zhang и др., 2018 [213]	Крыса 1. Контроль. Животные не были облучены, выведение животных на 5 суток эксперимента (n=4) 2. Облучение с последующим введением МСК (1×10^7).	Радиационно-индуцированное повреждение пищевода	МСК пульпы зуба крысы (аллогенно)	Трансплантация МСК пульпы зуба способствовала восстановлению поврежденной ткани пищевода, восстановлению функций, утолщению стенок и уменьшению воспалительной реакции.

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	Выведение животных на 33 сутки эксперимента (n=7) 3. Облучение с последующим введением PBS. Выведение животных на 33 сутки эксперимента (n=7) 4. Облучение с последующим введением PBS. Выведение животных на 5 сутки эксперимента (n=4) 5. Ложно оперированная группа. Выведение на 5 сутки эксперимента (n=7) Ложно оперированная группа. Выведение на 33 сутки эксперимента (n=4)			Трансплантация МСК пульпы зуба способствовала восстановлению поврежденной ткани пищевода, восстановлению функций, утолщению стенок и уменьшению воспалительной реакции. Экспериментальная группа показала более высокие уровни экспрессии IL-1β, IL-8, TNF-α по сравнению с другими группами. Период наблюдения до 33 дней.

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Андрей Темнов и др., 2018 [17]	Крыса 1. Контроль. Животным не проводили терапию (n=8) 2. Облучение с последующим применением кондиционированной среды от МСК КМ (n=8)	МЛП кожи (110 Гр)	Кондиционированная среда МСК КМ (аллогенно)	Опытная группа показала высокий уровень регенерации кожи и значительно низкий уровень содержания лейкоцитарной инфильтрации в патологоанатомических образцах. Глубина повреждения в опытной группе ограничивалась дермой, в контрольной группе поражение доходило до фасции мышечной ткани слоя брюшной стенки, иногда до кишечника. Период наблюдения 71 сутки.
Rui Zuo и др., 2019 [18]	Крысы 1. Группа животных без облучения и терапии. Умерщвление животных в 0 сутки (n=6)	МЛП бедра (16 Гр)	Экзосомы из МСК КМ (аллогенно)	Использование экзосом привело к повышению уровня β-катенина и способствовало восстановлению костной дифференцировке облученных МСК КМ, а также

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	2. Группа животных без облучения и терапии. Умерщвление через 28 дней (n=6) 3. Облучение без последующей терапии. Умерщвление животных в 0 сутки (n=6) 4. Облучение с последующей терапией МСК КМ. Умерщвление животных через 28 дней (n=6) Облучение с последующим применением экзосом из МСК КМ. Умерщвление животных через 28 дней (n=6)			уменьшило окислительный стресс клеток и повреждения ДНК. Период наблюдения 28 дней
Xiaoli Rong и др., 2019 [19]	Крыса 1. Отрицательный контроль с облучением (n=10)	МЛП кожи (50 Гр)	Секретом МСК из кожи плода человека	Секретом МСК способствовал ангиогенезу in vitro и in vivo. Применение секрета показало

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
	2. Облучение с последующим применением секрета МСК ПК (n=10) Облучение с последующим введением секрета МСК из кожи плода человека (n=10)		(ксеногенно)	более высокое качество и скорость заживления ожогов в сравнении с другими группами. В образцах терапевтической группы уровень экспрессии Col3A1, TGF-β3, Ang-1, Ang-2, VEGF, PLGF был значительно выше относительно других групп, а уровень Col1A2 и TGF-β1 ниже. Период наблюдения 7 недель.
Xinyun Su и др., 2020 [214]	Мышь 1. Контроль без облучения, введение физиологического (n=6) раствора 2. Контроль с облучением (n=6) 3. Облучение с дальнейшим применением МСК ПК (n=6)	Радиационно-индуцированное повреждение слюнных желез (13 Гр)	Внеклеточные везикулы из МСК подчелюстных желез человека (ксеногенно)	Применение экстракта стромальных клеток увеличило скорость слюноотделения (восстановлении функции слюнных желез) через 8 недель на 50-60% в сравнении с контрольной группой. Гистологический анализ в опытной группе показал

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
				увеличение числа ациарных клеток, кровеносных сосудов и парасимпатических нервов по сравнению с группой контроля.
Khademi Bijan. и др., 2020 [215]	Крыса 1. Облученные животные, которым не проводили терапию (n=16) 2. Облученные животные, которым проводилась трансплантация МСК ЖТ (n=16)	МЛП кожи (30 Гр)	МСК ЖТ (аутологично)	Размер раневого дефекта в контрольной группе значительно больше на протяжении всего эксперимента. Однако не удалось наблюдать полного заживления раны в группе с оказанием терапии. Период наблюдения составил 1 месяц.

Примечание: МСК – мезенхимальные стволовые клетки, КМ - костный мозг; ПК – пупочный канатик, ЖТ – жировая ткань; СВФ – стромально-васкулярная фракция.

Таблица 3 – Применение в клинической практике клеточных продуктов в терапии радиационно-индуцированных поражений

Авторы, год	Объект исследования	Вид повреждения	Терапевтический источник	Результат терапии (безопасность и эффективность)
1	2	3	4	5
Matthew Portas и др., 2016 [9]	Пациент (клинический случай)	МЛП кожи (50-60 Гр)	МСК КМ от маргинального донора (аллогенно)	Проведенная терапия привела к уменьшению степени воспаления и сокращению размеров язвенного дефекта, улучшила сосудистую сеть и качество кожи в поврежденном объеме
Carol J. Iddins и др., 2016 [216]	Пациент (клинический случай)	МЛП кожи (15-25 Гр)	СВФ (аутологично)	Через 11 месяцев у пациента не наблюдалось признаков нарушения кожных покровов. По прошествии 13 месяцев отсутствовали осложнения после проведенной процедуры, не регистрировали фиброза, рецидивов раны, значительной боли и нарушений чувствительности.

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
Александр Самойлов и др., 2016 [217]	Пациент (клинический случай)	МЛП кожи (30-35 Гр)	МСК ЖТ, КМ (аутологично)	Достигнута полная эпителизация травмированной поверхности. Период наблюдения 1 месяц.
Christian Grønhoj и др., 2017 [218]	Пациент 1. Группа плацебо (n=15) 2. Группа с применением МСК ЖТ (n=15)	Радиационно-индуцированная ксеростомия (26-39 Гр)	МСК ЖТ (аутологично)	Инъекция МСК ЖТ позволили обеспечить регенеративную микросреду для поврежденных тканей и улучшить процессы слюнообразования. Период наблюдения 4 месяца.
Sadanogi Akita и др., 2017 [219]	Пациент (клинический случай)	МЛП кожи (? Гр)	СВФ (аутологично)	Регистрировали заживление язвы через 75 дней после инъекции. Улучшено движение шеи вперед. Через 6 месяцев в месте введения регистрировали толстую и васкуляризированную мягкую ткань. Диапазон движений увеличился с 130° до 165°

Примечание: МСК – мезенхимальные стволовые клетки, КМ - костный мозг; ЖТ – жировая ткань; СВФ – стромально-васкулярная фракция..

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Описание использованных лабораторных животных

В исследовании было использовано 160 лабораторных животных (самцы Wistar в возрасте 8-12 недель и массой $210,0 \pm 30,0$ грамм) (Рисунок 1). Животные были получены из специализированного питомника лабораторных животных «Пушино», имели соответствующее ветеринарное свидетельство и прошли карантин в течение 14 дней. Исследование одобрено на секции Ученого совета (выписка № 43А от 25.09.2017 г.) и на заседании локального биоэтического комитета (Протокол № 86 от 10.11.2017) ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им А.И. Бурназяна ФМБА России.

Лабораторные животные были рандомизированы случайным образом и разделены на 8 групп (по 20 животных в каждой) в зависимости от вида проводимой терапии:

1-ая группа – К – контроль, в которой животные не получали терапию;

2-ая группа – КС – контроль с интрадермальным введением концентрата культуральной питательной среды трехкратно на 1, 14 и 21 сутки после облучения;

3-я группа – Д – интрадермальное введение МСК слизистой десны человека трехкратно на 1, 14, 21 сутки после облучения;

4-ая группа – ДКС – интрадермальное введение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека трехкратно на 1, 14, 21 сутки после облучения;

5-ая группа – ДК – интрадермальное введение МСК слизистой десны крысы трехкратно на 1, 14, 21 сутки после облучения;

6-ая группа – ДККС – интрадермальное введение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны крысы трехкратно на 1, 14, 21 сутки после облучения;

7-ая группа – П – интрадермальное введение МСК плаценты человека (Пл) трехкратно на 1, 14 и 21 сутки после облучения;

8-ая группа – ПКС – интрадермальное введение концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека трехкратно на 1, 14 и 21 сутки после облучения.



Рисунок 1 – Подготовка лабораторных животных к исследованию: А – общий вид животного, Б – введение животного в наркоз, В – фиксация животного к пенопластовой подложке, Г – облучение животного

Каждое лабораторное животное наблюдали 17 раз: на 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112 сутки после моделирования МЛП. При осмотре производился мониторинг состояния лабораторного животного с оценкой его поведения, движения, респираторной функции, изменения аппетита и веса. В установленные дни производили осмотр кожной поверхности и оценивали течение язвенного процесса: фиксировали размеры (длина, ширина) общей площади измененной кожи, площади язвенной поверхности; наличие отделяемого, струпа, слущенного эпидермиса, фибринового налета.

Вывод животных из эксперимента осуществляли на 28, 42, 56, 70, 91 и 112 сутки с начала эксперимента.

2.2 Введение в наркоз и эвтаназия животных

Животных вводили в наркоз с помощью инъекции смеси Ксилазин (Interchemie, Эстония) и Золетил (Virbac, Франция) (1,2-2,5мг и 0,6-1мг, соответственно) в заднюю часть бедра (Рисунок 1б). Вывод из эксперимента (эвтаназию) животных осуществляли путем внутрисердечного введением 2% раствора Лидокаина (Solopharm, Россия) после предварительной наркотизации.

2.3 Выделение и культивирование МСК слизистой десны крысы

Получали биоптаты слизистой десны крысы породы Wistar. Животные вводили в наркоз и умерщвляли, затем фиксировали на операционном столе и производили забор слизистой десны с помощью стерильного скальпеля и пинцета. Полученные биоптаты (2×3 мм) помещали в пробирку с транспортной средой DMEM (содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 200 Ед/мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина, 200 Ед/мл амфотерицина и 100 Ед/мл гентамицина (StemCell Technology, США)) и доставляли в лабораторию для дальнейших манипуляций [244]. В условиях ламинарного шкафа образцы промывали в чашке Петри в PBS (Gibco, США) с цефазолином (ОАО «Синтез», Россия), затем гомогенизировали с помощью стерильных одноразовых скальпелей. Полученную массу переносили в пробирку объемом 15 мл, заливали 1 мл 0,25% раствора трипсина-EDTA (Gibco, США) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем реакцию останавливали равным объемом раствора FBS (Gibco, США). Образец клеток центрифугировали на скорости 300 g в течение 7 минут, затем производили удаление супернатанта. Далее в пробирку вносили 1 мл 0,15% раствора коллагеназы II типа (Sigma, США) и инкубировали полученную смесь в течение 2 ч при 37°C, реакцию останавливали 1 мл FBS. Осадок ресуспендировали в среде MesenCult™ MSC Basal Medium Human (STEMCELL Technologies,

Канада). Куски-экспланты переносили на 25 см² флаконы и культивировали в питательной среде MesenCultTM MSC Basal Medium Human до 3-6 пассажа в условиях инкубатора при 37°C и 5% CO₂. Во время пассирования кондиционированную среду от полученных образцов собирали в пробирки объемом 15 и 50 мл и замораживали при -20°C.

2.4 Культивирование МСК плаценты и слизистой десны человека

В эксперименте были использованы неперсонифицированные образцы МСК слизистой десны и плаценты человека, находящиеся на длительном криохраниении в криобанке Центра биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Образцы размораживали при 37°C в водяной бане, высевали на 75 см² флаконы и культивировали с 3-го по 6-й пассаж в среде без ксеногенных компонентов – xeno-free (Stem Cell, Канада) с добавлением 100 Ед/мл пенициллина 100 Ед/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия); 2 мМ глутамина (ПанЭко, Россия). При достижении клетками 70-80% конфлюентности производили пассирование образцов. Кондиционированную среду во время пассирования отбирали в пробирки объемом 15 и 50 мл и замораживали при -20°C для дальнейших манипуляций. Полученные МСК, разбавленные в 1хPBS, набирали в инсулиновые шприцы в расчетной дозе 2 млн клеток на 1 кг и вводили лабораторным животным.

2.5 Оценка иммунологических характеристик МСК

Иммунофенотип МСК слизистой десны и плаценты человека определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. Экспрессию поверхностных маркеров МСК слизистой десны человека и плаценты оценивали с помощью меченных флуорохромами антител против CD34-, CD45-, CD90+, CD105+, CD73+, HLA-DR (BD Biosciences и Becton Coulter, США) в соответствии с инструкцией производителя на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson SA, США).

2.6 Определение жизнеспособности МСК

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя 7-AAD, проникающего через цитоплазматическую мембрану клетки и связывающегося с ее ДНК. Определяли количество CD45⁺ негативных 7-AAD позитивных клеток на проточном цитофлуометре FACS Canto II (Becton Dickinson CA, США) в соответствии с инструкцией производителя.

2.7 Получение концентрата культуральной и кондиционированных сред

Забор кондиционированных сред МСК плаценты человека, слизистой десны человека и крысы проводили в стерильные пробирки на 3-6 пассаже при достижении клетками 80-90% конfluence. Для получения концентрата культуральной и кондиционированных сред использовали лабораторную систему фильтрации в тангенциальном потоке LabScale (MerkMillipore, Germany), разработанную для концентрирования, диафильтрации и микрофильтрации. Культуральную или кондиционированную среду помещали в цилиндр для фильтрации в тангенциальном потоке и осуществляли ее концентрирование (Таблица 4). Полученные объемы пропускали через нейлоновый шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм (Corning, США) и замораживали в пробирках 15 мл на -20°C для дальнейших манипуляций.

Таблица 4 – Параметры лабораторной системы фильтрации для получения концентратов кондиционированной среды

Группа	Исходный объем, мл	Конечный объем, мл	Входное давление монотра, psi	Давление монотра ретентата, psi	Концент- рация, раз	Концентрация белка, мкг/мл
КС	250	26	34-45	10-15	9,6	924
ДКС	250	27	35-50	10-20	9,3	944

Продолжение таблицы 4

Группа	Исходный объем, мл	Конечный объем, мл	Входное давление монومتра, psi	Давление монومتра ретентата, psi	Концент- рация, раз	Концентрация белка, мкг/мл
ДККС	270	27	40-52	8-12	10	-
ПКС	242,5	30	40-50	6-12	8,1	648

Примечание: КС – концентрат культуральной среды MesenCult, ДКС – концентрат кондиционированной среды от МСК слизистой десны, ДККС – концентрат кондиционированной среды от МСК слизистой десны крысы, ПКС – концентрат кондиционированной среды от МСК плаценты человека.

2.8 Облучение животных

Моделирование МЛП относительно «мягким» рентгеновским излучением проводили на рентгеновской установке ЛНК-268 (РАП100-10) (ООО «Диагностика-М», Россия). Животным в состоянии наркоза выбривали шерсть в пояснично-подвздошной области спины, фиксировали их к пенопластовой подложке (Рисунок 1в). С помощью заранее подготовленного шаблона и черного маркера определяли центр и границы будущего поражения, затем производили облучение с режимом радиационного воздействия в дозе 110 Гр с алюминиевым фильтром 0,1 мм, напряжением 30 кВ, током пучка 6,1 мА, мощностью дозы 21,4 Гр/мин с точностью дозы $\pm 5\%$, неопределенность измерения дозы $\pm 6\%$ по предложенной ранее методике [225], приводящей к короткому латентному периоду и хронической язве кожи у лабораторных животных (Рисунок 1г). После облучения животных рассаживали по индивидуальным стерильным боксам с автономной системой вентиляции Smart Flow (Tecniplast Group, Италия), обеспечивая свободный доступ к воде и еде.

2.9 Введение МСК, кондиционированных сред и культуральной среды лабораторным животным

Перед введением в зону поражения МСК, кондиционированными средами или культуральной средой животных вводили в наркоз. На 1 сутки обкалывание производили по периметру вокруг моделируемой зоны поражения в 10-14 точках, отступая от ее границ 2-5 мм; на 14 и 21 сутки обкалывание производили вокруг уже видимой области поражения так же с отступом от границ в 2-5 мм. Собранные МСК разводили в 1хPBS, набирали в инсулиновые шприцы в расчетной дозе 2 млн клеток на 1 кг и вводили лабораторным животным. В дни терапии пробирки с кондиционированной или культуральной средой размораживали на водяной бане (37°C) и набирали концентрат используемой среды в инсулиновые шприцы. Для применения расчет дозы введения концентрата кондиционированной среды проводили с учетом концентрации клеток (2 млн клеток на 1 кг); объем концентрата культуральной среды составил 0,4 мл на животное (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Введение МСК/концентрата из кондиционированной среды лабораторным животным

2.10 Оценка повреждения кожи и ее придатков

Развитие лучевого поражения и эффективности применения клеточной терапии оценивали по динамике изменений клинической картины. Площадь пораженного участка (размер площади общей измененной кожи и размер площади язвенной поверхности) определяли с помощью с помощью планиметрического метода исследования и фотографической съемки. Расчет измерений производили с помощью программного обеспечения ImageTool (UTHSCSA).

2.11 Гистологическое исследование

На 28, 42, 56, 70, 91 и 112 сутки 2-3 крыл вводили в наркоз и умерщвляли. Из зоны поражения иссекали лоскут кожи (область язвенного дефекта с прилежащей кожей и подлежащими мышцами) и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина (Histoline, Россия). Дальнейшая обработка иссеченных образцов осуществлялась по стандартным гистологическим методикам. Препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, были использованы для общей оценки состояния исследуемых тканей.

2.12 Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование образцов пораженной ткани, взятой на 28 и 112 сутки эксперимента, проводили автоматизированным методом с помощью иммуногистостейнера Ventana BenchMark Ultra с депарафинизацией и демаскировкой в аппарате с использованием антител. Количественно определяли антитела к CD31 (маркер эндотелиальных клеток), к CD68 (маркер макрофагов), к PGP 9.5 (маркер дифференцирующихся нейронов в коже), к Ki67 (маркер пролиферации клеток) и FVIII (маркер к фактору адгезии тромбоцитов).

Экспрессию маркеров к Collagen I и III (маркер к коллагенам I и III типа), VEGF (маркер эндотелия кровеносных сосудов кожи) оценивали полуколичественно в баллах от 0 до 3, где 0 – отсутствие экспрессии, а 3 – выраженная экспрессия. Антитела предоставлены компанией Novocastra, Великобритания. Имуногистохимические маркеры оценивали в абсолютном количестве в 10 полях зрения на препарат при увеличении $\times 200$ (FVIII в сосудах, PGP 9.5, CD31) и $\times 400$ (FVIII в строме, CD68, Ki67).

2.13 Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft), Statistica 6 (StatSoft), ImageTool (UTHSCSF). Значимость статистических различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Результаты исследования представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. Статистически достоверным считали различия при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ РАДИАЦИОННЫХ ОЖОГАХ

3.1 Изучение влияние МСК и их паракринных факторов, находящихся в составе кондиционированных сред на регенерацию кожного покрова при МЛП у лабораторных животных

В клинической практике планиметрический метод является одним из основных методов, характеризующих заживление открытых ран за счет регистрации скорости уменьшения язвенной поверхности во времени.

При визуальном осмотре кожных покровов животных в зоне моделирования МЛП на 3-и сутки наблюдали появление первичной эритемы, сопровождающейся нарушением нормального тонуса кожи. К 7-м суткам у животных наблюдали признаки появления демаркационной линии, при этом у некоторых животных отмечали раннее развитие сухого дерматита в области облучения. К 14 суткам у всех животных было зарегистрировано появление влажного дерматита, сопровождающееся увеличением размеров области пораженной кожи с формированием язвенной поверхности. Далее происходило заживление язвенной поверхности за счет краевой эпителизации с возникновением рецидивирующих процессов у отдельных животных, что сопровождалось увеличением площади язвенной поверхности.

Сравнение групп с интрадермальным введением МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека с группами контроля

В период с 7 по 28 сутки эксперимента при оценке площади общей измененной кожи во всех группах эксперимента сохранялась тенденция ее уменьшения. С 28 по 49 сутки эксперимента отмечалось небольшое увеличение площади общей измененной кожи с последующей динамикой уменьшения до конца эксперимента. При этом данные по площади общей измененной кожи были

значительно ниже в группе КС и статистически достоверны по сравнению с группой К с 14 по 105 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$); по сравнению с группами Д и ДКС статистически достоверные различия регистрировали с начала эксперимента по 91 сутки ($p \leq 0,05$). В группе К статистически достоверные различия отмечались в момент ее нахождения на «плато» с 35 по 84 сутки по сравнению с группой ДКС ($p \leq 0,05$). Достоверных различий между группой Д и группами К и ДКС обнаружено не было (Рисунок 3, Таблица 5).

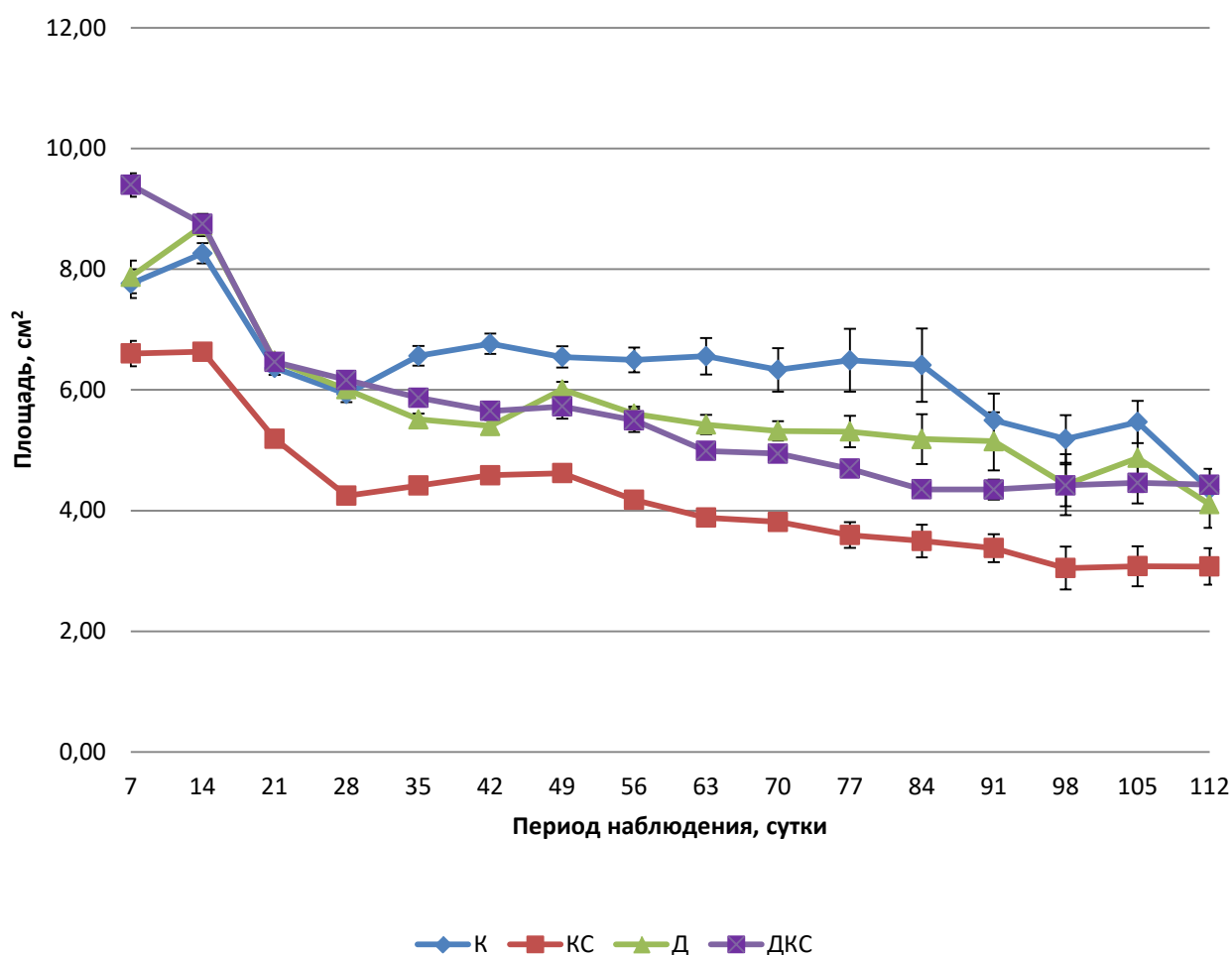


Рисунок 3 – Динамика площади общей измененной кожи животных при МЛП в группах К, КС, Д, ДКС

Таблица 5 – Площадь общей измененной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, Д и ДКС, см²

Сутки	К	КС	Д	ДКС
7	7,76±0,47	6,60±0,42	7,87±0,54	9,40±0,39#&

Продолжение таблицы 5

Сутки	К	КС	Д	ДКС
14	8,26±0,33	6,63±0,26*	8,72±0,35#	8,75±0,34#
21	6,36±0,23	5,19±0,18*	6,48±0,18#	6,46±0,24#
28	5,93±0,27	4,25±0,13*	6,01±0,20#	6,17±0,28#
35	6,56±0,33	4,42±0,17*	5,51±0,19*#	5,87±0,27*#
42	6,76±0,34	4,59±0,21*	5,40±0,28*#	5,65±0,30*#
49	6,54±0,35	4,62±0,24*	6,01±0,25#	5,73±0,41*#
56	6,50±0,41	4,18±0,26*	5,60±0,24#	5,50±0,38*#
63	6,56±0,60	3,88±0,23*	5,43±0,32#	4,49±0,26*#
70	6,33±0,72	3,81±0,26*	5,32±0,32#	4,94±0,19#
77	6,49±1,04	3,59±0,43*	5,31±0,53#	4,69±0,15*#
84	6,41±1,21	3,50±0,54*	5,19±0,83#	4,35±0,17*#
91	5,50±0,88	3,38±0,47*	5,15±0,96#	4,35±0,33#
98	5,19±0,79	3,05±0,71*	4,43±1,01	4,42±0,69
105	5,47±0,69	3,08±0,67*	4,87±1,13	4,46±0,68
112	4,35±0,42	3,07±0,60	4,10±0,78	4,43±0,53

Примечания: * – достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # – достоверные различия групп Д и ДКС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$), & – достоверные различия между группой ДКС и Д ($p \leq 0,05$).

При оценке площади язвенной поверхности также отмечали общую тенденцию к ее уменьшению во всех группах (К, КС, Д, ДКС), однако регистрировали увеличение площади с 56 по 91 сутки в группе Д на 45,32% (с $1,39 \pm 0,45$ до $2,02 \pm 1,12 \text{ см}^2$) и с 42 по 77 сутки в группе К на 105,8% (с $1,90 \pm 0,28$ до $3,91 \pm 0,97 \text{ см}^2$). При этом статистически достоверные различия были обнаружены в группе КС по сравнению с группой К с 14 по 105 сутки ($p \leq 0,05$); по сравнению с группой Д и ДКС с 14 по 56 и 42 сутки, соответственно ($p \leq 0,05$) (Рисунок 4, Таблица 6).

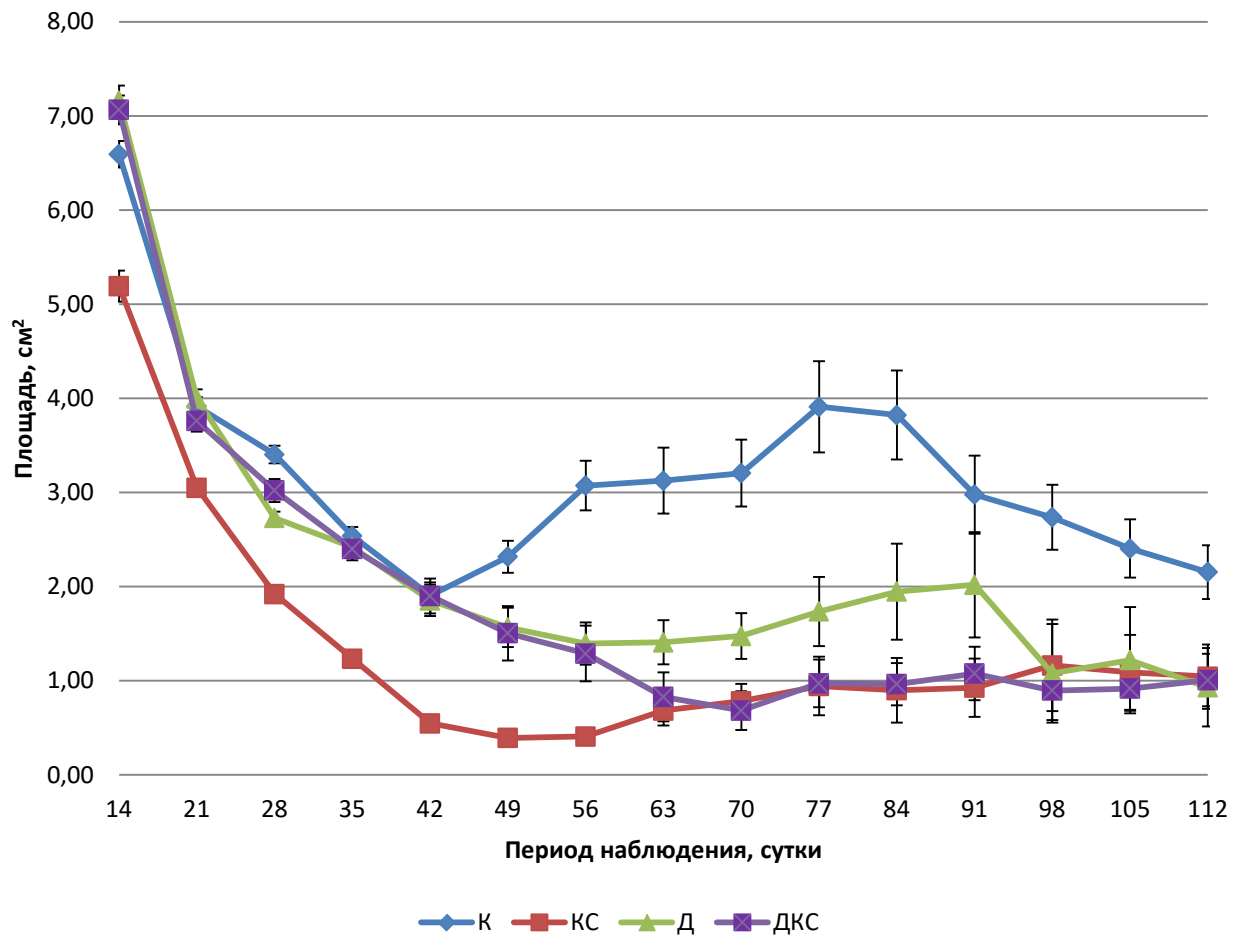


Рисунок 4 – Динамика развития язвенной поверхности кожи у животных при МЛП в группах К, КС, Д, ДКС

Таблица 6 – Площадь язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, Д и ДКС, см²

Сутки	К	КС	Д	ДКС
14	6,59±0,28	5,19±0,33*	7,16±0,32#	7,06±0,31#
21	3,91±0,20	3,05±0,14*	4,00±0,20#	3,76±0,22#
28	3,40±0,19	1,92±0,14*	2,73±0,14*#	3,02±0,25#
35	2,54±0,19	1,23±0,15*	2,42±0,21#	2,40±0,25#
42	1,90±0,28	0,55±0,16*	1,85±0,33#	1,90±0,37#
49	2,32±0,34	0,39±0,19*	1,57±0,42#	1,50±0,58*
56	3,07±0,53	0,41±0,17*	1,39±0,45*#	1,29±0,59*
63	3,12±0,70	0,68±0,32*	1,41±0,47*	0,83±0,52*
70	3,20±0,71	0,78±0,37*	1,47±0,49*	0,68±0,41*

Продолжение таблицы 6

Сутки	К	КС	Д	ДКС
77	3,91±0,97	0,94±0,62*	1,74±0,74	0,97±0,50*
84	3,82±0,95	0,90±0,69*	1,95±1,02*	0,96±0,45*
91	2,98±0,83	0,93±0,62*	2,02±1,12	1,08±0,57*
98	2,74±0,69	1,16±0,97*	1,08±1,04*	0,90±0,63*
105	2,40±0,62	1,09±0,79*	1,22±1,13	0,92±0,47*
112	2,15±0,57	1,04±0,68	0,93±0,83*	1,01±0,56
% сокращения 14/112 сутки	67,4	80	87	85,7

Примечания: * – достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # – достоверные различия групп Д и ДКС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$).

Различие площади язвенной поверхности также было статистически достоверным в группе К по сравнению с группой ДКС с 49 по 105 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$). Между группой К и группой Д также были статистически достоверные различия в промежуток с 28 по 112 сутки ($p \leq 0,05$), но не во все дни. Происходило чередование наличия и отсутствия достоверных различий, что может быть связано с незначительным волнообразным течением заживления язвенной поверхности в группе Д в промежуток с 70 по 112 сутки. С 70 суток до 112 сутки в группах Д, ДКС и КС по сравнению с Контролем отмечалось достоверное сокращение язвенной поверхности МЛП ($p \leq 0,05$). Статистически достоверных различий в оценке язвенной поверхности между группой Д и ДКС обнаружено не было. Язвенная поверхность с момента своего формирования (14 сутки) к концу эксперимента (112 сутки) в группе К и КС сократилась на 67,4% и 80% К (с $6,59 \pm 0,28$ до $2,15 \pm 0,57 \text{ см}^2$; с $5,19 \pm 0,33$ до $1,04 \pm 0,68 \text{ см}^2$ соответственно, $p \leq 0,05$), в группе Д и ДКС на 87% и 85,7% (с $7,16 \pm 0,32$ до $0,93 \pm 0,83$; с $7,06 \pm 0,31 \text{ см}^2$ до $1,01 \pm 0,56 \text{ см}^2$ соответственно, $p \leq 0,05$).

Сравнение групп с интрадермальным введением МСК слизистой десны крысы и концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны крысы с группами контроля

Статистический анализ площади общей измененной поверхности кожи не показал достоверных различий в группе ДК по сравнению с группами К и ДККС. Достоверные различия во все дни эксперимента были отмечены в группе КС по сравнению с группами ДК и ДККС ($p=0,05$). Между группами К и ДККС достоверные различия были зарегистрированы лишь в 7, 21, 42 сутки эксперимента ($p\leq 0,05$) (Рисунок 5, Таблица 7).

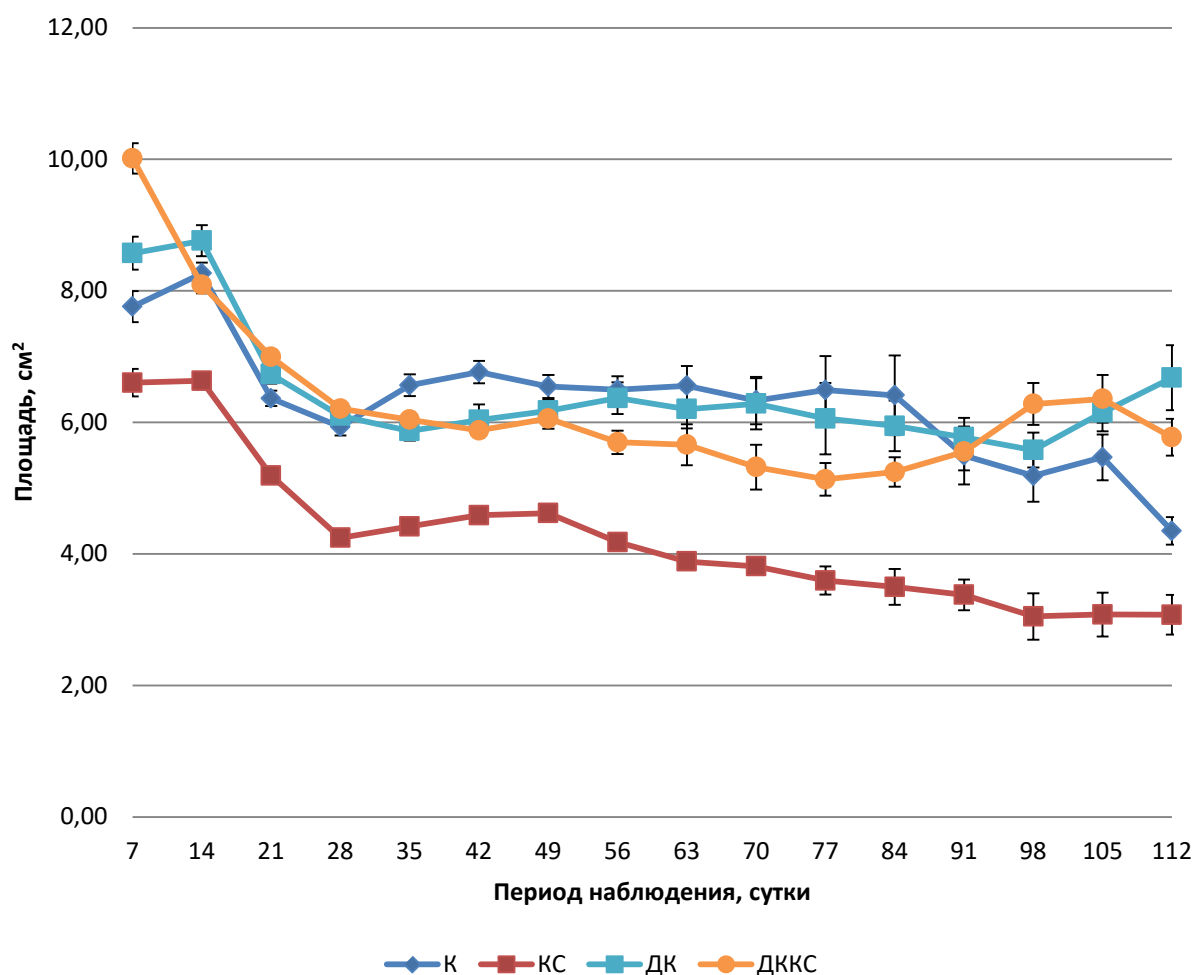


Рисунок 5 – Динамика площади общей измененной кожи животных при МЛП в группах К, КС, ДК и ДККС

Таблица 7 – Площадь общей измененной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, ДК и ДККС, см²

Сутки	К	КС	ДК	ДККС
7	7,76±0,47	6,60±0,42	8,57±0,50#	10,02±0,46*#
14	8,26±0,33	6,63±0,26*	8,76±0,47#	8,09±0,26#
21	6,36±0,23	5,19±0,18*	6,73±0,29#	7,0±0,20*#
28	5,93±0,27	4,25±0,13*	6,10±0,28#	6,21±0,18#
35	6,56±0,33	4,42±0,17*	5,87±0,28#	6,04±0,19#
42	6,76±0,34	4,59±0,21*	6,04±0,47#	5,88±0,22*#
49	6,54±0,35	4,62±0,24*	6,18±0,33#	6,06±0,30#
56	6,50±0,41	4,18±0,26*	6,37±0,48#	5,70±0,35#
63	6,56±0,60	3,88±0,23*	6,20±0,59#	5,66±0,62#
70	6,33±0,72	3,81±0,26*	6,28±0,78#	5,32±0,68#
77	6,49±1,04	3,59±0,43*	6,06±1,09#	5,13±0,50#
84	6,41±1,21	3,50±0,54*	5,95±0,77#	5,25±0,45#
91	5,50±0,88	3,38±0,47*	5,77±0,59#	5,55±0,56#
98	5,19±0,79	3,05±0,71*	5,58±0,53#	6,28±0,63#
105	5,47±0,69	3,08±0,67*	6,15±0,57#	6,36±0,73#
112	4,35±0,42	3,07±0,60	6,68±0,99#	5,77±0,56#

Примечания: * – достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # – достоверные различия групп ДК и ДККС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$).

При оценке площади язвенной поверхности статистически достоверные различия были обнаружены в группе КС с 14 по 49 сутки эксперимента по сравнению с группой ДККС ($p \leq 0,05$) и с 14 по 98 и в 112 сутки эксперимента по сравнению с группой ДК ($p \leq 0,05$). В группе К основные статистические различия ($p \leq 0,05$) были зарегистрированы с 49 по 84 сутки по отношению к группе ДККС и в 21 и 28 сутки по отношению к группе ДК. В группах ДК и ДККС отмечали увеличение площади язвенной поверхности с 63 по 112 дни эксперимента, при

этом между группами ДК и ДККС достоверные различия были обнаружены в 28, 42, 63 и 70 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$). Язвенная поверхность в группах ДК и ДККС в период с 14 по 112 сутки была сокращена на 60,2% и 50,4% (Рисунок 6, Таблица 8).

Язвенная поверхность с момента своего формирования (14 сутки) к концу эксперимента (112 сутки) в группах ДК и ДККС сократилась на 60,2% и 50,4% К (с $7,31 \pm 0,38 \text{ см}^2$ до $2,91 \pm 0,79 \text{ см}^2$; с $6,96 \pm 0,19 \text{ см}^2$ до $3,45 \pm 1,03 \text{ см}^2$ соответственно, $p \leq 0,05$) по сравнению с группой Контроля 67,4% (с $6,59 \pm 0,28 \text{ см}^2$ до $2,15 \pm 0,57 \text{ см}^2$).

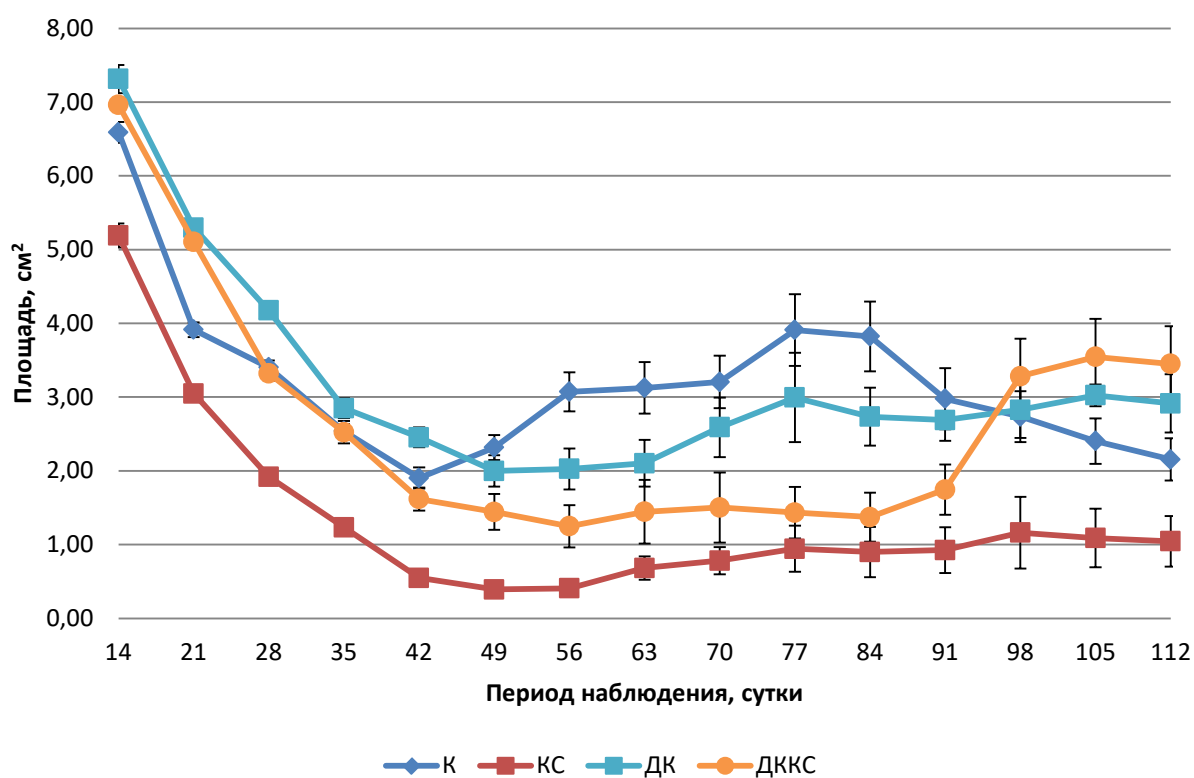


Рисунок 6 – Динамика развития язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, ДК, ДККС

Таблица 8 – Площадь язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, ДК и ДККС, см²

Сутки	К	КС	ДК	ДККС
14	6,59±0,28	5,19±0,33*	7,31±0,38	6,96±0,19
21	3,91±0,20	3,05±0,14*	5,3±0,23*#	5,11±0,18*#

Продолжение таблицы 8

Сутки	К	КС	ДК	ДККС
28	3,40±0,19	1,92±0,14*	4,17±0,22*#	3,32±0,21#&
35	2,54±0,19	1,23±0,15*	2,85±0,27#	2,52±0,30#
42	1,90±0,28	0,55±0,16*	2,45±0,27#	1,62±0,31#&
49	2,32±0,34	0,39±0,19*	2,00±0,42#	1,44±0,49*#
56	3,07±0,53	0,41±0,17*	2,03±0,56#	1,25±0,57*
63	3,12±0,70	0,68±0,32*	2,10±0,63#	1,45±0,87*&
70	3,20±0,71	0,78±0,37*	2,59±0,81#	1,50±0,95*&
77	3,91±0,97	0,94±0,62*	3,00±1,21#	1,43±0,70*
84	3,82±0,95	0,90±0,69*	2,73±0,79#	1,37±0,66*
91	2,98±0,83	0,93±0,62*	2,69±0,56#	1,75±0,68
98	2,74±0,69	1,16±0,97*	2,83±0,76#	3,28±1,02
105	2,40±0,62	1,09±0,79*	3,02±0,30	3,55±1,03
112	2,15±0,57	1,04±0,68	2,91±0,79	3,45±1,03#
% сокращения 14/112 сутки	67,4	80	60,2	50,4

Примечания: * – достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # – достоверные различия групп ДК и ДККС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$), & – достоверные различия между группой ДККС и ДК ($p \leq 0,05$).

Сравнение групп с интрадермальным введением МСК плаценты человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека с группами контроля

Так же, как и в предыдущих группах, наблюдали статистически достоверные различия при оценке общей измененной площади кожи в зоне моделирования МЛП в группе КС по сравнению с группами Пл (с 7 по 112 сутки ($p \leq 0,05$)) и ПКС (с 7 по 91 сутки ($p \leq 0,05$)). В последний сутки эксперимента группы Пл и ПКС были достоверно различны по сравнению с группой К ($p \leq 0,05$), при этом значения

общей измененной площади в группе Пл оставались значительно выше других групп (К, КС, ПКС). Между группами Пл и ПКС различия наблюдали только в 105 и 112 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$) (Рисунок 7, Таблица 9).

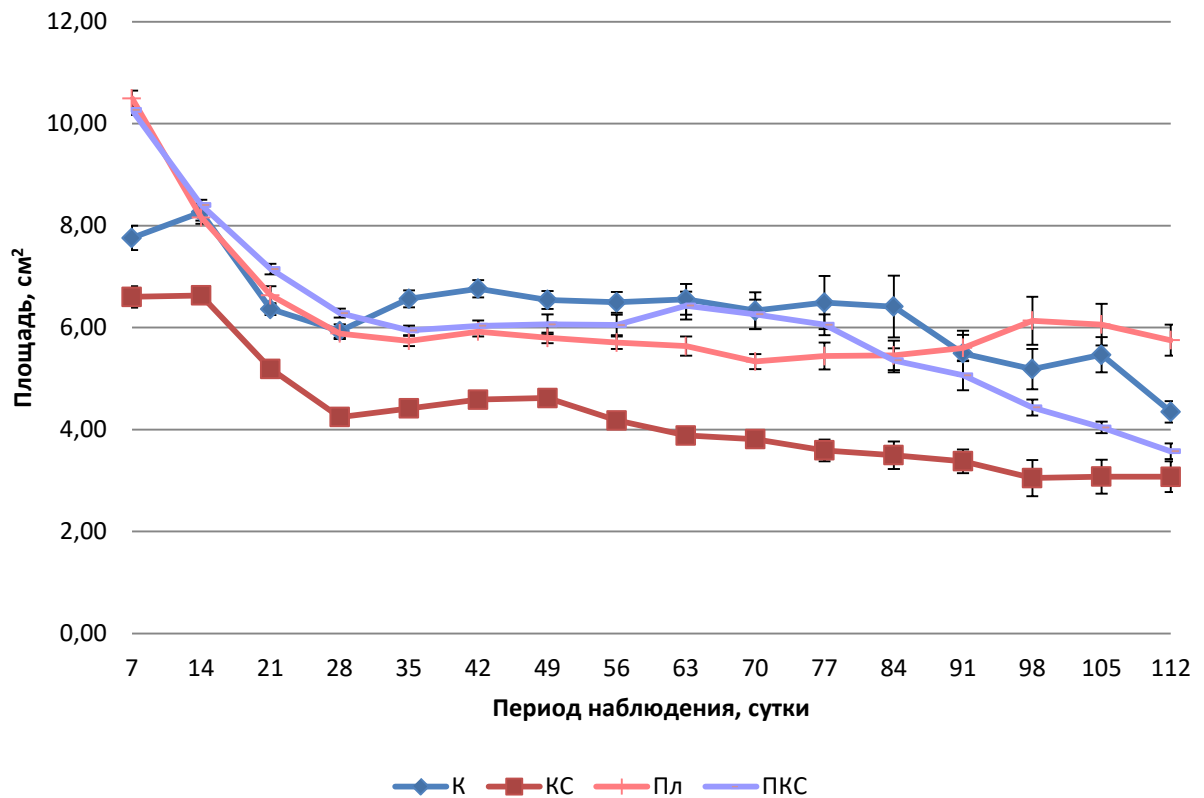


Рисунок 7 – Динамика площади общей измененной кожи животных при МЛП в группах К, КС, Пл и ПКС

Таблица 9 – Площадь общей измененной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, Пл и ПКС, см²

Сутки	К	КС	Пл	ПКС
7	7,76±0,47	6,60±0,42	10,50±0,31*#	10,27±0,19*#
14	8,26±0,33	6,63±0,26*	8,16±0,25#	8,41±0,21#
21	6,36±0,23	5,19±0,18*	6,63±0,36#	7,15±0,20*#
28	5,93±0,27	4,25±0,13*	5,88±0,22#	6,28±0,18#
35	6,56±0,33	4,42±0,17*	5,74±0,21#	5,95±0,19#
42	6,76±0,34	4,59±0,21*	5,92±0,19*#	6,04±0,21*#
49	6,54±0,35	4,62±0,24*	5,80±0,21*#	6,06±0,39#

Продолжение таблицы 9

Сутки	К	КС	Пл	ПКС
56	6,50±0,41	4,18±0,26*	5,71±0,24#	6,05±0,41#
63	6,56±0,60	3,88±0,23*	5,64±0,37#	6,43±0,54#
70	6,33±0,72	3,81±0,26*	5,33±0,29#	6,26±0,28#
77	6,49±1,04	3,59±0,43*	5,44±0,53#	6,06±0,41#
84	6,41±1,21	3,50±0,54*	5,45±0,58#	5,36±0,47#
91	5,50±0,88	3,38±0,47*	5,60±0,52#	5,07±0,58#
98	5,19±0,79	3,05±0,71*	6,13±0,95#	4,43±0,31
105	5,47±0,69	3,08±0,67*	6,06±0,81#	4,04±0,23*&
112	4,35±0,42	3,07±0,60	5,75±0,61*#	3,57±0,30*&

Примечания: * – достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # – достоверные различия групп Пл и ПКС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$), & – достоверные различия между группой ПКС и Пл ($p \leq 0,05$).

С 14 по 56 сутки эксперимента площадь язвенной поверхности в группах Пл и ПКС статистически достоверно различалась по сравнению с группой КС. На 63 сутки в группе Пл выявляли максимальное сокращение площади язвенной поверхности по сравнению с группой К ($1,63 \pm 0,46 \text{ см}^2$ и $3,12 \pm 0,70 \text{ см}^2$, $p \leq 0,05$), после чего в группе Пл отмечалось увеличение площади язвенной поверхности до максимального значения на 112 сутки ($3,52 \pm 1,14 \text{ см}^2$). На 112 сутки в группе ПКС регистрировали достоверное сокращение язвенной поверхности по сравнению с К ($0,31 \pm 0,18 \text{ см}^2$ и $2,15 \pm 0,57 \text{ см}^2$, $p \leq 0,05$). В группе ПКС отмечали уменьшение площади формирования язвенной поверхности с незначительным волнообразным течением с 56 по 84 сутки по сравнению с группой К на 21, 56, 98-112 сутки ($p \leq 0,05$). Язвенная поверхность с момента своего формирования (14 сутки) к концу эксперимента (112 сутки) в группах Пл и ПКС сократилась на 43,1% и 95,4% (с $6,19 \pm 0,23 \text{ см}^2$ до $3,52 \pm 1,14 \text{ см}^2$; с $6,73 \pm 0,18 \text{ см}^2$ до $0,31 \pm 0,18 \text{ см}^2$ соответственно, $p \leq 0,05$) по сравнению с группой Контроля 67,4% (с $6,59 \pm 0,28$ до $2,15 \pm 0,57 \text{ см}^2$) (Рисунок 8, Таблица 10).

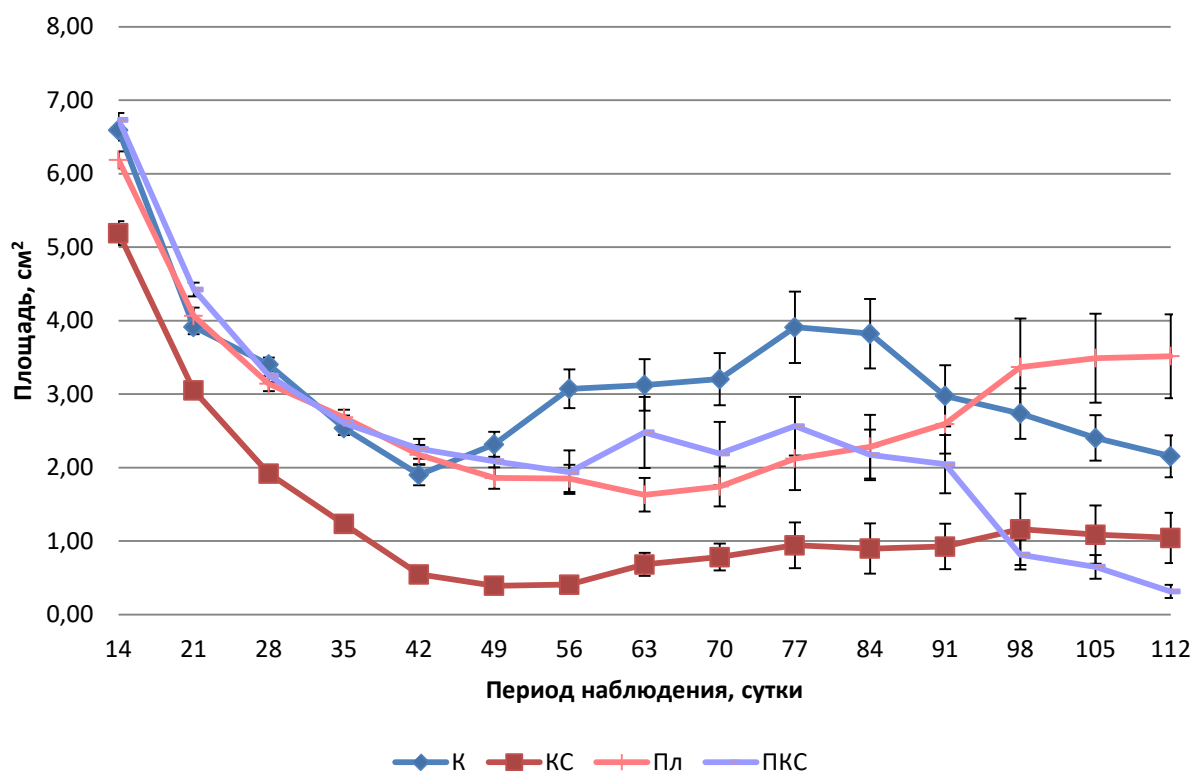


Рисунок 8 – Динамика развития язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, Пл, ПКС

Таблица 10 – Площадь язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах К, КС, Пл и ПКС, см²

Сутки	К	КС	Пл	ПКС
14	6,59±0,28	5,19±0,33*	6,19±0,23#	6,73±0,18#
21	3,91±0,20	3,05±0,14*	4,07±0,22#	4,42±0,19*#
28	3,40±0,19	1,92±0,14*	3,14±0,20#	3,25±0,18#
35	2,54±0,19	1,23±0,15*	2,68±0,21#	2,60±0,21#
42	1,90±0,28	0,55±0,16*	2,17±0,27#	2,25±0,27#
49	2,32±0,34	0,39±0,19*	1,86±0,29#	2,09±0,42#
56	3,07±0,53	0,41±0,17*	1,85±0,37#	1,94±0,59*#
63	3,12±0,70	0,68±0,32*	1,63±0,46*	2,48±0,96
70	3,20±0,71	0,78±0,37*	1,74±0,55	2,19±0,86
77	3,91±0,97	0,94±0,62*	2,12±0,86	2,56±0,80
84	3,82±0,95	0,90±0,69*	2,28±0,87#	2,17±0,69

Продолжение таблицы 10

Сутки	К	КС	Пл	ПКС
91	2,98±0,83	0,93±0,62*	2,60±0,81#	2,05±0,80
98	2,74±0,69	1,16±0,97*	3,37±1,32	0,82±0,40*
105	2,40±0,62	1,09±0,79*	3,49±1,21	0,65±0,32*
112	2,15±0,57	1,04±0,68	3,52±1,14#	0,31±0,18*&
% сокращения 14/112 сутки	67,4	80	43,1	95,4

Примечания: * – достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), # – достоверные различия групп Пл и ПКС по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$), & – достоверные различия между группой ПКС и Пл ($p \leq 0,05$).

Сравнение групп с интрадермальным введением МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека с группами с интрадермальным введением МСК плаценты человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека

Также было проведено сравнение между группами, где в терапии использовались человеческие МСК из различных источников и их паракринные факторы. Значение площади общей измененной поверхности кожи в группе Пл увеличилось с 77 по 112 сутки, в то время как в остальных группах происходило уменьшение площади. В группах Д, ДКС и ПКС прослеживалась схожая динамика уменьшения площади общей измененной поверхности кожи. Достигнутые в конечной точке близкие между собой значения не различались при этом статистически: Д – $4,10 \pm 0,78 \text{ см}^2$, ДКС – $4,43 \pm 0,53 \text{ см}^2$, ПКС – $3,57 \pm 0,30 \text{ см}^2$. На большей части эксперимента достоверных различий между группами не наблюдалось (Рисунок 9, Таблица 11).

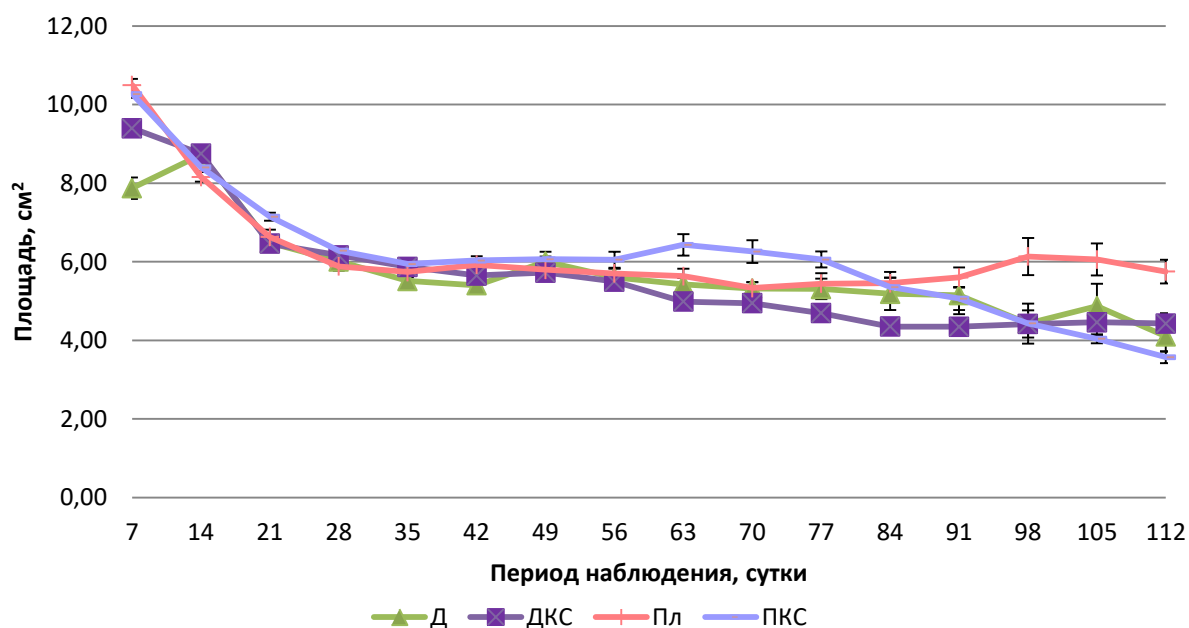


Рисунок 9 – Динамика площади общей измененной кожи животных при МЛП в группах Д, ДКС, Пл и ПКС

Таблица 11 – Площадь общей измененной поверхности кожи животных при МЛП в группах Д, ДКС, Пл и ПКС, см²

Сутки	Д	ДКС	Пл	ПКС
7	7,87±0,54	9,40±0,39#&1	10,50±0,31*#	10,27±0,19*#
14	8,72±0,35#	8,75±0,34#	8,16±0,25	8,41±0,21
21	6,48±0,18#	6,46±0,24#	6,63±0,36	7,15±0,20*#
28	6,01±0,20#	6,17±0,28#	5,88±0,22	6,28±0,18
35	5,51±0,19*#	5,87±0,27*#	5,74±0,21*	5,95±0,19*
42	5,40±0,28*#	5,65±0,30*#	5,92±0,19*	6,04±0,21*
49	6,01±0,25#	5,73±0,41*#	5,80±0,21	6,06±0,39
56	5,60±0,24#	5,50±0,38*#	5,71±0,24	6,05±0,41
63	5,43±0,32#	4,49±0,26*#	5,64±0,37#	6,43±0,54#
70	5,32±0,32#	4,94±0,19#	5,33±0,29	6,26±0,28
77	5,31±0,53#	4,69±0,15*#	5,44±0,53	6,06±0,41#
84	5,19±0,83#	4,35±0,17*#	5,45±0,58	5,36±0,47#
91	5,15±0,96#	4,35±0,33#	5,60±0,52#	5,07±0,58
98	4,43±1,01	4,42±0,69	6,13±0,95	4,43±0,31

Продолжение таблицы 11

Сутки	Д	ДКС	Пл	ПКС
105	4,87±1,13	4,46±0,68	6,06±0,81	4,04±0,23 &2
112	4,10±0,78	4,43±0,53	5,75±0,61	3,57±0,30 &2

Примечания: * – достоверные различия по отношению к группе Д ($p \leq 0,05$), # – достоверные различия групп Пл и ПКС по сравнению с группой ДКС ($p \leq 0,05$), &1 – достоверные различия между группой ДКС и Д ($p \leq 0,05$), &2 – достоверные различия между группой ПКС и Пл ($p \leq 0,05$).

Заживление язвенной поверхности к концу эксперимента отмечалось меньше в группе Пл – $3,52 \pm 1,14 \text{ см}^2$, что достоверно различно только по сравнению с группой ПКС $0,31 \pm 0,18 \text{ см}^2$ ($p \leq 0,05$). Схожая динамика заживления наблюдалась в период с 14 по 56 сутки во всех группах, после чего регистрировали рецидивирующее увеличение площади в группах Д, ПКС до 91 суток и в группе Пл до 112 дня. Максимальное увеличение площади поражения в этот период в группе Д выявлено на 45,3%, в группе ПКС на 5,7% и в группе Пл на 90,3%. Достоверные различия были отмечены в группе Пл по сравнению с группой Д на 14 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$); с группой ДКС в 14, 35 и с 49 по 70 сутки эксперимента ($p \leq 0,05$). В группе ПКС достоверные различия наблюдали в 21 и 28 сутки эксперимента по сравнению с группой Д ($p \leq 0,05$); также на 14, 21 и с 49 по 63 сутки в сравнении с группой ДКС (Рисунок 10, Таблица 12).

Таким образом, наибольшее сокращение язвенной поверхности кожи, образованной в результате воздействия ионизирующего излучения к 112 дню наблюдали в группах ДКС – 85,7%, Д – 87%. Заживление язвенной поверхности в группах Д и ДКС проходило аналогично как в группе положительного контроля – КС, в которой сокращение раневой поверхности было на 80%. Различная динамика заживления площади повреждения в группах КС, Д и ДКС возможно связана с рецидивирующими процессами МЛП, которые были менее выражены, чем в других группах (К, ДК, ДКС, Пл). Увеличение и уменьшение площади язвенной поверхности в середине исследования наблюдали и в группе ПКС (с 56

по 77 сутки), однако к концу эксперимента отмечали максимальное сокращение площади по сравнению с остальными группами – на 95,4%. В группах ДК, ДККС и Пл отмечалось сокращение площади язвенной поверхности на 60,2%, 50,4% и 43,1%, соответственно. Язвенная поверхность в группе К сократилась на 67,4%.

При этом количество животных с полностью зажившим язвенным дефектом на 112 сутки составило 0% в группе К и ДК, 20% в группах ДКС, ДККС и Пл, по 40% животных в группах КС и ПКС, а в группе Д количество животных с полностью зажившим ожогом составило 60%.

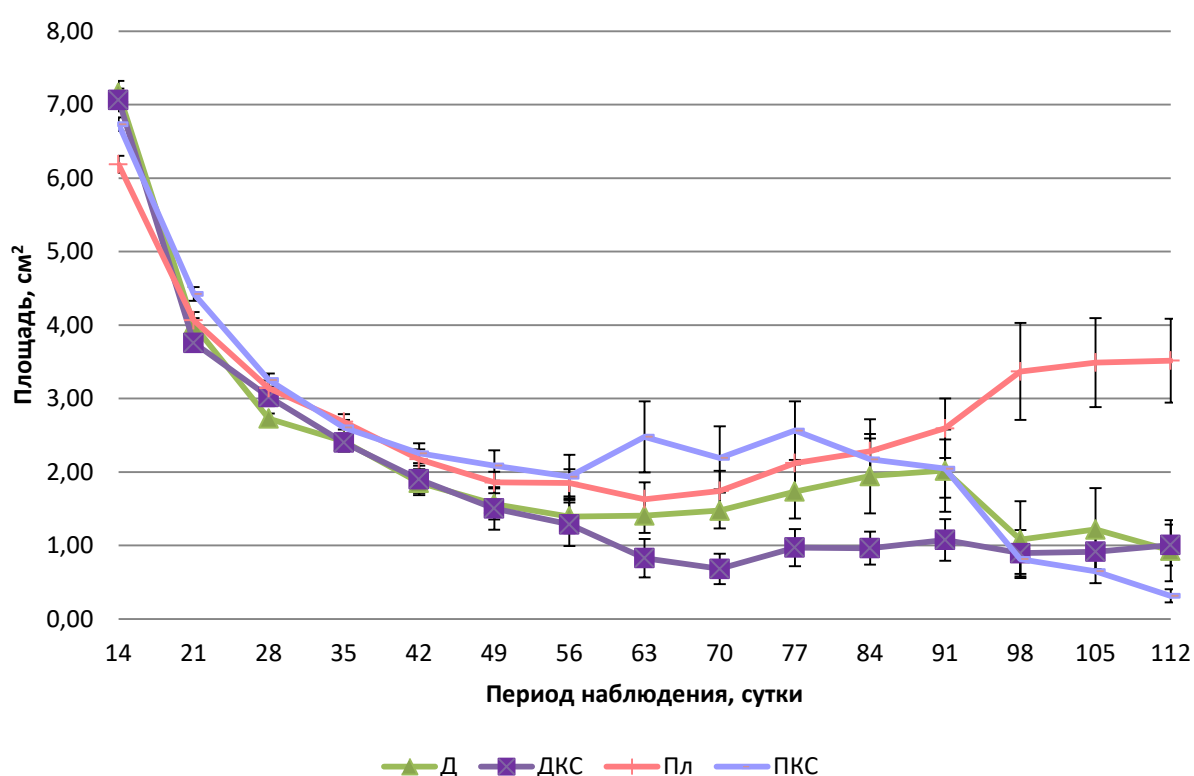


Рисунок 10 – Динамика развития язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах Д, ДКС, Пл, ПКС

Таблица 12 – Площадь язвенной поверхности кожи животных при МЛП в группах Д, ДКС, Пл и ПКС, см²

Сутки	Д	ДКС	Пл	ПКС
14	7,16±0,32#	7,06±0,31#	6,19±0,23*	6,73±0,18#
21	4,00±0,20#	3,76±0,22#	4,07±0,22#	4,42±0,19#
28	2,73±0,14*#	3,02±0,25#	3,14±0,20	3,25±0,18*

Продолжение таблицы 12

Сутки	Д	ДКС	Пл	ПКС
35	2,42±0,21#	2,40±0,25#	2,68±0,21#	2,60±0,21*
42	1,85±0,33#	1,90±0,37#	2,17±0,27	2,25±0,27
49	1,57±0,42#	1,50±0,58*	1,86±0,29#	2,09±0,42#
56	1,39±0,45*#	1,29±0,59*	1,85±0,37#	1,94±0,59#
63	1,41±0,47*	0,83±0,52*	1,63±0,46#	2,48±0,96#
70	1,47±0,49*	0,68±0,41*	1,74±0,55#	2,19±0,86
77	1,74±0,74	0,97±0,50*	2,12±0,86	2,56±0,80
84	1,95±1,02*	0,96±0,45*	2,28±0,87	2,17±0,69
91	2,02±1,12	1,08±0,57*	2,60±0,81	2,05±0,80
98	1,08±1,04*	0,90±0,63*	3,37±1,32	0,82±0,40
105	1,22±1,13	0,92±0,47*	3,49±1,21	0,65±0,32
112	0,93±0,83*	1,01±0,56	3,52±1,14	0,31±0,18 &2
% сокращения 14/112 сутки	87	85,7	43,1	95,4

Примечания: * – достоверные различия по отношению к группе Д ($p \leq 0,05$), # – достоверные различия групп Пл и ПКС по сравнению с группой ДКС ($p \leq 0,05$), &2 – достоверные различия между группой ПКС и Пл ($p \leq 0,05$).

3.2 Исследование гистологических особенностей регенерации кожного покрова при МЛП

В норме без патологии биоптат кожи лабораторных животных при гистологическом исследовании представляет собой полнотканый фрагмент кожи лабораторных животных представляет собой биоптат с подлежащей подкожной мышцей обычного гистологического строения, с сохраненным количеством волосяных фолликулов в дерме (Рисунок 11). При гистологическом исследовании.

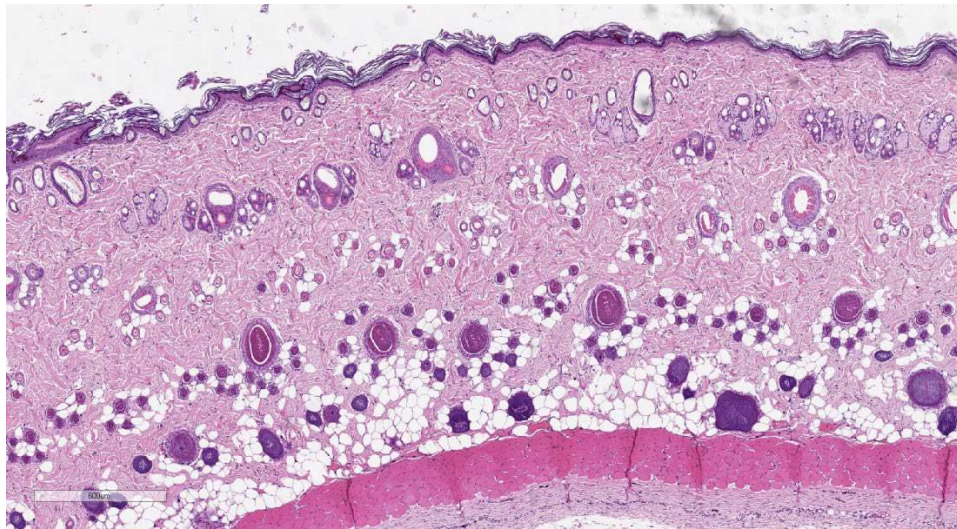


Рисунок 11 – Гистологическое исследование биоптата кожи животных без патологии. Окраска гемотоксилин-эозином, увеличение $\times 40$.

28 сутки исследования

На 28 сутки во всех группах после облучения формировался открытый раневой дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой. В подлежащей дерме в области дна дефекта определялась слабая, преимущественно периваскулярная лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация с примесью единичных нейтрофильных гранулоцитов и умеренно выраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. По краям раневого дефекта отмечалось умеренное утолщение прилежащего неповрежденного эпидермиса толщиной в 6-7 слоев эпителиоцитов с признаками вакуольной дистрофии во всех исследуемых группах. Отличительной чертой группы ДКС являлось утолщение в 5-6 слоев, а в группе К в 11-12 слоев эпителиоцитов. Также регистрировались немногочисленные внутриэпидермальные лимфоциты.

В группе ДКС отмечался очаговый фиброз дермы и очаговый гиперкератоз с отсутствием волосяных фолликул. В результате гистологического исследования в образцах группы ДККС обнаружено «наполнение» регенерирующего эпителия с краев раны в виде полосы толщиной в 1-2 эпителиоцита; в группе ДК тоже отмечали участки регенерирующего эпителия толщиной в 1-2 эпителиоцита, но лишь в 1 образце из 3. Полосу регенерирующего эпителия толщиной в 1-3 эпителиоцита в краях раневого дефекта обнаружили в группе КС, а также в

группе Пл, но в виде небольших участков. Толщина регенерирующего пласта в группах Д и ПКС составила 1-4 эпителиоцита, в группах К и ДКС не было обнаружено участков регенерации по краям раневого дефекта (Рисунок 12).

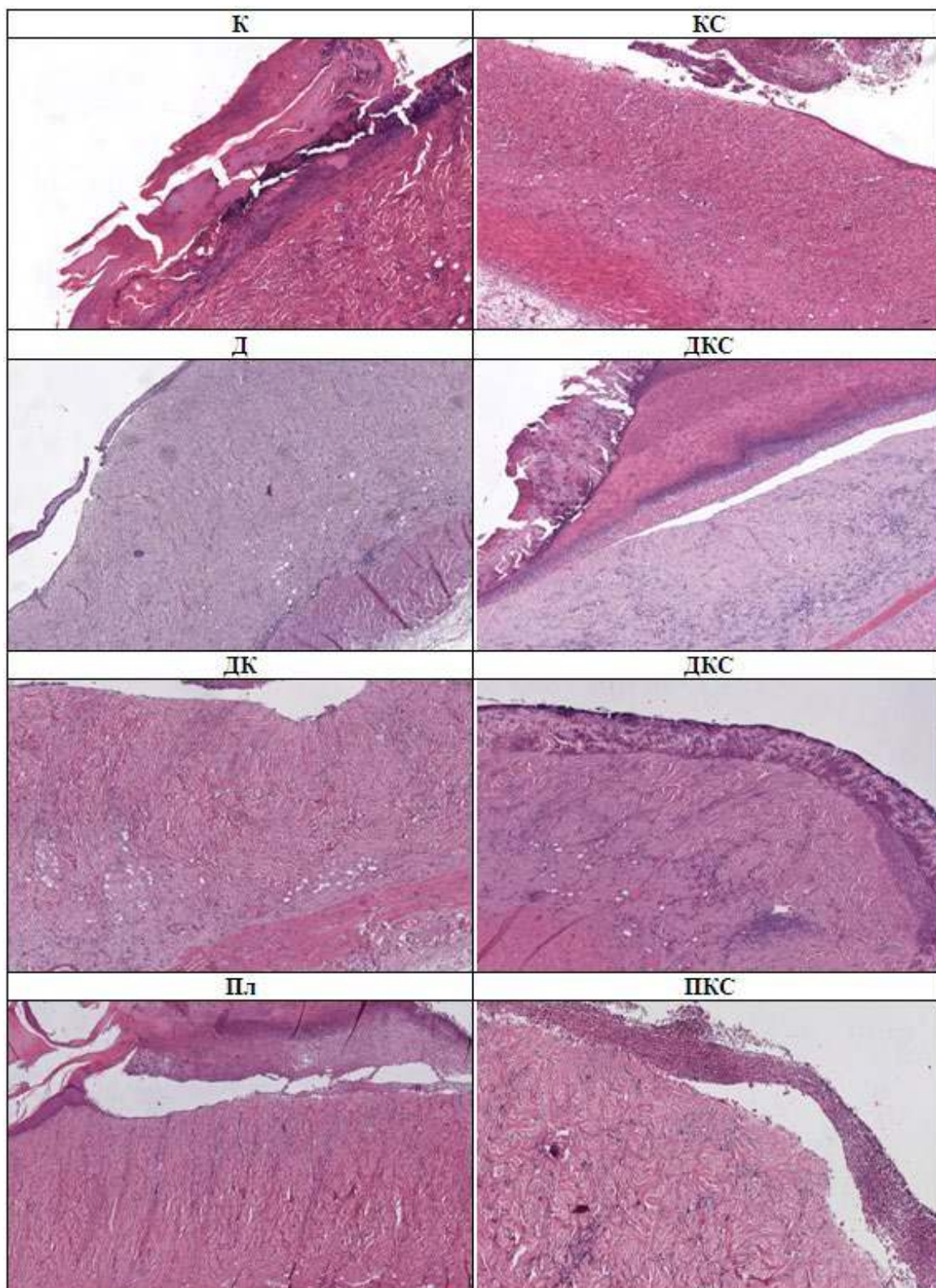


Рисунок 12 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных на 28 сутки.

Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$

На 56 сутки эксперимента в группе К наблюдали обширный дефект кожи, достигающий до большой подкожной мышцы, и покрытый гнойно-некротической корочкой. В области дна дефекта обнаружена мышечная ткань с участками фиброзирования и умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией. В краях дефекта фиброзированная соединительная ткань с лимфо-гистиоцитарной с примесью нейтрофилов инфильтрацией и умеренной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. Прилежащий к раневому дефекту эпидермис утолщен до 10-12 слоев клеток. Отмечали очаговый гиперкератоз, акантоз с дегенеративными изменениями кератиноцитов. В области краев дефекта определяли участки регенерации эпителия толщиной в 4-8 эпителиоцита (Рисунок 13).

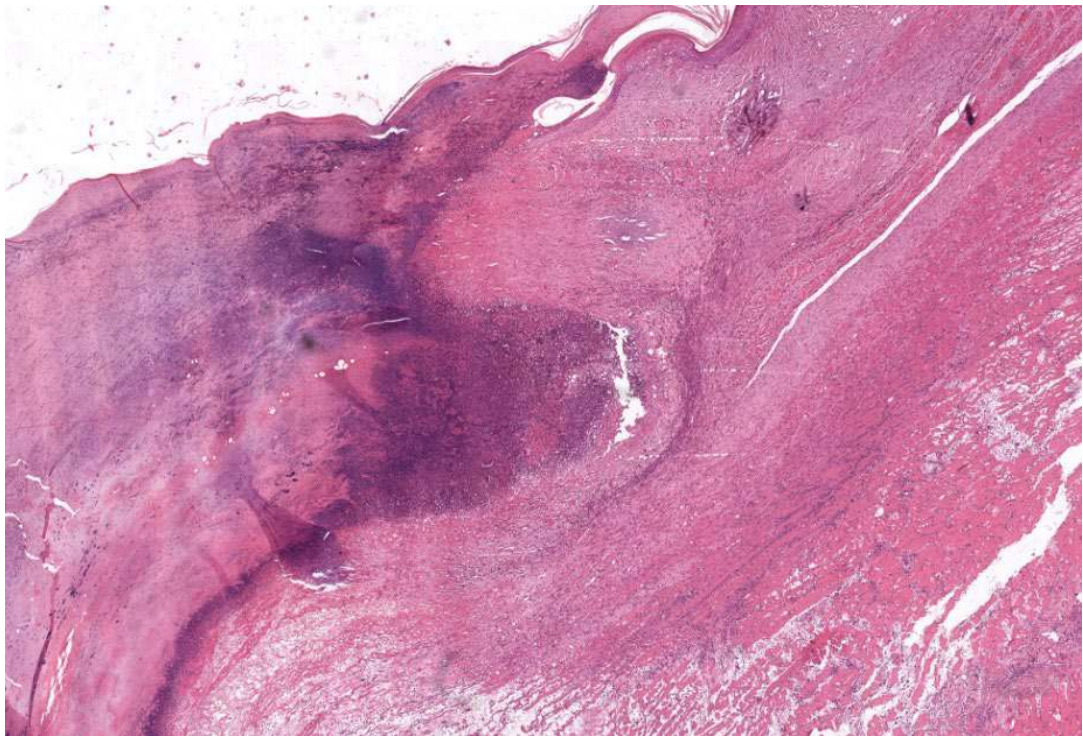


Рисунок 13 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе К на 56 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 20$

В 2/3 образцов группы КС на 56 сутки дефект кожи был полностью эпителизирован, толщина пласта от 5 до 8 клеток. Подлежащая дерма фиброзирована, фиброз дермы более выражен в субэпителиальных отделах со

слабой периваскулярной лимфоцитарной инфильтрацией. Большая подкожная мышца обычного гистологического строения. Подкожно-жировая клетчатка либо фиброзирована, либо с явлениями отека и слабой, либо очаговой лимфоцитарной инфильтрацией. В 1/3 образцов дефект кожи доходил до подкожно-жировой клетчатки, покрытый сверху гнойно-некротической корочкой. Большая подкожная мышца также была обычного гистологического строения с умеренным отеком. Жировая клетчатка в области дна дефекта с выраженным отеком, лимфо-плазмоцитарной с примесью нейтрофильных гранулоцитов инфильтрацией. Прилежащий эпидермис утолщен (до 10-11 слоев клеток) с признаками вакуольной дистрофии (Рисунок 14).

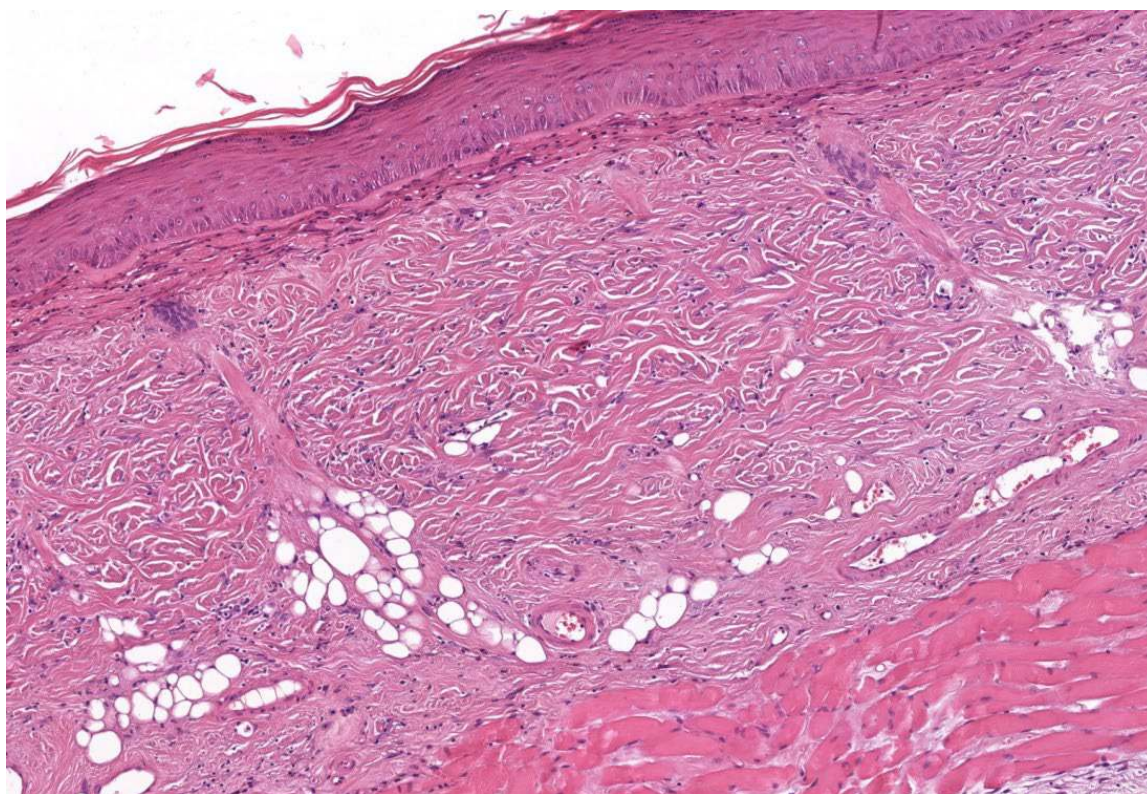


Рисунок 14 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе КС на 56 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 100$

В группе Д также сохранялся обширный раневой дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой. Соединительная ткань дермы в области дна дефекта с умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией, умеренной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла, процессами фиброзирования. Подкожно-

жировая клетчатка с явлениями отека и умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией. В области краев раневого дефекта определяются обширные участки «наползания» регенерирующего эпителия с краев раны толщиной в 2-5 эпителиоцитов. Прилежащий эпидермис умеренно утолщен (до 9-10 слоев клеток). В подлежащей дерме единичные волосяные фолликулы (1-2 в поле зрения $\times 20$) (Рисунок 15).

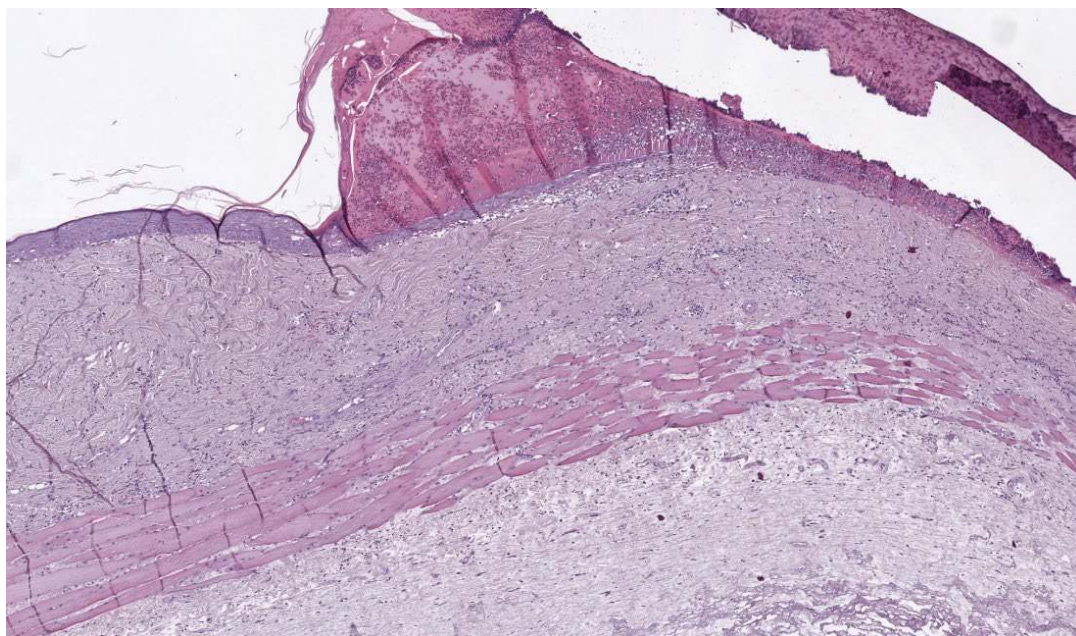


Рисунок 15 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе Д на 56 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$

В образцах группы ДКС в 56 сутки отмечался обширный дефект кожи. По краям эпидермис умеренно утолщен (5-6 слоев эпителиоцитов), регистрировали очаговый гиперкератоз. В поверхностных отделах дермы очаговая, умеренно-выраженная воспалительная лимфоцитарная инфильтрация, выраженный фиброз. Волосяные фолликулы немногочисленны, в зоне фиброза отсутствуют. Большая подкожная мышца обычного гистологического строения, либо с диффузной воспалительной инфильтрацией. В 1/3 образцов регистрировали отсутствие эпидермиса на большем протяжении за счет обширного дефекта. В поверхностных отделах дермы крупноочаговая выраженная воспалительная инфильтрация нейтрофилами и лимфоцитами, а также обширные зоны некроза дерма и подкожной мышцы (Рисунок 16).

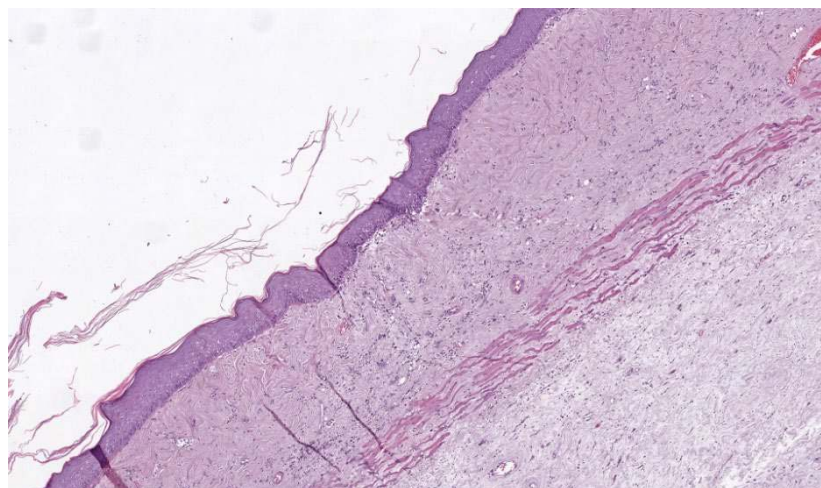


Рисунок 16 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе ДКС на 56 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 20$

В группе ДК в 2/3 образцов на 56 сутки дефект кожи был полностью эпителизирован. Толщина эпителиального пласта составляла от 5 до 7-8 клеток. Подлежащая дерма была фиброзирована. В глубоких отделах дермы, подкожной мышце и подкожно-жировой клетчатке – обширные очаги некрозов с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией и признаками абсцедирования. По периферии некротических изменений определялась соединительная ткань также с участками фиброзирования, отеками, инфильтрациями и выраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. В остальных образцах дефект кожи не был эпителизирован и доходил до подкожно-жировой клетчатки. Толщина прилежащего эпидермиса доходила до 10-12 слоев клеток (Рисунок 17).

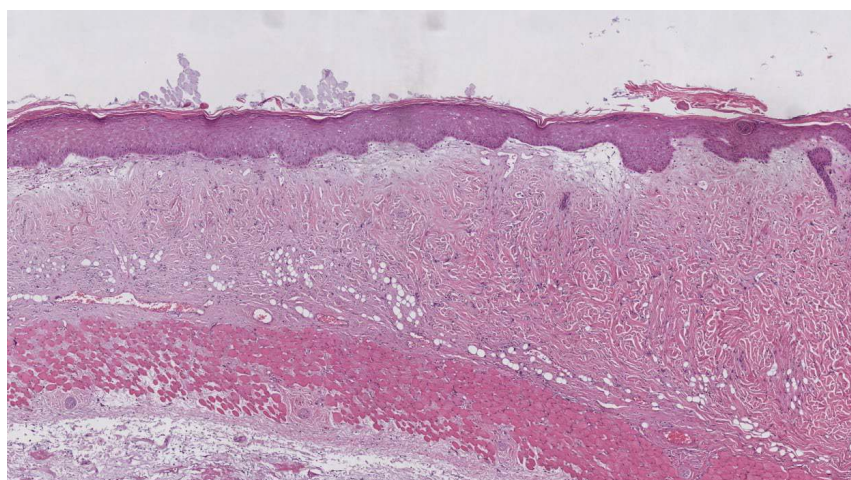


Рисунок 17 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе ДК на 56 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$

В половине образцов группы ДККС на 56 сутки дефект кожи был эпителизирован на большем протяжении. Подлежащая дерма, подкожная мышца и подкожно-жировая клетчатка были фиброзированы. В центре сохранялся небольшой дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой. В области дна дефекта – подкожная мышца и подкожно-жировая клетчатка с фиброзом и слабой лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией. У другой части образцов (1/2) сохранялся обширный раневой дефект, дно которого представлено некротизированной большой подкожной мышцей и прилежащим отделом жировой клетчатки; по периферии некротизированной ткани – соединительная ткань с участками фиброзирования, отеком, инфильтрациями с примесью нейтрофилов. Также отмечался очаговый гиперкератоз, акантоз и дегенеративные изменения кератиноцитов (Рисунок 18).

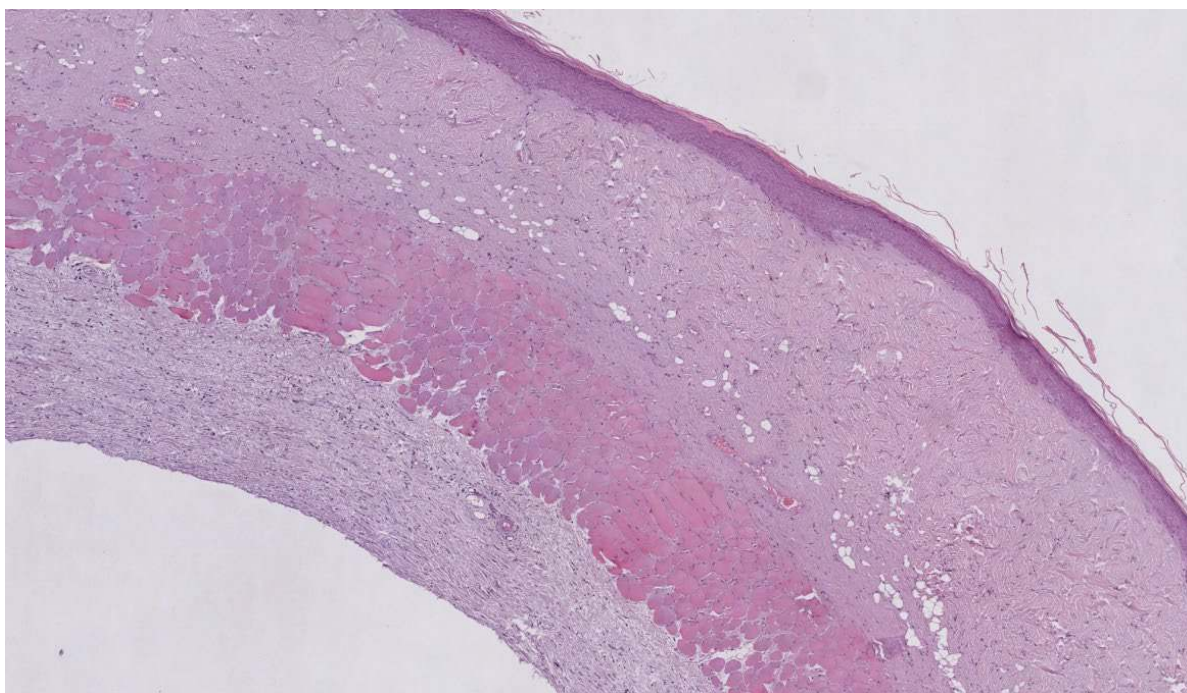


Рисунок 18 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе ДККС на 56 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$

В группе Пл на 56 сутки сохранялся обширный раневой дефект, дно которого в центральных отделах представлено некротизированной дермой, поперечнополосатой мышечной и подлежащей жировой тканями с выраженной нейтрофильной инфильтрацией (в отдельных случаях со скоплениями

микроорганизмов). В краях дефекта умеренная лимфо-плазмоцитарная инфильтрация с примесью нейтрофилов, умеренная пролиферация сосудов микроциркуляторного русла, грануляции. Прилежащий эпидермис умеренно утолщен (9-10 слоев клеток) с признаками вакуольной дистрофии (Рисунок 19).

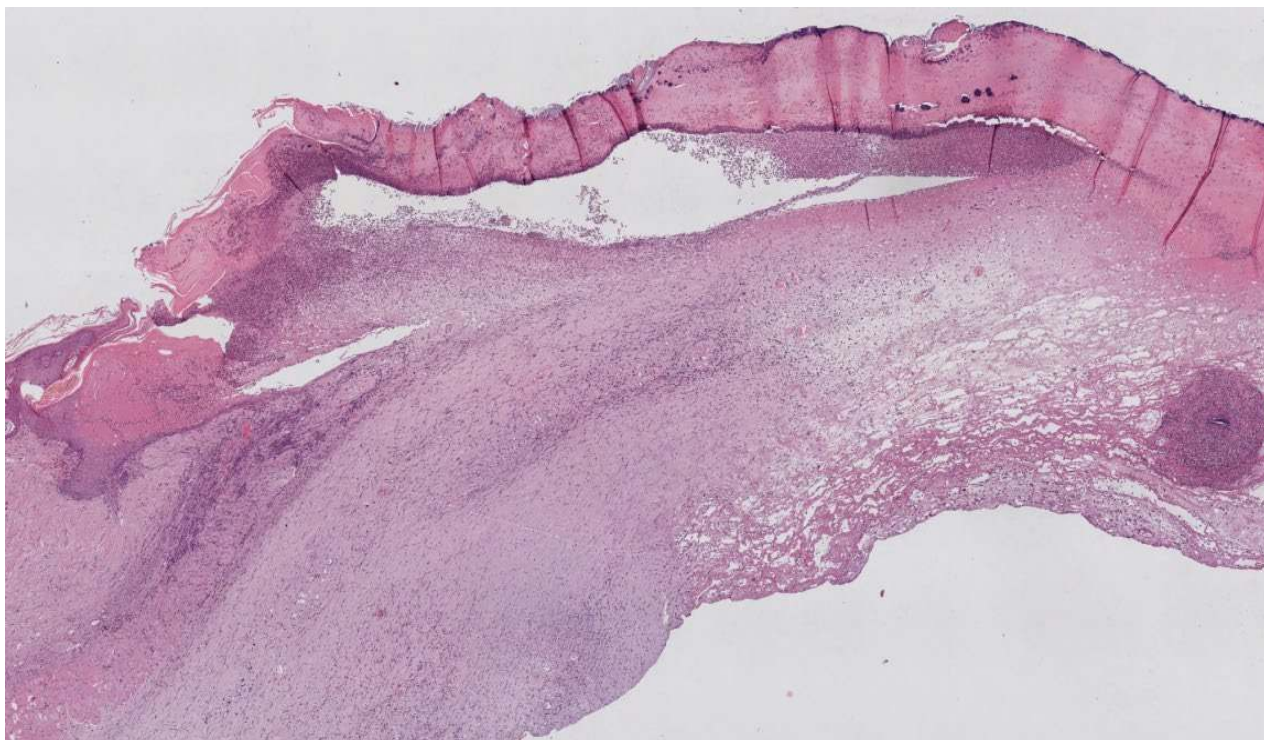


Рисунок 19 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе Пл на 56 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 20$

В группе ПКС на 56 сутки отмечали разнонаправленную динамику заживления. В 2/3 образцов сохранялся обширный дефект кожи. Дно дефекта было представлено некротизированной подкожной мышцей и прилежащими отделами подкожно-жировой клетчатки, либо мышечной и жировой тканью, которые были полностью замещены фиброзированной тканью с грануляциями. Соединительная ткань с умеренно выраженной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов и выражено пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. В отдельных случаях регистрировали очаговый гиперкератоз с дегенеративными изменениями кератиноцитов. прилежащий к раневому дефекту эпидермис был утолщен до 5-12 слоев эпителиоцитов. В 1/3 образцов дефект кожи был эпителизирован на большем протяжении, толщина

эпителиального пласта составила от 5 до 8 слоев клеток. Подлежащая дерма была умеренно фиброзирована с очаговым субэпителиальным отеком, наличием зачатков волосяных фолликулов в количестве 1-3 в поле зрения ($\times 10$). В центре дефекта – фиброзированная дерма со слабой лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией (Рисунок 20).

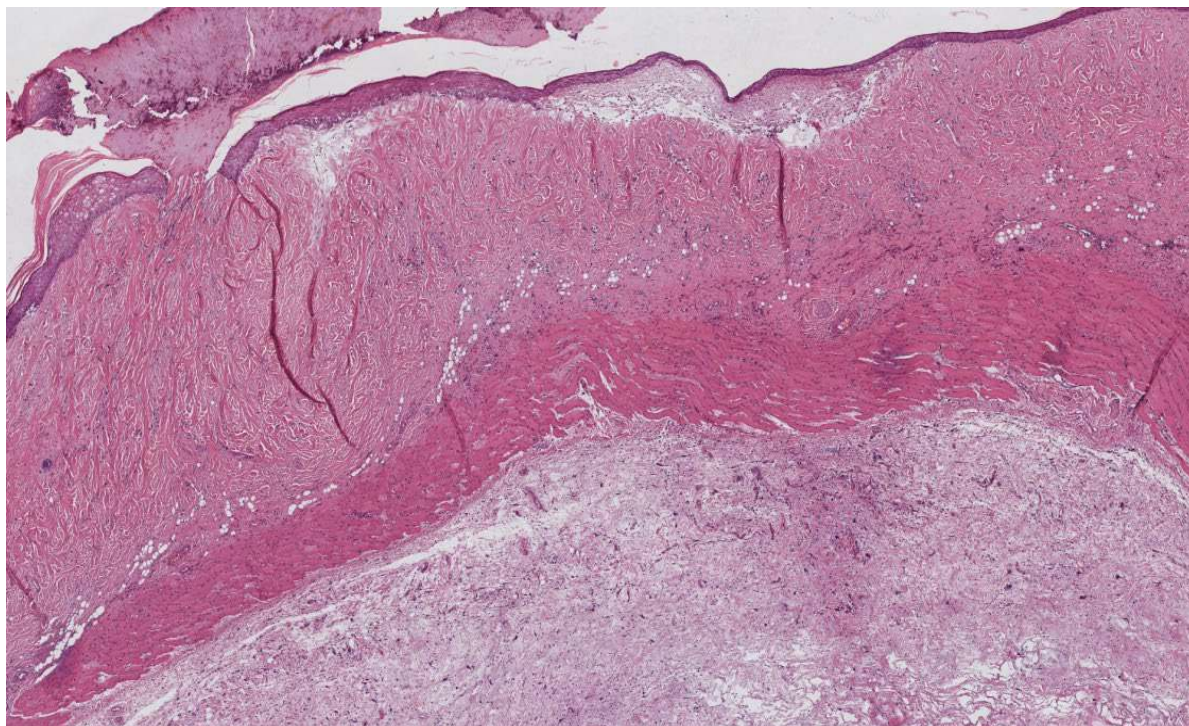


Рисунок 20 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе ПКС на 56 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 20$

112 сутки исследования

На 112 сутки в группе К в большинстве образцов сохранялся обширный раневой дефект кожи, в области дна дефекта – выраженные гнойно-некротические изменения. Подлежащая соединительная ткань с умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов, выраженными фиброзными изменениями, очаговым отеком и умеренно выраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. Большая подкожная мышца обычного гистологического строения с явлениями умеренного отека. В области краев раневого дефекта отмечали участки регенерации покровного эпителия

толщиной в 1-2 эпителиоцита. Прилежащий эпидермис умеренно утолщен до 6-7 слоев клеток, в некоторых случаях до 10-12 слоев клеток (Рисунок 21).

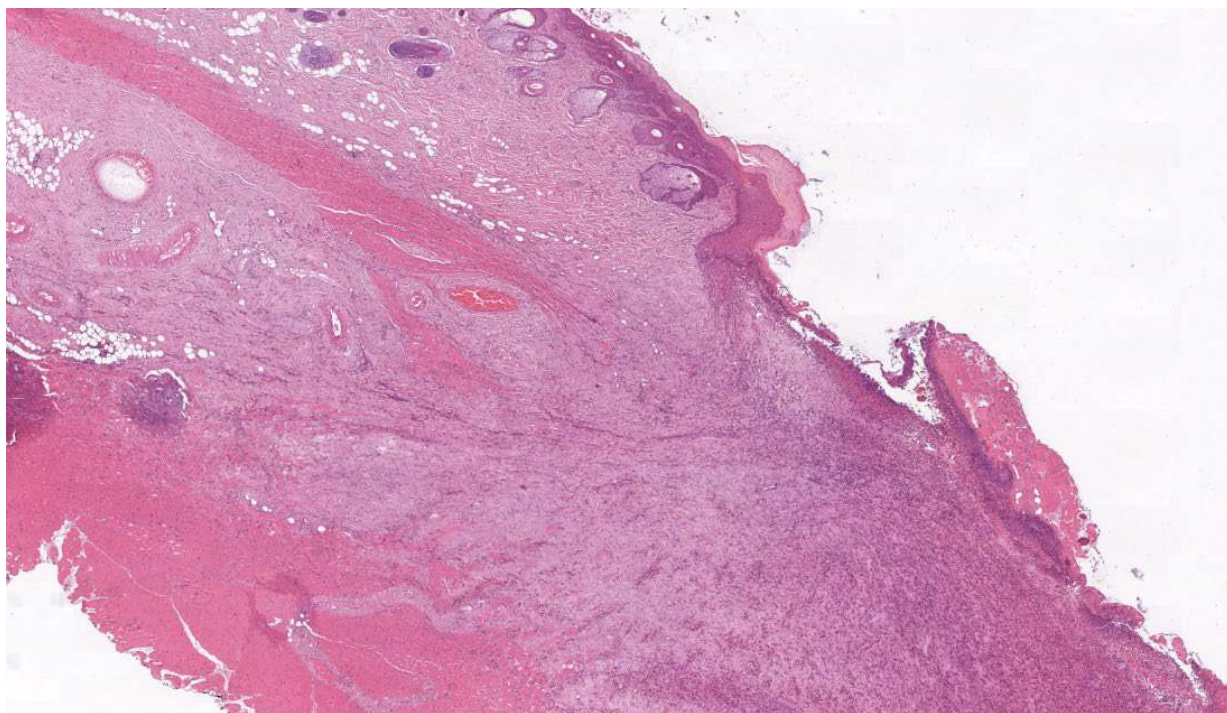


Рисунок 21 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе К на 112 сутки. Окраска гемотоксилин-эозином, увеличение $\times 20$

Дефект кожи в извлеченных биоптатах группы КС в 2/3 случаев на 112 сутки эксперимента был полностью или частично эпителизирован. В случаях полной эпителизации толщина эпителиального пласта составляла от 5 до 7 клеток. Подлежащая дерма была фиброзирована, фиброз более выражен в субэпителиальных отделах. В отдельных случаях с некрозами в поверхностных отделах и скоплениями гемоксидерофагов в более глубоких отделах. Большая подкожная мышца и подкожно-жировая клетчатка обычного гистологического строения с очаговым фиброзированием. Также отмечали зачатки волосяных фолликулов в количестве 1-3 в поле зрения ($\times 10$). В одном из образцов сохранялся обширный дефект кожи, достигающий до подкожно-жировой клетчатки, и покрытый гнойно-некротической корочкой. Жировая клетчатка в области дна дефекта с выраженными фиброзными изменениями, умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией с примесью немногочисленных нейтрофилов и

слабовыраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла и полнокровием капилляров (Рисунок 22).

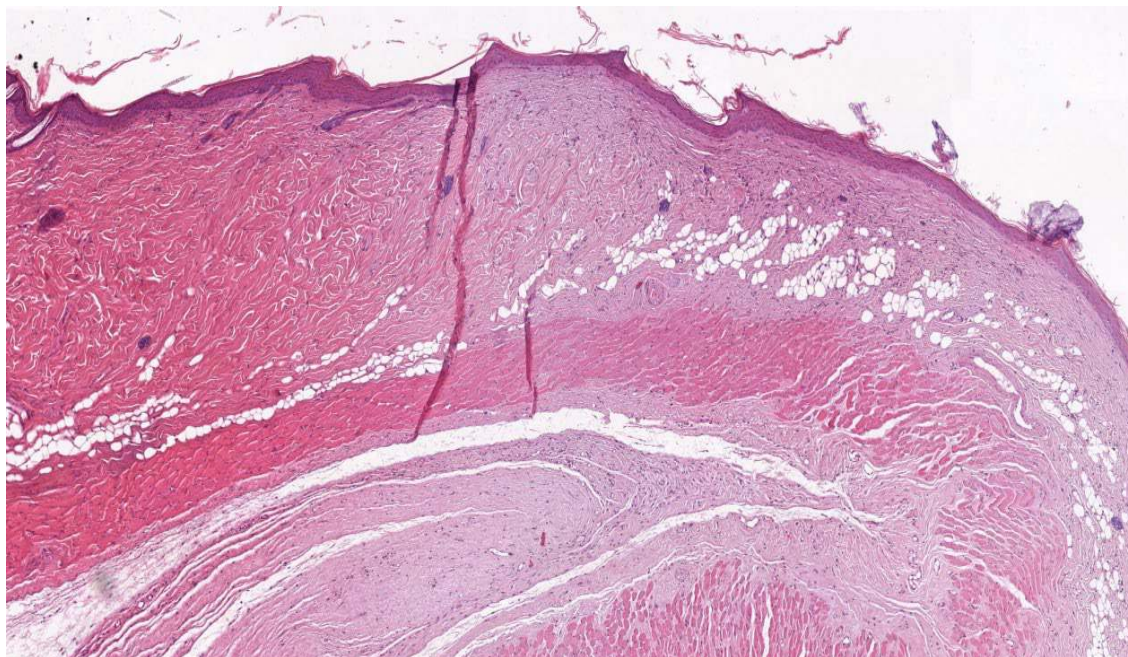


Рисунок 22 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе КС на 112 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$

В группе Д в последний сутки эксперимента дефект кожи был полностью или частично эпителизирован, толщина эпителиального пласта при это составляла от 5 до 7 слоев клеток. Подлежащая дерма фиброзирована, фиброз был более в субэпителиальных отделах. Имелись зачатки волосяных фолликулов в количестве от 2 до 4 в поле зрения ($\times 10$). Большая подкожная мышца и подкожно-жировая клетчатка обычного гистологического строения, либо полностью фиброзированы в центральных отделах, а ближе к периферии – обычного гистологического строения с мелкоочаговым фиброзированием. Воспалительные изменения отсутствовали. В 1/3 образцов дефект кожи был также частично эпителизирован с толщиной вновь образованного эпителиального пласта от 5 до 8 клеток, однако подлежащая дерма была со слабой периваскулярной лимфоцитарной инфильтрацией. В ней определялись волосяные фолликулы в количестве от 1 до 2 в поле зрения ($\times 20$). В центральных отделах – дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой. В подлежащей дерме определяли фиброз с умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией. Поперечнополосатая мышца в

центральных отделах была полностью фиброзирована, а ближе к периферии – обычного гистологического строения (Рисунок 23).

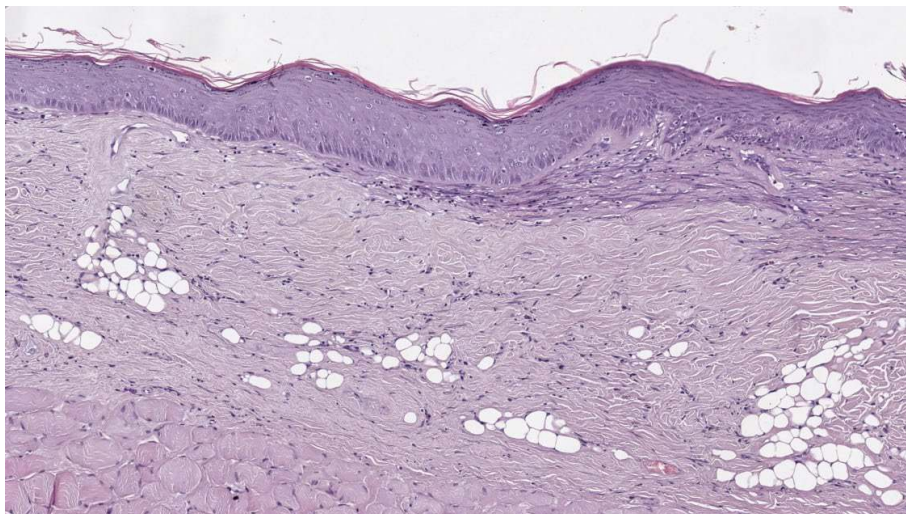


Рисунок 23 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе Д на 112 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 100$

В группе ДКС на 112 сутки эпидермис был очагово умеренно утолщен до 5-6 слоев клеток, регистрировали очаговый гиперкератоз. Сохранялся одиночный дефект эпидермиса, покрытый гнойно-некротической корочкой. В поверхностных отделах дермы наблюдали умеренно выраженную лимфоцитарную инфильтрацию с примесью нейтрофилов, микроабсцессы, зоны некроза дермы и подкожной мышцы, а также созревающие грануляции, умеренно выраженный фиброз, полнокровие капилляров и диапедезные кровоизлияния. Волосные фолликулы немногочисленны, без воспалительной инфильтрации. Большая подкожная мышца была обычного гистологического строения (Рисунок 24).

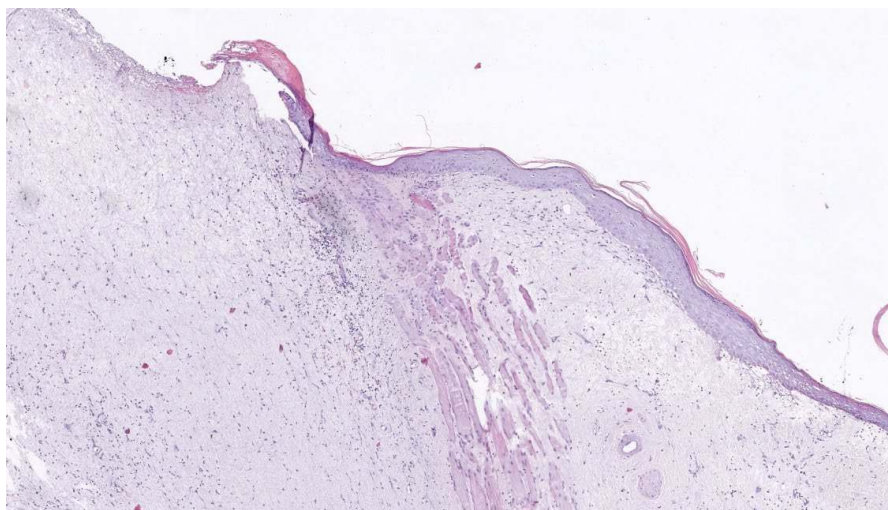


Рисунок 24 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе ДКС на 112 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$

Обширный дефект кожи, достигающий подкожно-жировой клетчатки наблюдали в 112 сутки в группе ДК. Сам дефект был покрыт гнойно-некротической корочкой и представлен некротизированной дермой, большой подкожной мышцей. Дно дефекта с выраженным отеком, по периферии некротизированной ткани – «ободок» из скоплений нейтрофилов и колоний микроорганизмов. Соединительная ткань с выраженной лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов, грануляциями и выраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. Прилежащий эпидермис был утолщен до 6-7 слоев клеток (в некоторых случаях до 10-12) с признаками выраженной дистрофии кератиноцитов и явлениями акантоза (Рисунок 25).

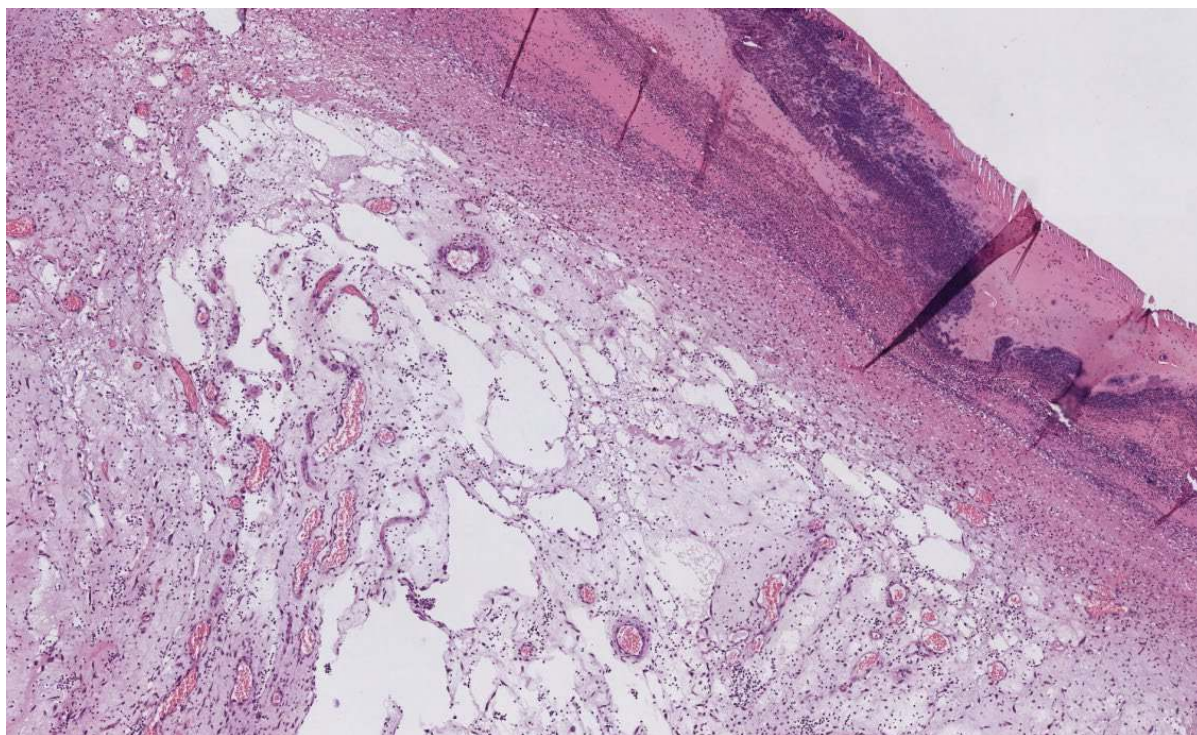


Рисунок 25 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе ДК на 112 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$

В группе ДККС на 112 сутки эксперимента в 2/3 образцов также сохранялся обширный раневой дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой и достигающий подкожно-жировой клетчатки. Дно и края раневого дефекта были представлены соединительной тканью и поперечнополосатой мышцей с процессами фиброобразования, грануляциями, выраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла и выраженной лимфо-плазматической инфильтрацией с примесью нейтрофилов. Прилежащий эпидермис был утолщен до 6-7 слоев клеток, с признаками выраженной дистрофии. В 1/3 образцов дефект кожи был полностью эпителизирован, толщина эпителиального пласта составляла от 5 до 8 слоев клеток. Подлежащая дерма с явлениями субэпителиального отека. В периферических отделах регистрировали зачатки волосяных фолликулов в количестве от 1 до 3 в поле зрения ($\times 10$). Большая подкожная мышца и подкожно-жировая клетчатка обычного гистологического строения с очаговым фиброзом. Воспалительные изменения отсутствовали (Рисунок 26).

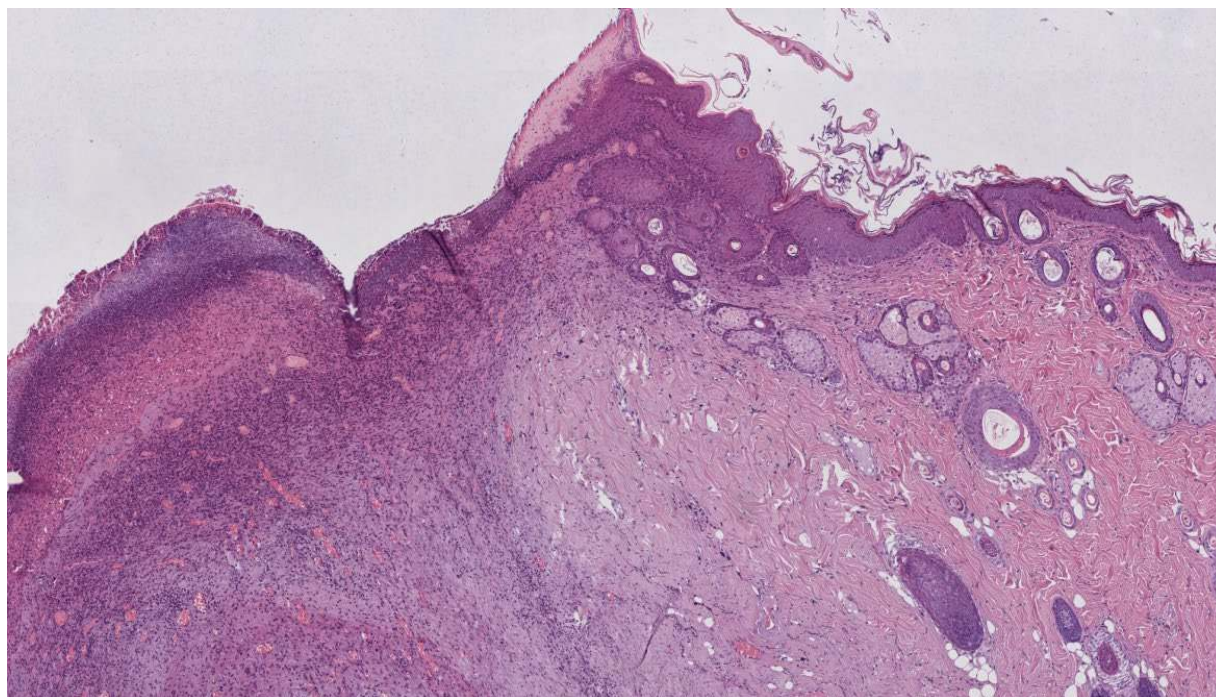


Рисунок 26 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе ДККС на 112 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$

В группе Пл в последний сутки эксперимента во всех образцах сохранялся обширный раневой дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой. Дно дефекта было представлено фиброзированной соединительной тканью с грануляциями, выраженной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией с примесью гранулоцитов, поперечнополосатая ткань в дне дефекта не определялась. Отмечали выраженную пролиферацию сосудов микроциркуляторного русла и обширные участки фиброза подкожно-жировой клетчатки. Эпидермис в краях раневого дефекта утолщен (до 8-10 слоев клеток), с признаками вакуольной дистрофии, пролиферацией волосяных фолликулов (Рисунок 27).

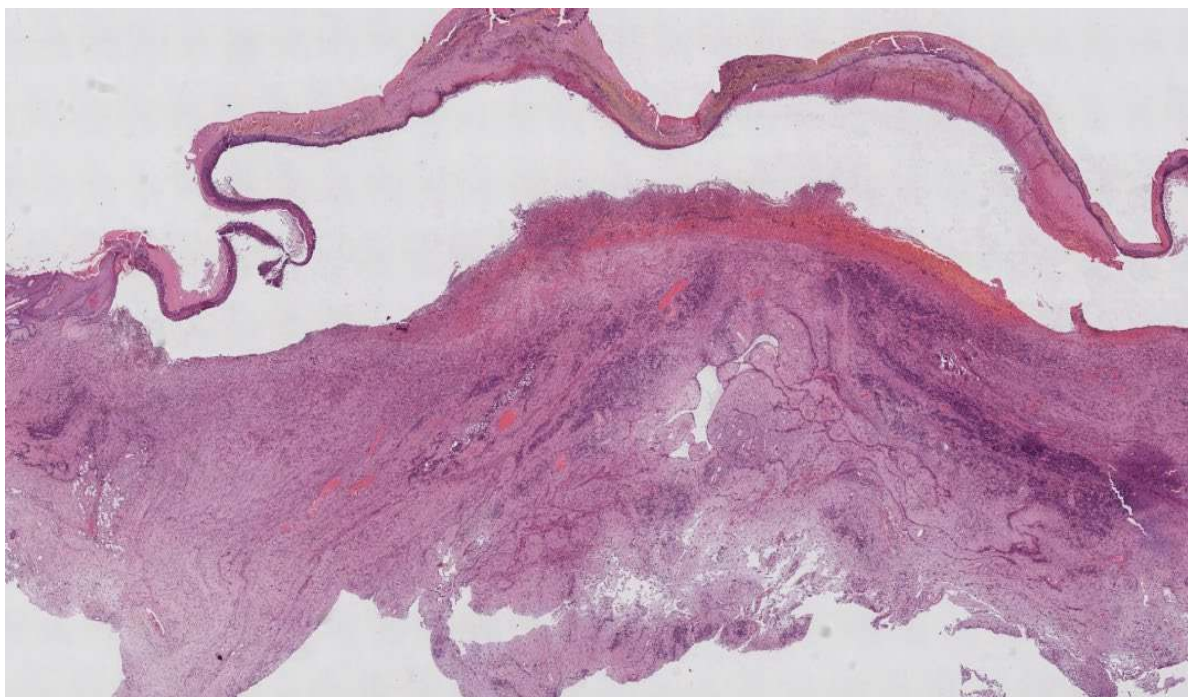


Рисунок 27 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе Пл на 112 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 10$

К 112 дню эксперимента в группе ПКС в 1/3 образцов сохранялся обширный раневой дефект, покрытый гнойно-некротической корочкой и достигающий подкожно-жировой клетчатки. Дно и края дефекта представлены соединительной тканью, жировой клетчаткой и поперечнополосатой мышечной тканью с фиброзами, умеренной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией и пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла. Прилежащий эпидермис утолщен (до 6-7 слоев клеток), с признаками выраженной дистрофии. Отмечали частичную эпителизацию раневого дефекта в области краев раны в виде вновь образованного эпителиального пласта в 3-4 эпителиоцита. В 2/3 образцов дефект кожи был полностью эпителизирован, толщина эпителиального пласта составила от 5 до 8 клеток. Подлежащая дерма была очагово фиброзирована. Имеются зачатки волосяных фолликулов от 1 до 3 в поле зрения ($\times 10$). Большая подкожная мышца и центральных отделах не определяется – замещена соединительной тканью. Воспалительные изменения отсутствовали (Рисунок 28).

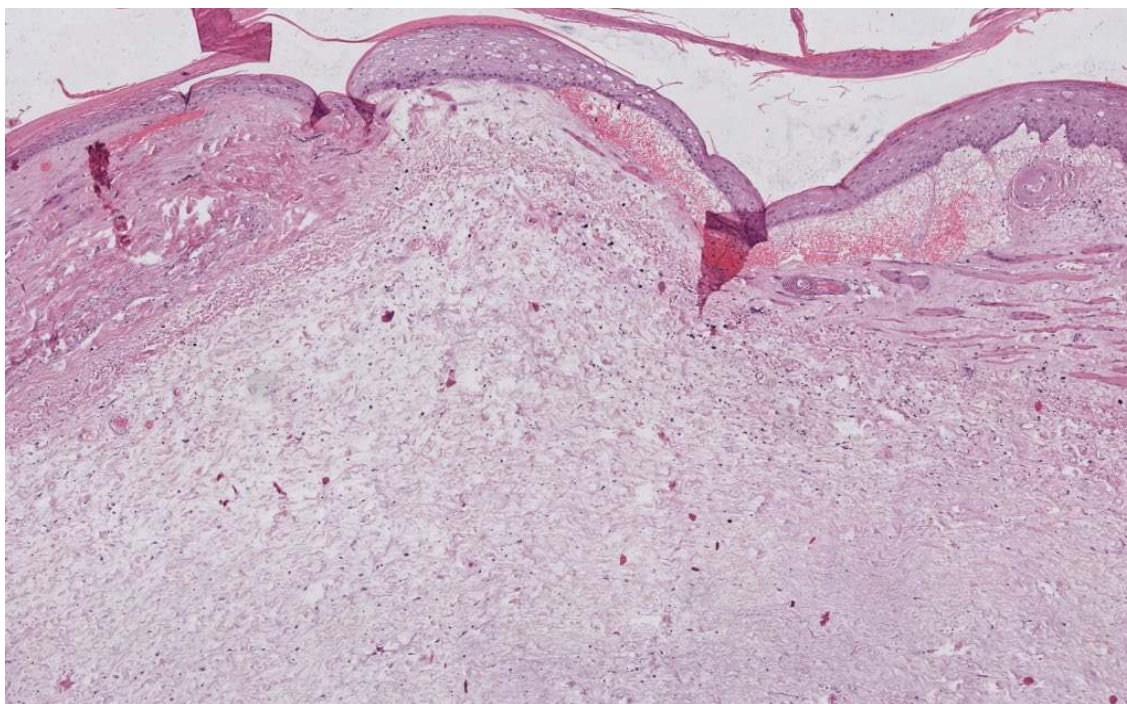


Рисунок 28 – Гистологическое исследование дефекта кожи животных в группе ПКС на 112 сутки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$

Таким образом, анализ гистологического исследования подтверждает полученные данные по эффективности применения проведенной терапии в группе ПКС.

3.3 Исследование иммуногистохимических особенностей регенерации кожного покрова при МЛП

Иммуногистохимический маркер CD31 – маркер, принимающий участие в процессах ангиогенеза, является прогностическим маркером вновь образованных сосудов. Также он опосредует адгезию клеток к эндотелиальным клеткам и способствует диапедезу фагоцитов – прохождению через эндотелиальную стенку сосудов в район развития воспалительной реакции. В результате иммуногистохимического исследования установлено, что количество вновь образованных сосудов, в эндотелиальных клетках которых определялась экспрессия CD31, статистически достоверно увеличивалась с 28 по 112 сутки только в группе ДК (с $5,53 \pm 0,9$ до $17,87 \pm 1,8$ ($p \leq 0,05$)), что свидетельствовало об усилении неоангиогенеза к концу эксперимента (Таблица 13).

Таблица 13 – Абсолютное количество маркеров ИГХ в образцах иссеченных тканей кожного дефекта кожи животных на 10 дней заживления

Маркер	День	К	КС	Д	ДКС	ДК	ДКС	Пл	ПКС
CD31	28	13,97±2,0	15,87±1,1	6,0±1,2	19,1±1,1	5,53±0,9	12,2±1,6	2,6±0,3	4,1±0,6
	112	17,47±1,3	13,1±1,8	12,75±2,1*	28,67±2,7	17,87±1,8*	12,53±2,4	10,97±1,7*	8,2±1,8
CD68	28	11,7±1,4	22,2±1,6	7,7±0,9	24,0±1,7	16,6±2,3	11,4±1,5	12,9±1,9	24,0±3,6
	112	24,7±2,4*	13,1±1,8	9,8±1,6	20,9±2,5	31,1±3,9*	25,7±3,9*	29,3±4,3*	24,8±4,1
PGP 9.5	28	1,97±0,3	1,97±0,3	1,87±0,4	2,03±0,4	2,6±0,4	1,83±0,3	2,65±0,5	2,77±0,5
	112	6,47±1,1*	5,7±1,0*	4,40±0,9*	3,03±0,8	2,7±0,5	2,6±0,4*	4,63±0,8	4,0±0,9
FVIII стромы	28	7,87±1,8	8,0±1,8	9,0±1,4	17,5±2,6	10,7±1,6	10,17±1,5	6,80±1,3	10,97±2,3
	112	15,83±2,0	7,03±1,1	8,87±1,5	14,67±1,8	22,47±3,4	14,37±3,1	16,07±2,2	10,17±1,6
FVIII сосуды	28	5,3±0,9	5,80±1,1	6,23±1,4	8,03±0,9	5,53±0,9	12,7±1,6	2,55±0,6	4,0±0,7
	112	10,87±1,5*	11,5±1,7*	7,93±1,6	21,63±3,0*	14,13±2,1*	10,9±2,4	9,03±1,5	7,57±1,6
Ki67+ стромы	28	5,33±0,5	12,0±3,1	6,56±1,2	9,56±2,0	3,11±0,3	3,11±0,3	2,83±0,3	4,67±0,6
	112	26,11±2,8*	27,56±5,7	23,22±2,9*	7,33±2,0	12,67±1,0*	15,0±3,8*	13,11±2,0	12,78±3,6
Ki67+ сосуды	28	2,33±0,3	2,67±0,6	2,22±0,3	1,89±0,4	1,22±0,1	1,67±0,2	1,33±0,2	2,11±0,3
	112	11,78±0,8*	8,22±1,7	5,56±1,3	1,78±0,4*	2,44±0,3	2,11±0,3	4,0±1,3	4,33±1,5

Примечание: * – наличие статистически достоверных различий между 28 и 112 днем эксперимента внутри группы, $p \leq 0,05$.

К концу эксперимента отмечали статистически достоверное увеличение клеток макрофагального ряда в тканях, окружающих язвенный дефект, отмеченных маркером CD68, в группах К и ДК (с $11,7 \pm 1,4$ до $24,7 \pm 2,4$ и с $16,6 \pm 2,3$ до $31,1 \pm 3,9$, соответственно ($p \leq 0,05$)) (Таблица 13).

Определяли и количество FVIII-меченных клеток в строме и сосудах. FVIII – маркер, используемый для дифференцировки эндотелиальных клеток. Усиление экспрессии данного антигена может происходить из окружающей крови, особенно при геморрагических и сосудистых поражениях. В ходе исследования не было отмечено достоверных различий между 28 и 112 днем эксперимента в количестве FVIII-меченных клеток в строме, однако отмечали достоверные различия в сосудах. Так происходило увеличение количества FVIII-меченных клеток в группах К (с $5,53 \pm 0,9$ до $10,87 \pm 1,5$ ($p \leq 0,05$)), КС (с $5,80 \pm 1,1$ до $11,5 \pm 1,7$ ($p \leq 0,05$)), ДКС (с $8,03 \pm 0,9$ до $21,63 \pm 3,0$ ($p \leq 0,05$)) и ДК (с $5,53 \pm 0,9$ до $14,13 \pm 2,1$ ($p \leq 0,05$)).

Количество вновь образованных немиелинизированных нервных волокон в коже, экспрессирующих маркер PGP 9.5, к концу эксперимента увеличилось в группах К (с $1,97 \pm 0,3$ до $6,47 \pm 1,1$ ($p \leq 0,05$)), КС (с $1,97 \pm 0,3$ до $5,70 \pm 1,0$ ($p \leq 0,05$)), Д (с $1,87 \pm 0,4$ до $4,40 \pm 0,9$ ($p \leq 0,05$)) и ДККС (с $1,83 \pm 0,3$ до $2,60 \pm 0,4$ ($p \leq 0,05$)).

Пролиферативную активность клеток стромы и эндотелия сосудов определяли с помощью уровня экспрессии маркера пролиферации Ki67 – ядерного белка, который экспрессируется во всех активных фазах клеточного деления, но отсутствует в покоящихся клетках. В ходе эксперимента в сосудистом эндотелии выявлено достоверное постепенное увеличение количества Ki67+ пролиферирующих клеток в группах К (с $2,3 \pm 0,3$ до $11,78 \pm 0,8$ ($p \leq 0,05$)), ДК (с $1,22 \pm 0,1$ до $2,44 \pm 0,3$ ($p \leq 0,05$)). В строме число клеток, содержащих в себе Ki67+ увеличивалось с 28 по 112 сутки эксперимента в группах К (с $5,33 \pm 0,5$ до $26,11 \pm 2,8$ ($p \leq 0,05$)), Д (с $6,56 \pm 1,2$ до $23,22 \pm 2,9$ ($p \leq 0,05$)), ДК (с $3,11 \pm 0,3$ до $12,67 \pm 1,0$ ($p \leq 0,05$)), ДККС (с $3,11 \pm 0,3$ до $15,0 \pm 3,8$ ($p \leq 0,05$)).

Следующие маркеры иммуногистохимического исследования оценивали полуколичественно в баллах от 0 до 3, где 0 – отсутствие экспрессии, а 3 – выраженная экспрессия (Таблица 14).

Таблица 14 – Оценка экспрессии маркеров ИГХ в образцах иссеченных тканей кожного дефекта кожи животных

Маркер	День	К	КС	Д	ДКС	ДК	ДКС	Пл	ПКС
Collagen I	28	1,0±0,0	1,33±0,33	1,0±0,0	2,0±0,0	1,33±0,33	1,33±0,33	1,0±0,0	1,33±0,33
	112	2,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0	2,33±0,33	2,67±0,00	2,33±0,33	1,33±0,33	2,0±0,58
Collagen III	28	2,67±0,33	2,0±0,0	2,67±0,33	3,0±0,0	3,0±0,33	2,67±0,33	2,50±0,5	2,33±0,33
	112	2,33±0,33	1,33±0,33	1,67±0,33	2,0±0,0	2,0±0,58	1,67±0,33	2,0±0,58	2,33±0,33
VEGF эндотелий	28	2,67±0,33	2,33±0,33	1,67±0,33	2,67±0,33	2,33±0,67	2,0±0,33	2,5±0,5	2,0±0,0
	112	2,0±0,33	1,33±0,33	2,33±0,33	2,67±0,33	2,67±0,33	2,0±0,33	2,0±0,0	1,33±0,33
VEGF строма	28	2,33±0,33	2,0±0,0	1,0±0,0	2,67±0,33	1,67±0,33	1,33±0,33	2,0±0,0	1,0±0,0
	112	1,33±0,33	1,0±0,0	1,67±0,33	2,0±0,33	2,33±0,67	2,67±0,33	1,33±0,33	1,0±0,0
TIMP 2	28	1,0±0,0	1,33±0,33	1,67±0,33	1,33±0,33	1,67±0,33	2,00±0,00	2,0±0,0	1,33±0,3
	112	2,33±0,0	2,0±0,0	2,33±0,33	2,0±0,58	2,67±0,33	2,0±0,58	0,67±0,33	1,33±0,3
MMP 2	28	3,0±0,0	3,0±0,0	2,0±0,0	3,0±0,0	2,33±0,33	2,67±0,33	2,5±0,5	1,0±0,0
	112	2,33±0,33	2,0±0,0	2,33±0,33	1,33±0,33	2,67±0,33	3,0±0,00	2,33±0,67	2,33±0,33
MMP 9	28	3,0±0,0	2,33±0,33	2,0±0,58	3,0±0,0	2,67±0,33	3,0±0,00	3,0±0,0	1,67±0,33
	112	1,67±0,7	1,0±0,0	1,33±0,33	1,67±0,67	1,67±0,33	1,67±0,33	2,33±0,33	2,33±0,33

Примечание: маркеры ИГХ оценивали полуколичественно в баллах от 0 до 3, где 0 – отсутствие экспрессии, а 3 – выраженная экспрессия

Так удалось установить, что уровень экспрессии Ag к Collagen I типа увеличивался с 28 по 112 сутки во всех группах, при этом уровень экспрессии Collagen III типа уменьшался между 28 и 112 днем эксперимента во всех группах за исключением группы ПКС, в которой выраженность экспрессии оставалась неизменной.

Интенсивность экспрессии VEGF в эндотелиальных клетках сосудов уменьшался к 112 суткам в группах К, КС, Пл и ПКС; увеличивалась в группах Д, ДК, ДККС и оставалась неизменной в группе ДКС. Экспрессия маркера VEGF в строме также уменьшалась в группах К, КС, Пл и в группе ДКС. В группе Д, ДК, ДККС отмечали повышение экспрессии, а в группе ПКС не отмечалось изменений в уровне экспрессии.

Выраженность экспрессии TIMP в клетках увеличивалась к 112 дню в группах К, КС, Д, ДКС, ДК и уменьшалась в группе Пл. Уровень экспрессии в группах ДККС и ПКС в 28 и 112 сутки эксперимента оставался неизменным.

При оценке интенсивности экспрессии MMP 2 типа отмечали ее снижение к концу эксперимента в группах К, Кс, ДКС, Пл, увеличение экспрессии происходило в группах Д, ДК, ДККС и группе ПКС. При этом уровень экспрессии MMP 9 типа снижался во всех группах кроме ПКС, где отмечали повышение уровня экспрессии.

Таким образом, анализ иммуногистохимического исследования показал, что применение МСК слизистой десны человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения, приводит к улучшению васкуляризации увеличение экспрессии VEGF в сравнении с другими группами; применение концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека при МЛП у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения приводит к ускоренному рубцеванию и заживлению язвенной поверхности – увеличение экспрессии металлопротеиназ (MMP 2 и 9), TIMP 2, коллагена I и III типа, $p < 0,05$. Применение мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны крысы, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой десны крысы,

мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека и отсутствие терапии в группе контроль при местных лучевых поражениях с 21 суток до 112 дня после облучения приводит к увеличению воспалительного процесса – увеличение маркера клеток макрофагального ряда CD68 в тканях с $12,9 \pm 1,9$ до $29,3 \pm 4,3$; с $11,7 \pm 1,4$ до $24,7 \pm 2,4$; с $11,4 \pm 1,5$ до $25,7 \pm 3,9$; с $16,6 \pm 2,3$ до $31,1 \pm 3,9$; соответственно, $p < 0,05$).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Местные лучевые поражения кожи, описанные в 1895 г. являются первым выявленным видом радиационных поражений человека и на протяжении многих десятилетий представляют собой серьёзную медицинскую, социальную и экономическую проблему, связанную с радиационно-индуцированными кожными реакциями. Ранние эффекты повреждения кожи от ионизирующего излучения (сухой и влажный дерматит) связывают с повреждением эпидермиса, а поздние эффекты (атрофия кожи, лучевые некрозы и др.) являются следствием повреждения дермы [199]. Лучевой мишенью эпидермиса являются высоко радиочувствительные клетки базального слоя, а в дерме – сосуды микроциркуляторного русла. Вследствие этого, при глубоких лучевых ожогах некротические и дегенеративные процессы охватывают все слои кожи, распространяясь постепенно на глубжележащие ткани, вплоть до костных. Применение клеточной терапии направлено на восстановление погибших базальных клеток, волосяных фолликулов и фибробластов, снижение воспалительных процессов в дерме, привлечение собственных клеток организма в очаг поражения для регенерации поврежденной ткани за счет цитокинов МСК [18, 226].

Заживление МЛП является важным процессом восстановления кожи после облучения и включает в себя сложные и динамичные последовательные стадии: воспалительная, пролиферативная, созревания/ремоделирования. Чаще МЛП кожи представляет собой хронический процесс, представляющий серьёзную проблему для пациента. МЛП проявляется устойчивой воспалительной реакцией, снижением внеклеточного матрикса, нарушением грануляционной ткани для формирования и созревания, снижением коллагена. Применение мезенхимальных стромальных клеток – многообещающая стратегия лечения хронических повреждений кожи, регенерации тканей и их иммуномодуляции [227, 228]. Паракринные факторы обеспечивают основные терапевтические эффекты за счет хемокинов, цитокинов, факторов роста продуцируемые МСК [229, 230].

На сегодняшний день литературные данные по сравнению регенеративного потенциала МСК лабораторных животных и человека единичны [231, 232], а исследования по оценке применения паракринных факторов, продуцируемых МСК лабораторных животных (крысы) отсутствуют.

Настоящее исследование направлено на изучение эффективности применения мезенхимальных стромальных клеток из различных источников и их паракринных факторов в составе концентратов кондиционированных сред при радиационных ожогах (местных лучевых поражениях) кожи на лабораторных животных.

Применение МСК, культуральной и кондиционированной среды проводили трехкратно для активации репаративных процессов и ангиогенеза в поврежденной коже, сокращения сроков заживления язвенных дефектов, профилактики рецидивов: при отсутствии изменений на коже (1-е сутки), после формирования влажного лучевого дерматита (14-е сутки), после возникновения струпа в месте моделирования МЛП (21-е сутки).

Настоящее исследование продемонстрировало, что применение МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека является эффективной терапией и может ускорять заживление МЛП, стимулируя пролиферацию клеток, реэпителизацию, сокращение и ангиогенез. Использование концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека и культуральной среды показало большую эффективность в сокращении сроков и площади язвенной поверхности. Наибольшее сокращение площади язвенной поверхности кожи животных, образованной в результате воздействия ионизирующего излучения, к 112 дню с момента своего формирования наблюдали в группах ДКС – 85,7%, Д – 87%, ПКС – 97,4%. Заживление язвенной поверхности в группах Д и ДКС проходило аналогично, как и в группе положительного контроля (КС), в которой сокращение язвенной поверхности было на 80%. Различная динамика заживления площади повреждения в группах КС, Д и ДКС возможно связана с рецидивирующими

процессами МЛП, которые были менее выражены, чем в других группах (К, ДК, ДККС, Пл). Увеличение и уменьшение площади язвенной поверхности в середине исследования наблюдали и в группе ПКС, однако к концу эксперимента отмечали максимальное сокращение площади по сравнению с остальными группами – на 95,4%. В группах ДК, ДККС и Пл отмечалось сокращение площади язвенной поверхности на 60,2%, 50,4% и 43,1%, соответственно. При этом язвенная поверхность в группе К сократилась на 67,4%.

Отсутствие значимого эффекта при использовании МСК плаценты в исследовании связано с тканеспецифичностью данного источника клеток и особенностями продукции ими паракринных факторов.

По данным гистологического исследования отмечали уменьшение воспалительных процессов и фиброза дермы, наличие зачатков волосяных фолликулов и пролиферации сосудов микроциркуляторного русла в группе ПСК в отличие от других групп, в которых эти изменения были не столь заметны.

В результате иммуногистохимического исследования установлено, что количество вновь образованных сосудов, в эндотелиальных клетках которых определялась экспрессия CD31, статистически достоверно увеличивалась с 28 по 112 сутки только в группе ДК (с $5,53 \pm 0,9$ до $17,87 \pm 1,8$ ($p \leq 0,05$)), что свидетельствовало об усилении неоангиогенеза к концу эксперимента.

К концу эксперимента отмечали статистически достоверное увеличение клеток макрофагального ряда в тканях, окружающих язвенный дефект, отмеченных маркером CD68, в группах К и ДК (с $11,7 \pm 1,4$ до $24,7 \pm 2,4$ и с $16,6 \pm 2,3$ до $31,1 \pm 3,9$, соответственно ($p \leq 0,05$)) (Таблица 13).

Отмечалось увеличение количества FVIII-меченных клеток в группах К (с $5,53 \pm 0,9$ до $10,87 \pm 1,5$ ($p \leq 0,05$)), КС (с $5,80 \pm 1,1$ до $11,5 \pm 1,7$ ($p \leq 0,05$)), ДКС (с $8,03 \pm 0,9$ до $21,63 \pm 3,0$ ($p \leq 0,05$)) и ДК (с $5,53 \pm 0,9$ до $14,13 \pm 2,1$ ($p \leq 0,05$)).

Количество вновь образованных немиелинизированных нервных волокон в коже, экспрессирующих маркер PGP 9.5, к концу эксперимента увеличилось в группах К (с $1,97 \pm 0,3$ до $6,47 \pm 1,1$ ($p \leq 0,05$)), КС (с $1,97 \pm 0,3$ до $5,70 \pm 1,0$ ($p \leq 0,05$)), Д (с $1,87 \pm 0,4$ до $4,40 \pm 0,9$ ($p \leq 0,05$)) и ДКС (с $1,83 \pm 0,3$ до $2,60 \pm 0,4$ ($p \leq 0,05$)).

В сосуdistом эндотелии выявлено достоверное постепенное увеличение количества Ki67+ пролиферирующих клеток в группах К (с $2,3 \pm 0,3$ до $11,78 \pm 0,8$ ($p \leq 0,05$)), ДК (с $1,22 \pm 0,1$ до $2,44 \pm 0,3$ ($p \leq 0,05$)) и Ki67- в группах К (с $15,22 \pm 1,5$ до $28,78 \pm 2,1$ ($p \leq 0,05$)), Д (с $13,0 \pm 1,1$ до $22,0 \pm 1,6$ ($p \leq 0,05$)). В строме число клеток, содержащих в себе Ki67+ увеличивалось с 28 по 112 сутки эксперимента в группах К (с $5,33 \pm 0,5$ до $26,11 \pm 2,8$ ($p \leq 0,05$)), Д (с $6,56 \pm 1,2$ до $23,22 \pm 2,9$ ($p \leq 0,05$)), ДК (с $3,11 \pm 0,3$ до $12,67 \pm 1,0$ ($p \leq 0,05$)), ДККС (с $3,11 \pm 0,3$ до $15,0 \pm 3,8$ ($p \leq 0,05$)). Известно, что в стадии воспаления продукты распада коллагена являются хемотаксическими для различных типов клеток, включая макрофаги и фибробласты, необходимые для образования грануляций ткани, усиливая фагоцитоз и иммунный ответ. В пролиферативной фазе происходит рост фибробластов, которые способствуют отложению коллагена и грануляций ткани и кератиноцитов. При созревании и ремоделировании ткани незрелый коллаген III типа заменяется зрелый коллаген I типа, обеспечивающий прочность новообразованной ткани на растяжение [233]. Это подтверждается и проведенным настоящим исследованием. Так удалось установить, что уровень экспрессии Ag к Collagen I типа увеличивался с 28 по 112 сутки во всех группах, при этом уровень экспрессии Collagen III типа уменьшался между 28 и 112 днем эксперимента во всех группах за исключением группы ПКС, в которой выраженность экспрессии оставалась неизменной. Известно, что основной механизм улучшения регенерации ран, включает активацию сигнального пути TGF- β /Smad3, который способствует выработке коллагена I, что подтверждает наше исследование [234].

Интенсивность экспрессии VEGF в эндотелиальных клетках сосудов уменьшалась к 112 суткам в группах К, КС, Пл и ПКС; и достоверно увеличивалась в группе Д. Экспрессия маркера VEGF в строме также уменьшалась в группах К, КС, Пл и в группе ДКС. В группе Д отмечали повышение экспрессии, а в группе ПКС не отмечалось изменений в уровне экспрессии. Полученные результаты иммуногистохимического исследования показали, что применение МСК слизистой десны человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения,

приводит к улучшению васкуляризации увеличение экспрессии VEGF в сравнении с другими группами.

Выраженность экспрессии TIMP в клетках увеличивалась к 112 дню в группах К, КС, Д, ДКС, ДК и уменьшалась в группе Пл. При оценке интенсивности экспрессии MMP 2 типа отмечали ее снижение к концу эксперимента в группах К, Кс, ДКС, Пл, увеличение экспрессии отмечалось в группах Д, ДК, ДККС и группе ПКС. При этом уровень экспрессии MMP 9 типа снижался во всех группах кроме ПКС, где отмечали повышение уровня экспрессии. Известно, что МСК КМ способны секретировать большое количество TIMP, который стабилизирует сосуды и защищает базальную мембрану сосудов от деградации, вызванной MMP [235]. Полученные результаты иммуногистохимического исследования показали, что применение концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека при МЛП у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения приводит к ускоренному рубцеванию и заживлению язвенной поверхности – увеличение экспрессии металлопротеиназ (MMP 2 и 9), коллагена I типа, $p < 0,05$.

Отсутствие эффективности применения клеток плаценты в группе Пл может быть связано с гетерогенностью клеточной популяции. МСК плаценты не всегда действуют как иммуносупрессоры, они в большей степени выполняют роль иммуномодуляторов. С другой стороны, именно гетерогенность популяции может быть связана с успехом применения цитокинов в составе концентрата кондиционированной среды, применяемого в данном исследовании в группе ПКС.

Отсутствие качественного заживления язвенной поверхности в группах ДК и ДККС может быть связано с цитокиновым дисбалансом, выраженном в длительном повышении уровня провоспалительных цитокинов. МСК слизистой десны крысы, вероятно, не приводит к стабилизации уровня про- и противовоспалительных цитокинов, как и кондиционированная среда от МСК слизистой десны крысы.

Применение МСК из слизистой десны крысы и человека, плаценты подтверждает литературные данные об усилении процессов ангиогенеза при применении МСК КМ и МСК ЖТ в лечении МЛП. Так наблюдали увеличение уровней CD31 и VEGF в группах Д и ДК. В группе Пл такие данные по VEGF отсутствовали, что может быть связано с усилением воспалительной реакции.

В одной из контрольных групп при применении концентрата культуральной среды (группа КС) наблюдали значимое уменьшение площади язвенной поверхности по сравнению с другими группами на протяжении всего периода наблюдения. Однако анализ гистологического и иммуногистохимического исследований не позволяет однозначно утверждать об эффективности применения данного типа терапии.

Применение МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека показало наибольшую эффективность (полное заживление МЛП) на 112 сутки в 60% и 40 % случаев соответственно по сравнению с применением концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, МСК плаценты человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой крысы – в 20% случаев; МСК слизистой десны крысы и контролем – полное отсутствие заживления (0%).

Таким образом, использованные методы лечения (введение МСК, концентратов культуральной и кондиционированных сред в дозе 2 млн на 1 кг) были эффективны при МЛП кожи и приводили к сокращению площади поражения, ускоренному заживлению язвы, улучшению регенеративных процессов (ускорение перехода раневого процесса в стадию регенерации и эпителизации). Кроме того, применение МСК слизистой десны человека приводило к улучшению васкуляризации и уменьшению воспалительных процессов в очаге лучевого поражения в большей степени, чем аналогичные клетки, полученные от лабораторных животных (крысы).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использованные методы лечения (МСК, концентраты культуральной и кондиционированных сред в дозе 2 млн на 1 кг) эффективны при МЛП кожи и приводили к сокращению площади поражения, ускоренному заживлению язвы, улучшению регенеративных процессов (ускорение перехода раневого процесса в стадию регенерации и эпителизации). Кроме того, применение МСК слизистой десны человека приводило к улучшению васкуляризации и уменьшению воспалительных процессов в очаге лучевого поражения в большей степени, чем аналогичные клетки, полученные от лабораторных животных (крысы). Полученные результаты имеют важное теоретическое значение в понимании механизмов регенерации кожного покрова при местных лучевых поражениях и позволяют рекомендовать применение МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты для лечения местных лучевых поражений.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что применение МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека эффективно и приводит к сокращению язвенной поверхности местных лучевых поражений у лабораторных животных с 14 по 112 сутки после облучения на 87%, 85,7% и 95,4% соответственно.
2. Иммуногистохимические исследования показали, что применение МСК слизистой десны человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 по 112 сутки после облучения приводит к улучшению васкуляризации (увеличение экспрессии VEGF) и увеличению числа нервных волокон (увеличение PGP 9.5).
3. Показано, что применение МСК слизистой десны крысы и концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны крысы не

приводит к существенному сокращению местных лучевых поражений и способствует увеличению макрофагальной инфильтрации у лабораторных животных (увеличение маркера CD 68) с 14 суток по 112 сутки.

4. Установлено, что применение МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека, а также концентрата культуральной среды показало наибольшую эффективность - полное заживление язвенно поверхности на 112 сутки в 60% и 40% случаев, соответственно. Применение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, МСК плаценты человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой крысы приводит к полному заживлению в 20% случаев; применение МСК слизистой десны крысы и отсутствие терапии в группе контроль не приводит к полному заживлению.

5. Показано, что применение МСК из различных источников (слизистая ткань десны человека, слизистая ткань десны крысы, плацента человека) при местных лучевых поражениях с 21 по 112 сутки после облучения приводит к усилению процессов неоангиогенеза (увеличение экспрессии CD31). Также применение МСК слизистой десны человека и МСК слизистой десны крысы приводит к усилению процессов ангиогенеза (увеличение VEGF в эндотелии и строме).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

7-AAD – 7-аминоактиномицин D

Ang-1 – ангиопоэтин

BMP – костный морфогенетический белок

CD – кластер дифференцировки

c-Myc – ген, кодирующий протоонкогенный белок Myc

Col1/ Collagen 1 – коллаген 1 типа

Col3/ Collagen 3 – коллаген 3 типа

CXCR4 – хемокиновый рецептор 4 типа

DMEM – модифицированная Дульбекко среда Игла

EGF – эпидермальный фактор роста

ERK $\frac{1}{2}$ – внеклеточная регулируемая киназа, представленная белками 1 и 2 типов

FAK – фокальная киназа адгезии

FAK-ERK - киназа фокальной адгезии адгезионно-индуцированной активации

FGF – фактор роста фибробластов

FVIII – фактор свертывания крови VIII/маркер, используемый для дифференцировки эндотелиальных клеток

HGF – фактор роста гепатоцитов

HLA – человеческий лейкоцитарный антиген

IGF – инсулиноподобный фактор роста

IL –интерлейкин

Ki67 – маркер пролиферации клеток

Klf4 – фактор типа Круппеля 4 типа

Lamin – семейство ламинов

MMP – семейство матриксных металлопротеиназ

NF-kB – универсальный фактор транскрипции

OARSI – международное общество исследования остеоартрита

Oct4 – транскрипционный фактор

P13k/ Akt – внутриклеточный сигнальный путь между элементами фосфоинозитид-3-киназы и семейством протеинкиназ

p38 – митоген-активируемая протеинкиназа

PBS – фосфатный буферный солевой раствор

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

PGP 9.5 – маркер вновь образованных немиелинизированных нервных волокон

SDF – хемокин подсемейства CXC, хемоаттрактант для гемопоэтических стромальных клеток и ростовым фактором для В-клеток

Smad – семейство структурно сходных белков

Sox2 – (SRY [sex determining region Y]-box 2) — белковый транскрипционный фактор семейства SOX

TGF – трансформирующий фактор роста

TGF- β – трансформирующий фактор роста β

TIMP – тканевой ингибитор металлопротеиназ

TNF – фактор некроза опухоли

VAS – визуальная аналоговая шкала интенсивности боли

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МЛП – местное лучевое поражение

МСК – мезенхимальные стромальные клетки

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЦНС – центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mesenchymal Stem Cells for Chronic Wound Healing: Current Status of Preclinical and Clinical Studies / Y. Z. Huang, M. Gou, L. C. Da [et al.] // *Tissue Eng Part B Rev.* – 2020. – V. 26. – № 6. – P. 555-570. – doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0351.
2. Диагностика, лечение местных лучевых поражений и их отдаленных последствий. ФКР ФМБА России 2.6.7. // Федеральные клинические рекомендации. – Москва, 2015. – 62 с.
3. Manna, B. Radiation-Induced Skin Ulcer / B. Manna, J. S. Cooper // *StatPearls [Internet]*. – 2022. – Feb 7. – PMID: 29939541.
4. Ryan, J. L. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly / J. L. Ryan // *J Invest Dermatol.* – 2012. – V. 132. – № 3, Pt. 2. – P. 985-993. doi: 10.1038/jid.2011.411.
5. Осанов, Д. П. Дозиметрия и радиационная биофизика кожи / Д. П. Осанов. – Москва: Энергоатомиздат, 1983. – 152 с.
6. Бадертдинов, Р. Регенерация человека – реальность наших дней / Р. Бадертдинов // *Успехи современного естествознания.* – 2012. – № 7. – С. 8-18.
7. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на течение местных лучевых поражений у крыс после локального β -облучения / Б. Б. Мороз, Н. А. Онищенко, В. Г. Лебедев [и др.] // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2009. – Т. 49. – № 6. – С. 688-693.
8. Potentiel thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines dans les lésions cutanées radioinduites / M. Bensidhoum, S. Gobin, A. Chapel [et al.] // *J Soc Biol.* – 2005. – V. 199. – № 4. – P. 337-341. – doi: 10.1051/jbio:2005035.
9. Use of Human Cadaveric Mesenchymal Stem Cells for Cell Therapy of a Chronic Radiation-Induced Skin Lesion: A Case Report / M. Portas, E. Mansilla, H. Drago [et al.] // *Radiat Prot Dosimetry.* – 2016. – V. 171. – № 1. – P. 99-106. – doi: 10.1093/rpd/ncw206.

10. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. le Blanc, I. Mueller [et al.] // *Cytotherapy*. – 2006. – V. 8. – № 4. – P. 315-317. – doi: 10.1080/14653240600855905.
11. TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds / Y. Qi, D. Jiang, A. Sindrilaru [et al.] // *J Invest Dermatol*. – 2014. – V. 134. – № 2. – P. 526-537. – doi: 10.1038/jid.2013.328.
12. Role of interleukin-7 in fusion of rat bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyocytes in vitro and improvement of cardiac function in vivo / K. Haneef, A. Ali, I. Khan [et al.] // *Cardiovasc Ther*. – 2018. – V. 36. – № 6. – Article: e12479. – doi: 10.1111/1755-5922.12479.
13. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing / H. Lin, J. Sohn, H. Shen [et al.] // *Biomaterials*. – 2019. – V. 203. – P. 96-110. – doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.026.
14. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration / S. M. Richardson, G. Kalamegam, P. N. Pushparaj [et al.] // *Methods*. – 2016. – V. 99. – P. 69-80. – doi: 10.1016/j.ymeth.2015.09.015.
15. The Healing Effects of Conditioned Medium Derived from Mesenchymal Stem Cells on Radiation-Induced Skin Wounds in Rats / J. Sun, Y. Zhang, X. Song [et al.] // *Cell Transplant*. – 2019. – V. 28. – № 1. – P. 105-115. – doi: 10.1177/0963689718807410.
16. The conditioned medium of human mesenchymal stromal cells reduces irradiation-induced damage in cardiac fibroblast cells / Z. Y. Chen, Y. Y. Hu, X. F. Hu, L. X. Cheng // *J Radiat Res*. – 2018. – V. 59. – № 5. – P. 555-564. – doi: 10.1093/jrr/rry048.
17. Use of paracrine factors from stem cells to treat local radiation burns in rats / A. Temnov, T. Astrelina, K. Rogov [et al.] // *Stem Cells Cloning*. – 2018. – V. 11. – P. 69-76. – doi: 10.2147/SCCAA.S164630.

18. BM-MSC-derived exosomes alleviate radiation-induced bone loss by restoring the function of recipient BM-MSCs and activating Wnt/ β -catenin signaling / R. Zuo, M. Liu, Y. Wang [et al.] // Stem Cell Res Ther. – 2019. – V. 10. – № 1. – P. 30. – doi: 10.1186/s13287-018-1121-9.
19. Human fetal skin-derived stem cell secretome enhances radiation-induced skin injury therapeutic effects by promoting angiogenesis / X. Rong, J. Li, Y. Yang [et al.] // Stem Cell Res Ther. – 2019. – V. 10. – № 1. – P. 383. – doi: 10.1186/s13287-019-1456-x.
20. Тарханов, И. Р. Опыты над действием рентгеновских лучей на животный организм / И. Р. Тарханов // Тархнишвили, И. Р. Избранные Сочинения / И. Р. Тархнишвили. – Тбилиси: Сабчота Сакартвело, 1961. – С. 324-331.
21. Капустинская, К. А. Анри Беккерель / К. А. Капустинская. – Москва: Атомиздат, 1965. – С. 59-60.
22. Баюров, Л. И. Радиобиология: учебное пособие / Л. И. Баюров. – Краснодар: КубГАУ, 2008. – 331 с.
23. UNSCEAR 2008: Report to the General Assembly with Scientific Annexes. Volume II: EFFECTS // Sources and effects of ionizing radiation. – New York: United Nations, 2011. – P. 49.
24. Основы радиобиологии и радиационной медицины: Учебное пособие / А. Н. Гребенюк, О. Ю. Стрелова, В. И. Легеза, Е. Н. Степанова. – Санкт-Петербург: Издательство ФОЛИАНТ, 2012. – 232 с.
25. Радиобиология: учебник / Н. П. Лысенко, В. В. Пак, Л. В. Рогожина, З. Г. Кусурова; под редакцией Н. П. Лысенко, В. В. Пак. – 4-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2017. – 572 с.
26. Храмченкова, О. М. Основы радиобиологии: Учебное пособие для студентов биологических специальностей высших учебных заведений / О. М. Храмченкова. – Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины», 2003. – 238 с.
27. Доника, А. Д. Основы радиобиологии: Учебно-методическое пособие / А. Д. Доника, С. В. Поройский. – Волгоград, 2010. – 177 с.

28. Treatment of Radiation Injuries / eds. D. Browne, J. F. Weiss, Th. J. MacVittie, M. V. Pillai. – New York: Springer, 1990. – P. 250.
29. Spalek, M. Chronic radiation-induced dermatitis: challenges and solutions. / M. Spalek // Clin Cosmet Investig Dermatol. – 2016. – V. 9. – P. 473-482. – doi: 10.2147/CCID.S94320.
30. Radiation-induced skin reactions: mechanism and treatment / J. Wei, L. Meng, X. Hou [et al.] // Cancer Manag Res. – 2018. – V. 11. – P. 167-177. – doi: 10.2147/CMAR.S188655.
31. Chan, R. J. Re-examining the evidence in radiation dermatitis management literature: an overview and a critical appraisal of systematic reviews / R. J. Chan, E. Larsen, P. Chan // Int J Radiat Oncol Biol Phys. – 2012. – V. 84. – № 3. – P: e357-362. – doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.05.009.
32. McQuestion, M. Evidence-based skin care management in radiation therapy: clinical update / M. McQuestion // Semin Oncol Nurs. – 2011. – V. 27. – № 2. – P. e1-17. – doi: 10.1016/j.soncn.2011.02.009.
33. Occurrence, severity, and longitudinal course of twelve common symptoms in 1129 consecutive patients during radiotherapy for cancer / J. T. Hickok, G. R. Morrow, J. A. Roscoe [et al.] // J Pain Symptom Manage. – 2005. – V. 30. – № 05. – P. 433-442. – doi: 10.1016/j.jpainsymman.2005.04.012.
34. Галченко, Л. И. Лучевые осложнения при лучевой терапии: учебное пособие для студентов / Л. И. Галченко, В. В. Маточкин; ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России, Кафедра онкологии и лучевой терапии. – Иркутск: ИГМУ, 2015. – 30 с.
35. Radiation-induced skin injury: pathogenesis, treatment, and management / X. Yang, H. Ren, X. Guo [et al.] // Aging (Albany NY). – 2020. – V. 12. – № 22. – P. 23379-23393. – doi: 10.18632/aging.103932.
36. Advancements in Regenerative Strategies Through the Continuum of Burn Care / R. Stone Ii, S. Natesan, C. J. Kowalczewski [et al.] // Front Pharmacol. – 2018. – V. 9. – Article: 672. – doi: 10.3389/fphar.2018.00672.

37. Müller, K. Advances in the management of localized radiation injuries / K. Müller, V. Meineke // *Health Phys.* – 2010. – V. 98. – № 6. – P. 843-850. – doi: 10.1097/HP.0b013e3181adcba7.
38. Hymes, S. R. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006 / S. R. Hymes, E. A. Strom, C. Fife // *J Am Acad Dermatol.* – 2006. – V. 54. – № 1. – P. 28-46. – doi: 10.1016/j.jaad.2005.08.054.
39. Barabanova, A. V. Local radiation injury / A. V. Barabanova // *Medical management of radiation accidents* / eds. I. Gusev, A. K. Guskova, F. A. Mettler. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2001. – P. 223-240.
40. Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy: a report of two cases / E. Bey, P. Duhamel, J. J. Lataillade [et al.] // *Bull Acad Natl Med.* – 2007. – V. 191. – P. 971-978.
41. Radiation-induced late effects in two affected individuals of the Lilo radiation accident / H. Scherthan, M. Abend, K. Müller [et al.] // *Radiat Res.* – 2007. – V. 167. – P. 615-623. – doi: 10.1667/RR0774.1.
42. Martin, P. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing / P. Martin, R. Nunan // *Br J Dermatol.* – 2015. – V. 173. – № 2. – P. 370-378. – doi: 10.1111/bjd.13954.
43. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds / M. A. Loots, E. N. Lamme, J. Zeegelaar [et al.] // *J Invest Dermatol.* – 1998. – V. 111. – № 5. – P. 850-857. – doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00381.x.
44. Diegelmann, R. F. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing / R. F. Diegelmann, M. C. Evans // *Front Biosci.* – 2004. – V. 9. – P. 283-289. – doi: 10.2741/1184. PMID: 14766366.
45. Stem cells: past, present, and future / W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, Z. Rybak // *Stem Cell Res Ther.* – 2019. – V. 10. – № 1. – Article: 68. – doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.

46. Maksimov, A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere / A. Maksimov // *Folia Haematologica*. – 1909. – V. 8. – P. 125-134.
47. Chertkov, I. L. Does the hematopoietic stem cell exist / I. L. Chertkov // *Mol. Biol.* – 1984. – V. 18. – № 3. – P. 565-573.
48. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges / A. J. Friedenstein, N. W. Latzinik, A. G. Grosheva, U. F. Gorskaya // *Exp Hematol.* – 1982. – V. 10. – № 2. – P. 217-227.
49. Kwan, Y. C. Epithelial-stromal interactions: Specific stimulation of corneal epithelial cell growth in vitro by a factor(s) from cultured stromal fibroblasts / Y. C. Kwan, H. H. Richard // *Experimental Eye Research*. – 1983. – V. 36. – № 2. – P. 231-246.
50. Friedenstein, A.J. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs / A. J. Friedenstein, J. F. Gorskaja, N. N. Kulagina // *Experimental hematology*. – 1976. – V. 4. – № 5. – P. 267-274.
51. Анохина, Е. Б. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс / Е. Б. Анохина, Л. Б. Буравкова // *Цитология*. – 2007. – Т. 49. – № 1. – С. 40-47.
52. Беленков, Ю. Н. Клеточная терапия в лечении хронической сердечной недостаточности: виды применяемых стромальных клеток, результаты последних клинических исследований / Ю. Н. Беленков, Е. В. Привалова, И. С. Чекнева // *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. – 2008. – Т. 15. – № 5. – С. 4-18.
53. Meyers, R. A. Stem Cells. From Biology to Therapy: A / R. A. Meyers. – USA: John Wiley & Sons Limited, 2013. – 782 p.
54. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell*. – 2006. – V. 126. – № 4. – P. 663-676.

55. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines / A. Bradley, M. Evans, M. H. Kaufman, E. Robertson // *Nature*. – 1984. – V. 309. – № 5965. – P. 255-256.
56. Keller, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine / G. Keller // *Genes Dev*. – 2005. – V. 19. – № 10. – P. 1129-1155.
57. Получение и характеристика постоянных эмбриональных стромальных клеток человека / Т. А. Крылова, В. В. Зенин, Н. С. Мусорина [и др.] // *Цитология*. – 2003. – № 45. – С. 1172-1178.
58. Мезен, Н. И. Стволовые клетки: учеб.-метод. пособие / Н. И. Мезен, З. Б. Квачева, Л. М. Сычик. – 2-е изд., доп. – Минск: БГМУ, 2014. – 62 с.
59. Ding, D. C. Mesenchymal stem cells / D. C. Ding, W. C. Shyu, S. Z. Lin // *Cell Transplant*. – 2011. – V. 20. – № 1. – P. 5-14.
60. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, [et al.] // *Science*. – 1999. – V. 284. – № 5411. – P. 143-147.
61. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse / J. E. Dennis, A. Merriam, A. Awadallah [et al.] // *J Bone Miner Res*. – 1999. – V. 14. – № 5. – P. 700-709.
62. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane / C. de Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski, F. P. Luyten // *Arthritis Rheum*. – 2001. – V. 44. – № 8. – P. 1928-1942.
63. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities / F. Sabatini, L. Petecchia, M. Tavian [et al.] // *Lab Invest*. – 2005. – V. 85. – № 8. – P. 962-971.
64. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals / N. J. Zvaifler, L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams [et al.] // *Arthritis Res*. – 2000. – V. 2. – № 6. – P. 477-488.
65. Сравнительное исследование мезенхимных стромальных клеток, выделенных из костного мозга и эмбриональной печени мыши и крысы / О. В. Паюшина,

- Э. И. Бугверова, Г. П. Сатдыкова [и др.] // Изв. РАН. Сер. биол. – 2004. – № 6. – С. 659-664.
66. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential / P. S. Anker, W. A. Noort, S. A. Scherjon [et al.] // *Haematologica*. – 2003. – V. 88. – P. 845-852.
 67. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta / P. S. Anker, S. A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur [et al.] // *Stem Cells*. – 2004. – V. 22. – P. 1338-1345.
 68. Chunmeng, S. Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats / S. Chunmeng, C. Tiamin // *Transplant. Proc.* – 2004. – V. 36. – P. 1578-1581.
 69. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas / Y. Hu, L. Liao, Q. Wang [et al.] // *J. Lab. Clin. Med.* – 2003. – V. 141. – P. 342-349.
 70. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord / J. W. Kim, S. Y. Kim, S. Y. Park [et al.] // *Ann. Hematol.* – 2004. – V. 83. – P. 733-738.
 71. A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes / D. J. Warejcka, R. Harvey, B. J. Taylor [et al.] // *J. Surg. Res.* – 1996. – V. 62. – P. 233-242.
 72. International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement / E. M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici [et al.] // *Cytotherapy*. – 2005. – V. 7. – № 5. – P. 393-395.
 73. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro / N. Jaiswal, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan [et al.] // *J Cell Biochem.* – 1997. – V. 64. – P. 295-312.
 74. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells / B. Johnstone, T. M. Hering, A. I. Caplan [et al.] // *Exp Cell Res.* – 1998. – V. 238. – P. 265-272/

75. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency / S. M. Hussein, N. N. Batada, S. Vuoristo [et al.] // *Nature*. – 2011. – V. 471. – № 7336. – P. 58-62.
76. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells / A. Gore, Z. Li, H. L. Fung [et al.] // *Nature*. – 2011. – V. 471. – № 7336. – P. 63-67.
77. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells / R. Lister, M. Pelizzola, Y. S. Kida [et al.] // *Nature*. – 2011. – V. 471. – № 7336. – P. 68-73.
78. Yamanaka, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges / S. Yamanaka // *Cell Stem Cell*. – 2020. – V. 27. – № 4. – P. 523-531.
79. Design of a Tumorigenicity Test for Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cell Products / S. Kawamata, H. Kanemura, N. Sakai [et al.] // *J Clin Med*. – 2015. – V. 4. – № 1. – P. 159-171.
80. Pillarisetti, K. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1) α : SDF-1 α mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction / K. Pillarisetti, S. K. Gupta // *Inflammation*. – 2001. – V. 25. – № 5. – P. 293-300.
81. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy / A. T. Askari, S. Unzek, Z. B. Popovic [et al.] // *Lancet*. – 2003. – V. 362. – № 9385. – P. 697-703.
82. Stromal Derived Factor-1/CXCR4 Axis Involved in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Recruitment to Injured Liver / K. X. Ling, L. Peng, Z. J. Feng [et al.] // *Stem Cells Int*. – 2016. – Article: 8906945.
83. Stem cells migration during skeletal muscle regeneration - the role of Sdf-1/Cxcr4 and Sdf-1/Cxcr7 axis / K. Kowalski, A. Kołodziejczyk, M. Sikorska [et al.] // *Cell Adh Migr*. – 2017. – V. 11. – № 4. – P. 384-398.
84. SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion / X. Liu, B. Duan, Z. Cheng [et al.] // *Protein Cell*. – 2011. – V. 2. – № 10. – P. 845-854.

85. Mesenchymal stem cells require integrin $\beta 1$ for directed migration induced by osteopontin in vitro / C. Zou, G. Song, Q. Luo [et al.] // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2011. – V. 47. – № 3. – P. 241-250.
86. Raheja, L. F. Hypoxic osteocytes recruit human MSCs through an OPN/CD44-mediated pathway / L. F. Raheja, D. C. Genetos, C. E. Yellowley // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2008. – V. 366. – № 4. – P. 1061-1066.
87. Osteopontin promotes mesenchymal stem cell migration and lessens cell stiffness via integrin $\beta 1$, FAK, and ERK pathways / C. Zou, Q. Luo, J. Qin [et al.] // *Cell Biochem Biophys.* – 2013. – V. 65. – № 3. – P. 455-462.
88. Decreased nuclear stiffness via FAK-ERK1/2 signaling is necessary for osteopontin-promoted migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / L. Liu, Q. Luo, J. Sun [et al.] // *Exp Cell Res.* – 2017. – V. 355. – № 2. – P. 172-181.
89. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells / A. Schmidt, D. Ladage, T. Schinköthe [et al.] // *Stem Cells.* – 2006. – V. 24. – № 7. – P. 1750-1758.
90. Ball, S. G. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors / S. G. Ball, C. A. Shuttleworth, C. M. Kielty // *J Cell Biol.* – 2007. – V. 177. – № 3. – P. 489-500.
91. Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro / H. F. Langer, K. Stellos, C. Steingen [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 2009. – V. 47. – № 2. – P. 315-325.
92. Myocardial transfection of hypoxia-inducible factor-1 α and co-transplantation of mesenchymal stem cells enhance cardiac repair in rats with experimental myocardial infarction / B. Huang, J. Qian, J. Ma [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2014. – V. 5. – № 1. – P. 22.
93. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells / Y. Li, X. Yu, S. Lin [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – V. 356. – № 3. – P. 780-784.

94. Mishima, Y. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells / Y. Mishima, M. Lotz // J Orthop Res. – 2008. – V. 26. – № 10. – P. 1407-1412.
95. A CXCL5- and bFGF-dependent effect of PDGF-B-activated fibroblasts in promoting trafficking and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / A. E. Nedeau, R. J. Bauer, K. Gallagher [et al.] // Exp Cell Res. – 2008. – V. 314. – № 11-12. – P. 2176-2186.
96. Platelet-derived growth factor receptor beta identifies mesenchymal stem cells with enhanced engraftment to tissue injury and pro-angiogenic property / S. Wang, M. Mo, J. Wang [et al.] // Cell Mol Life Sci. – 2018. – V. 75. – № 3. – P. 547-561.
97. Transforming growth factor β induces bone marrow mesenchymal stem cell migration via noncanonical signals and N-cadherin / M. J. Dubon, J. Yu, S. Choi, K. S. Park // J Cell Physiol. – 2018. – V. 233. – № 1. – P. 201-213.
98. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair / X. Fu, G. Liu, A. Halim [et al.] // Cells. – 2019. – V. 8. – № 8. – P. 784.
99. Younger, E. M. Morbidity at bone graft donor sites / E. M. Younger, M. W. Chapman // J Orthop Trauma. – 1989. – V. 3. – № 3. – P. 192-195.
100. Burrow, K. L. Human Adipose-Derived Stem Cells Exhibit Enhanced Proliferative Capacity and Retain Multipotency Longer than Donor-Matched Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells during Expansion In Vitro / K. L. Burrow, J. A. Hoyland, S. M. Richardson // Stem Cells Int. – 2017. – Article: 2541275.
101. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration / D. Tang, R. S. Tare, L. Y. Yang [et al.] // Biomaterials. – 2016. – V. 83. – P. 363-382.
102. In Vivo Models for the Evaluation of the Osteogenic Potency of Bone Substitutes Seeded with Mesenchymal Stem Cells of Human Origin: A Concise Review / F. Westhauser, A. S. Senger, B. Reible, A. Moghaddam // Tissue Eng Part C Methods. – 2017. – V. 23. – № 12. – P. 881-888.

103. Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: a randomized and prospective preliminary study / M. Liebergall, J. Schroeder, R. Mosheiff [et al.] // *Mol Ther.* – 2013. – V. 21. – № 8. – P. 1631-1638.
104. Use of autologous human mesenchymal stromal cell/fibrin clot constructs in upper limb non-unions: long-term assessment / S. Giannotti, L. Trombi, V. Bottai [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – № 8. – Article: e73893.
105. Bone engineering in dog mandible: Coculturing mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in a composite scaffold containing vascular endothelial growth factor / A. Khojasteh, F. Fahimipour, M. Jafarian [et al.] // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2017. – V. 105. – № 7. – P. 1767-1777.
106. Clinical Study of Bone Regeneration by Conditioned Medium From Mesenchymal Stem Cells After Maxillary Sinus Floor Elevation / W. Katagiri, J. Watanabe, N. Toyama [et al.] // *Implant Dent.* – 2017. – V. 26. – № 4. – P. 607-612.
107. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial / C. Gjerde, K. Mustafa, S. Hellem [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2018. – V. 9. – № 1. – Article: 213.
108. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine / Y. Han, X. Li, Y. Zhang [et al.] // *Cells.* – 2019. – V. 8. – № 8. – Article: 886.
109. Zou, J. Progress of co-culture systems in cartilage regeneration / J. Zou, B. Bai, Y. Yao // *Expert Opin Biol Ther.* – 2018. – V. 18. – № 11. – P. 1151-1158.
110. Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering / J. Yang, Y. S. Zhang, K. Yue, A. Khademhosseini // *Acta Biomater.* – 2017. – V. 57. – P. 1-25.
111. Mimicking nature: Fabrication of 3D anisotropic electrospun polycaprolactone scaffolds for cartilage tissue engineering applications / A. F. Girão, Â. Semitela, G. Ramalho [et al.] // *Composites Part B: Engineering.* – 2018. – V. 154. – P. 99-107.
112. Biomaterial and stem cell-based strategies for skeletal muscle regeneration / A. Dunn, M. Talovic, K. Patel [et al.] // *J Orthop Res.* – 2019. – V. 37. – № 6. – P. 1246-1262.

113. Klimczak, A. Muscle Stem/Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow Origin for Skeletal Muscle Regeneration in Muscular Dystrophies / A. Klimczak, U. Kozłowska, M. Kurpisz // Arch Immunol Ther Exp (Warsz). – 2018. – V. 66. – № 5. – P. 341-354.
114. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF- β 3 / J. S. Park, M. S. Shim, S. H. Shim [et al.] // Biomaterials. – 2011. – V. 32. – № 32. – P. 8139-8149.
115. Comparative analysis of multilineage properties of mesenchymal stromal cells derived from fetal sources shows an advantage of mesenchymal stromal cells isolated from cord blood in chondrogenic differentiation potential / A. Pievani, V. Scagliotti, F. M. Russo [et al.] // Cytotherapy. – 2014. – V. 16. – № 7. – P. 893-905.
116. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study / L. Orozco, A. Munar, R. Soler [et al.] // Transplantation. – 2013. – V. 95. – № 12. – P. 1535-1541.
117. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cartilage Regeneration and Are Safe for Single-Stage Cartilage Repair in Humans upon Mixture with Recycled Autologous Chondrons / T. S. de Windt, L. A. Vonk, I. C. Slaper-Cortenbach [et al.] // Stem Cells. – 2017. – V. 35. – № 1. – P. 256-264.
118. A Prospective, Single-Blind, Placebo-Controlled Trial of Bone Marrow Aspirate Concentrate for Knee Osteoarthritis / S. A. Shapiro, S. E. Kazmerchak, M. G. Heckman [et al.] // Am J Sports Med. – 2017. – V. 45. – № 1. – P. 82-90.
119. Enhanced repair of meniscal hoop structure injuries using an aligned electrospun nanofibrous scaffold combined with a mesenchymal stem cell-derived tissue engineered construct / K. Shimomura, B. B. Rothrauff, D. A. Hart [et al.] // Biomaterials. – 2019. – V. 192. – P. 346-354.
120. In Vitro Repair of Meniscal Radial Tear With Hydrogels Seeded With Adipose Stem Cells and TGF- β 3 / H. Sasaki, B. B. Rothrauff, P. G. Alexander [et al.] // Am J Sports Med. – 2018. – V. 46. – № 10. – P. 2402-2413.

121. A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells / C. S. Chung, N. Fujita, N. Kawahara [et al.] // J Vet Med Sci. – 2013. – V. 75. – № 7. – P. 879-886.
122. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / K. S. Bae, J. B. Park, H. S. Kim [et al.] // Yonsei Med J. – 2011. – V. 52. – № 3. – P. 401-412.
123. Transplantation of human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells reduces fibrotic scar formation in a rat spinal cord injury model / M. Kim, K. H. Kim, S. U. Song [et al.] // J Tissue Eng Regen Med. – 2018. – V. 12. – № 2. – P. e1034-e1045.
124. Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair / L. Luo, Y. He, X. Wang [et al.] // Stem Cells Int. – 2018. – V. 7. – P. 1731289.
125. Oliveri, R. S. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models / R. S. Oliveri, S. Bello, F. Biering-Sørensen // Neurobiol Dis. – 2014. – V. 62. – P. 338-353.
126. A Phase III Clinical Trial Showing Limited Efficacy of Autologous Mesenchymal Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury / S. K. Oh, K. H. Choi, J. Y. Yoo [et al.] // Neurosurgery. – 2016. – V. 78. – № 3. – P. 436-447.
127. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury / S. Wang, H. Cheng, G. Dai [et al.] // Brain Res. – 2013. – V. 1532. – P. 76-84.
128. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from adult mouse adipose, muscle, and fetal muscle / H. Lei, B. Yu, Z. Huang [et al.] // Mol Biol Rep. – 2013. – V. 40. – № 2. – P. 885-892.
129. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro / W. Xu, X. Zhang, H. Qian [et al.] // Exp Biol Med (Maywood). – 2004. – V. 229. – № 7. – P. 623-631.

130. Differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow to sinus node-like cells / J. Yang, T. Song, P. Wu [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2012. – V. 5. – № 1. – P. 108-113.
131. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges / L. Bagno, K. E. Hatzistergos, W. Balkan, J. M. Hare // *Mol Ther.* – 2018. – V. 26. – № 7. – P. 1610-1623.
132. Mesenchymal stem cells as the near future of cardiology medicine - truth or wish? / M. Brychtova, J. A. Thiele, D. Lysak [et al.] // *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* – 2019. – V. 163. – № 1. – P. 8-18.
133. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy / N. Nagaya, K. Kangawa, T. Itoh [et al.] // *Circulation.* – 2005. – V. 112. – № 8. – P. 1128-1135.
134. Gneocchi, M. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease / M. Gneocchi, P. Danieli, E. Cervio // *Vascul Pharmacol.* – 2012. – V. 57. – № 1. – P. 48-55.
135. Therapeutic effects of a mesenchymal stem cell-based insulin-like growth factor-1/enhanced green fluorescent protein dual gene sorting system in a myocardial infarction rat model / S. Jung, J. H. Kim, C. Yim [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2018. – V. 18. – № 6. – P. 5563-5571.
136. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation / H. F. Tse, Y. L. Kwong, J. K. Chan [et al.] // *Lancet.* – 2003. – V. 361. – № 9351. – P. 47-49.
137. Assembly of complex cell microenvironments using geometrically docked hydrogel shapes / G. Eng, B. W. Lee, H. Parsa [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – V. 110. – № 12. – P. 4551-4556.
138. Let-7a-transfected mesenchymal stem cells ameliorate monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing pulmonary artery smooth muscle cell growth through STAT3-BMP2 signaling / G. Cheng, X. Wang, Y. Li, L. He // *Stem Cell Res Ther.* – 2017. – V. 8. – № 1. – Article: 34.

139. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation / K. Tsubota, Y. Satake, M. Kaido [et al.] // *N Engl J Med.* – 1999. – V. 340. – № 22. – P. 1697-1703.
140. Katikireddy, K. R. Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells / K. R. Katikireddy, R. Dana, U. V. Jurkunas // *Stem Cells.* – 2014. – V. 32. – № 3. – P. 717-729.
141. Cell viability and extracellular matrix synthesis in a co-culture system of corneal stromal cells and adipose-derived mesenchymal stem cells / T. Shen, J. Shen, Q. Q. Zheng [et al.] // *Int J Ophthalmol.* – 2017. – V. 10. – № 5. – P. 670-678.
142. Corneal Endothelial Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord / K. Yamashita, E. Inagaki, S. Hatou [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2018. – V. 27. – № 16. – P. 1097-1108.
143. Third-Party Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells Prevent Rejection in a Pre-sensitized High-Risk Model of Corneal Transplantation / P. Lohan, N. Murphy, O. Treacy [et al.] // *Front Immunol.* – 2018. – V. 9. – Article: 2666.
144. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells / Y. Ma, Y. Xu, Z. Xiao [et al.] // *Stem Cells.* – 2006. – V. 24. – № 2. – P. 315-321.
145. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type / M. Sasaki, R. Abe, Y. Fujita [et al.] // *J Immunol.* – 2008. – V. 180. – № 4. – P. 2581-2587.
146. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing / H. Nakagawa, S. Akita, M. Fukui [et al.] // *Br J Dermatol.* – 2005. – V. 153. – № 1. – P. 29-36.
147. Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds / H. Satoh, K. Kishi, T. Tanaka [et al.] // *Cell Transplant.* – 2004. – V. 13. – № 4. – P. 405-412.
148. Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation / A. Stoff, A. A. Rivera, N. Sanjib Banerjee [et al.] // *Exp Dermatol.* – 2009. – V. 18. – № 4. – P. 362-369.

149. Ong, H. T. Novel non-angiogenic role for mesenchymal stem cell-derived vascular endothelial growth factor on keratinocytes during wound healing / H. T. Ong, R. J. Dilley // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2018. – V. 44. – P. 69-79.
150. Engineering fibrin hydrogels to promote the wound healing potential of mesenchymal stem cell spheroids / K. C. Murphy, J. Whitehead, D. Zhou [et al.] // *Acta Biomater.* – 2017. – V. 64. – P. 176-186.
151. Healing potential of mesenchymal stem cells cultured on a collagen-based scaffold for skin regeneration / M. A. Shokrgozar, M. Fattahi, S. Bonakdar [et al.] // *Iran Biomed J.* – 2012. – V. 16. – № 2. – P. 68-76.
152. New therapy of skin repair combining adipose-derived mesenchymal stem cells with sodium carboxymethylcellulose scaffold in a pre-clinical rat model / C. Rodrigues, A. M. de Assis, D. J. Moura [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – № 5. – Article: e96241.
153. Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice / S. E. Navone, L. Pascucci, M. Dossena [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2014. – V. 5. – № 1. – Article: 7.
154. Sericin hydrogels promote skin wound healing with effective regeneration of hair follicles and sebaceous glands after complete loss of epidermis and dermis / C. Qi, L. Xu, Y. Deng [et al.] // *Biomater Sci.* – 2018. – V. 6. – № 11. – P. 2859-2870.
155. A novel role of angiotensin II in epidermal cell lineage determination: Angiotensin II promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into keratinocytes through the p38 MAPK, JNK and JAK2 signalling pathways / X. Jiang, F. Wu, Y. Xu [et al.] // *Exp Dermatol.* – 2019. – V. 28. – № 1. – P. 59-65.
156. Gene-activated matrix/bone marrow-derived mesenchymal stem cells constructs regenerate sweat glands-like structure in vivo / P. Kolakshyapati, X. Li, C. Chen [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – V. 7. – № 1. – Article: 17630.
157. Stromal cell-derived factor-1 receptor CXCR4-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells accelerate wound healing by migrating into skin injury areas / D. Yang, S. Sun, Z. Wang [et al.] // *Cell Reprogram.* – 2013. – V. 15. – № 3. – P. 206-215.

158. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis / T. Kisseleva, H. Uchinami, N. Feirt [et al.] // J Hepatol. – 2006. – V. 45. – № 3. – P. 429-438.
159. Enhanced wound healing by topical administration of mesenchymal stem cells transfected with stromal cell-derived factor-1 / Y. Nakamura, H. Ishikawa, K. Kawai [et al.] // Biomaterials. – 2013. – V. 34. – № 37. – P. 9393-9400.
160. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transfected with ectodysplasin for regeneration of sweat glands / S. Cai, Y. Pan, B. Han [et al.] // Chin Med J (Engl). – 2011. – V. 124. – № 15. – P. 2260-2268.
161. Granulation tissue-derived mesenchymal stromal cells: a potential application for burn wound healing in pediatric patients / G. Pelizzo, M. A. Avanzini, M. Mantelli [et al.] // J Stem Cells Regen Med. – 2018. – V. 14. – № 1. – P. 53-58.
162. A Systematic Review and Meta-analysis of Mesenchymal Stem Cell Injections for the Treatment of Perianal Crohn's Disease: Progress Made and Future Directions / A. L. Lightner, Z. Wang, A. C. Zubair, E. J. Dozois // Dis Colon Rectum. – 2018. – V. 61. – № 5. – P. 629-640.
163. Autologous platelet-rich gel combined with in vitro amplification of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation to treat the diabetic foot ulcer: a case report / Q. Wu, X. Lei, L. Chen [et al.] // Ann Transl Med. – 2018. – V. 6. – № 15. – Article: 307.
164. High Local Concentrations of Intradermal MSCs Restore Skin Integrity and Facilitate Wound Healing in Dystrophic Epidermolysis Bullosa / T. Kühl, M. Mezger, I. Hausser [et al.] // Mol Ther. – 2015. – V. 23. – № 8. – P. 1368-1379.
165. Effects of dermal multipotent cell transplantation on skin wound healing / S. Chunmeng, C. Tianmin, S. Yongping [et al.] // J Surg Res. – 2004. – V. 121. – № 1. – P. 13-19.
166. Трансплантация мезенхимальных клеток при лечении лучевых поражений кожи / К. В. Котенко, Б. Б. Мороз, Н. М. Надежина и др. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2011. – № 1. – С. 2-7.

167. Клеточные технологии в лечении радиационных ожогов: опыт ФМБЦ им. А.И. Бурназяна / К. В. Котенко, И. И. Еремин, Б. Б. Мороз и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. – № 2. – С. 97-102.
168. Proposed regeneration therapy for cutaneous radiation injuries / S. Akito, K. Akino, A. Hiruno [et al.] // Acta med. Nagasak. – 2006. – V. 51. – № 4. – P. 50-55.
169. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage / S. François, M. Bensidhoum, M. Mouiseddine [et al.] // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – № 4. – P. 1020-1029.
170. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model / S. François, M. Mouiseddine, N. Mathieu [et al.] // Annals of Hematology. – 2007. – V. 86. – № 1. – P. 1-8.
171. New Approach of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Amniotic Epithelial Cells Applications in Accelerating Wound Healing of Irradiated Albino Rat / S. S. Mehanni1, N. F. Ibrahim, A. R. Hassan, L. A. Rashed // International Journal of Stem Cells. – 2013. – V. 6. – № 1. – P. 45-54.
172. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy / J. J. Lataillade, C. Doucet, E. Bey [et al.] // Regen. Med. – 2007. – V. 2. – P. 785-794.
173. Патент № 2292212 С1 Российская Федерация, МПК А61К 35/28, А61Р 17/02. Кондиционная среда, обладающая лечебным эффектом: № 2005116811/15: заявл. 02.06.2005 : опубл. 27.01.2007 / А. Г. Коноплянников, А. И. Колесникова, А. С. Саенко [и др.]; заявитель ГУ Медицинский радиологический научный центр РАМН.
174. Effect of adipose-derived stem cells on radiation-induced acute skin injury in rats / Z. Liu, Z. Rao, X. Sheng [et al.] // Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2019. – V. 44. – № 2. – P. 150-157.

175. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-derived growth factor on the healing of radiation induced ulcer in rats / I. G. Jin, J. H. Kim, H. G. Wu, S. J. Hwang // *Tissue Eng Regen Med.* – 2016. – V. 13. – № 1. – P. 78-90.
176. Transplantation of BMSCs expressing hPDGF-A/hBD2 promotes wound healing in rats with combined radiation-wound injury / L. Hao, J. Wang, Z. Zou [et al.] // *Gene Ther.* – 2009. – V. 16. – № 1. – P. 34-42.
177. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and inhibiting TGF- β 1 signaling / T. Ueno, A. Nakashima, S. Doi [et al.] // *Kidney Int.* – 2013. – V. 84. – № 2. – P. 297-307.
178. Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs / C. Linard, E. Busson, V. Holler [et al.] // *Stem Cells Transl Med.* – 2013. – V. 2. – № 11. – P. 916-927.
179. Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice / S. Saha, P. Bhanja, R. Kabarriti [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – № 9. – Article: e24072.
180. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Fibrosis and Inflammation in the Peritoneal Fibrosis Model Developed in Uremic Rats / E. C. Costalonga, C. Fanelli, M. R. Garnica, I. L. Noronha // *Stem Cells Int.* – 2020. – Article: 3768718.
181. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair / Y. Shi, G. Hu, J. Su [et al.] // *Cell Res.* – 2010. – V. 20. – № 5. – P. 510-518.
182. Meiliana, A. Mesenchymal Stem Cells Manage Endogenous Tissue Regeneration / A. Meiliana, N. M. Dewi, A. Wijaya // *Indones Biomed J.* – 2016. – V. 8. – № 2. – P. 71-90.
183. Regulation of Immunity via Multipotent Mesenchymal Stromal Cells / Y. P. Rubtsov, Y. G. Suzdaltseva, K. V. Goryunov [et al.] // *Acta Naturae.* – 2012. – V. 4. – № 1 (12). – P. 23-31.
184. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration / J. A. Kode, S. Mukherjee, M. V. Joglekar, A. A. Hardikar // *Cytotherapy.* – 2009. – V. 11. – № 4. – P. 377-391.

185. Angiogenic Effects of Human Dental Pulp and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells and their Extracellular Vesicles / G. Merckx, B. Hosseinkhani, S. Kuypers [et al.] // *Cells*. – 2020. – V. 9. – № 2. – Article: 312.
186. The Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Media Topically Delivered in Fibrin Glue on Chronic Wound Healing in Rats / R. A. Mehanna, I. Nabil, N. Attia [et al.] // *Biomed Res Int*. – 2015. – Article: 846062.
187. Li, X. Mesenchymal stem cells in idiopathic pulmonary fibrosis / X. Li, S. Yue, Z. Luo // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – № 60. – P. 102600-102616.
188. Rezvani M. Stammzellderivate bei Hautschäden nach Strahlenexposition [Stem cell derived therapy for cutaneous radiation exposure] / M. Rezvani // *Hautarzt*. – 2013. – V. 64. – № 12. – P. 910-916.
189. Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations / E. Bey, M. Prat, P. Duhamel [et al.] // *Wound Repair Regen*. – 2010. – V. 18. – № 1. – P. 50-58.
190. Bone marrow mesenchymal stem cell implantation for the treatment of radioactivity-induced acute skin damage in rats / K. Zheng, W. Wu, S. Yang [et al.] // *Mol Med Rep*. – 2015. – V. 12. – № 5. – P. 7065-7071.
191. McQuestion M. Evidence-based skin care management in radiation therapy: clinical update / M. McQuestion // *Semin Oncol Nurs*. – 2011. – V. 27. – № 2. – P. e1-17.
192. Topical application of hPDGF-A-modified porcine BMSC and keratinocytes loaded on acellular HAM promotes the healing of combined radiation-wound skin injury in minipigs / G. Yan, H. Sun, F. Wang [et al.] // *Int J Radiat Biol*. – 2011. – V. 87. – № 6. – P. 591-600.
193. Bone Marrow Stem Cell and Decellularized Human Amniotic Membrane for the Treatment of Nonhealing Wound After Radiation Therapy / Z. Kakabadze, D. Chakhunashvili, K. Gogilashvili [et al.] // *Exp Clin Transplant*. – 2019. – V. 17. – № 1. – P. 92-98.

194. Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury / P. Chang, Y. Qu, Y. Liu [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2013. – V. 4. – № 6. – Article: e685.
195. Marrow-derived stromal cell delivery on fibrin microbeads can correct radiation-induced wound-healing deficits / M. W. Xie, R. Gorodetsky, E. D. Micewicz [et al.] // *J Invest Dermatol.* – 2013. – V. 133. – № 2. – P. 553-561; № 3. – P. 859. [correction of the erratum].
196. Therapeutic potential of gingival fibroblasts for cutaneous radiation syndrome: comparison to bone marrow-mesenchymal stem cell grafts / C. Linard, F. Tissedre, E. Busson [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2015. – V. 24. – № 10. – P. 1182-1193.
197. Mesenchymal stem cell-conditioned medium prevents radiation-induced liver injury by inhibiting inflammation and protecting sinusoidal endothelial cells / Y. X. Chen, Z. C. Zeng, J. Sun [et al.] // *J Radiat Res.* – 2015. – V. 56. – № 4. – P. 700-708.
198. Human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate nasal mucosa radiation damage in a guinea pig model / H. G. Duan, F. Ji, C. Q. Zheng [et al.] // *J Cell Biochem.* – 2015. – V. 116. – № 2. – P. 331-338.
199. Effects of human amnion-derived mesenchymal stromal cell transplantation in rats with radiation proctitis / M. Ono, S. Ohnishi, M. Honda [et al.] // *Cytotherapy.* – 2015. – V. 17. – № 11. – P. 1545-1559.
200. Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced lung injury / C. Xia, P. Chang, Y. Zhang [et al.] // *Oncol Rep.* – 2016. – V. 35. – № 2. – P. 731-738.
201. Comparison of Treatments With Local Mesenchymal Stem Cells and Mesenchymal Stem Cells With Increased Vascular Endothelial Growth Factor Expression on Irradiation Injury of Expanded Skin / S. Öksüz, M. Ş. Alagöz, H. Karagöz [et al.] // *Ann Plast Surg.* 2015. – V. 75. – № 2. – P. 219-230.
202. Intravenous delivery of adipose-derived mesenchymal stromal cells attenuates acute radiation-induced lung injury in rats / X. Jiang, X. Jiang, C. Qu [et al.] // *Cytotherapy.* – 2015. – V. 17. – № 5. – P. 560-570.

203. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model / S. Gao, Z. Zhao, R. Wu [et al.] // *Radiat Environ Biophys.* – 2017. – V. 56. – № 1. – P. 63-77.
204. Adipose mesenchymal stromal cells minimize and repair radiation-induced oral mucositis / O. M. Maria, M. Shalaby, A. Syme [et al.] // *Cytotherapy.* – 2016. – V. 18. – № 9. – P. 1129-1145.
205. Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells combined with nimodipine against radiation-induced brain injury through inhibition of apoptosis / G. H. Wang, Y. Liu, X. B. Wu [et al.] // *Cytotherapy.* – 2016. – V. 18. – № 1. – P. 53-64.
206. Synergistic effect of human Bone Morphogenic Protein-2 and Mesenchymal Stromal Cells on chronic wounds through hypoxia-inducible factor-1 α induction / S. François, V. Eder, K. Belmokhtar [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – V. 7. – № 1. – Article: 4272.
207. Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improve the Quality and Stability of Vascularized Flap Surgery of Irradiated Skin in Pigs / C. Linard, M. Brachet, C. Strup-Perrot [et al.] // *Stem Cells Transl Med.* – 2018. – V. 7. – № 8. – P. 569-582.
208. Long-term effectiveness of local BM-MSCs for skeletal muscle regeneration: a proof of concept obtained on a pig model of severe radiation burn / C. Linard, M. Brachet, B. L'homme [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2018. – V. 9. – № 1. – Article: 299.
209. Therapeutic Effects of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells on Canine Radiation-Induced Lung Injury / Y. Hao, Y. Ran, B. Lu [et al.] // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2018. – V. 102. – № 2. – P. 407-416; 2019. – V. 103. – № 1. – P. 287. [correction of the erratum].
210. Safety and Efficacy of Autologous Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells for Radiation-Induced Xerostomia: A Randomized, Placebo-Controlled Phase I/II Trial (MESRIX) / C. Grønhøj, D. H. Jensen, P. Vester-Glowinski [et al.] // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2018. – V. 101. – № 3. – P. 581-592.

211. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve irradiation-induced skin ulcers healing of rat models / Z. Liu, D. Yu, J. Xu [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – V. 101. – P. 729-736.
212. Decorin-Modified Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Attenuate Radiation-Induced Lung Injuries via Regulating Inflammation, Fibrotic Factors, and Immune Responses / D. Liu, F. Kong, Y. Yuan [et al.] // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2018. – V. 101. – № 4. – P. 945-956.
213. Therapeutic effect of dental pulp stem cell transplantation on a rat model of radioactivity-induced esophageal injury / C. Zhang, Y. Zhang, Z. Feng [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2018. – V. 9. – № 7. – Article: 738.
214. Labial Stem Cell Extract Mitigates Injury to Irradiated Salivary Glands / X. Su, Y. Liu, M. Bakkar [et al.] // *J Dent Res.* – 2020. – V. 99. – № 3. – P. 293-301.
215. Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) on radiation-induced skin damage in rats / B. Khademi, S. Safari, M. A. Mosleh-Shirazi [et al.] // *Stem Cell Investig.* – 2020. – V. 7. – Article: 12.
216. Case Report: Industrial X-Ray Injury Treated With Non-Cultured Autologous Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction (SVF) / C. J. Iddins, S. R. Cohen, R. E. Goans [et al.] // *Health Phys.* – 2016. – V. 111. – № 2. – P. 112-116.
217. Local Radiolesion in X-Ray Inspection Specialists / A. S. Samoylov, A. Y. Bushmanov, I. A. Galstyan [et al.] // *Radiat Prot Dosimetry.* – 2016. – V. 171. – № 1. – P. 117-120.
218. First-in-man mesenchymal stem cells for radiation-induced xerostomia (MESRIX): study protocol for a randomized controlled trial / C. Grønhøj, D. H. Jensen, P. V. Glovinski [et al.] // *Trials.* – 2017. – V. 18. – № 1. – Article: 108.
219. The neck burn scar contracture: a concept of effective treatment / S. Akita, K. Hayashida, S. Takaki [et al.] // *Burns Trauma.* – 2017. – V. 5. – Article: 22.
220. Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion / M. Brittan, K. M. Braun, L. E. Reynolds [et al.] // *J Pathol.* – 2005. – V. 205. – № 1. – P. 1-13.

221. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts / W. S. Kim, B. S. Park, J. H. Sung [et al.] // *J Dermatol Sci.* – 2007. – V. 48. – № 1. – P. 15-24.
222. Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing / S. R. Park, J. W. Kim, H. S. Jun [et al.] // *Mol Ther.* – 2018. – V. 26. – № 2. – P. 606-617.
223. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice / T. de Mayo, P. Conget, S. Becerra-Bayona [et al.] // *PLoS One.* – 2017. – V. 12. – № 6. – Article: e0177533.
224. Gingival Mesenchymal Stem Cells from Wistar Rat's Gingiva (*Rattus Novergicus*) – Isolation and Characterization (In Vitro Study) / A. P. Nugraha, I. B. Narmada, D. S. Ernawati [et al.] // *J Int Dent Med Res.* – 2018. – V. 11. – № 2. – P. 694-699.
225. Экспериментальная модель тяжелых местных лучевых поражений кожи после действия рентгеновского излучения / К. В. Котенко, Б. Б. Мороз, Т. А. Насонова [и др.] // *Пат. физиол. и эксперим. терапия.* – 2013. – № 3. – С. 121-123.
226. Заживление тканей в области тяжелого местного лучевого поражения кожи при геноопосредованной индукции ангиогенеза препаратом «Неоваскулген» / П. С. Еремин, Р. В. Деев, И. Я. Бозо [и др.] // *Журнал анатомии и гистопатологии.* – 2020. – Т. 9. – № 2. – С. 26-34.
227. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis / Y. Wu, L. Chen, P. G. Scott, E. E. Tredget // *Stem Cells.* – 2007. – V. 25. – № 10. – P. 2648-2659.
228. Lee, D. E. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy / D. E. Lee, N. Ayoub, D. K. Agrawal // *Stem Cell Res Ther.* – 2016. – V. 7. – Article: 37.
229. Jung, J. H. Exosomes Generated From iPSC-Derivatives: New Direction for Stem Cell Therapy in Human Heart Diseases / J. H. Jung, X. Fu, P. C. Yang // *Circ Res.* – 2017. – V. 120. – № 2. – P. 407-417.

230. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions / S. Ohnishi, H. Sumiyoshi, S. Kitamura, N. Nagaya // *FEBS Lett.* – 2007. – V. 581. – № 21. – P. 3961-3966.
231. Mesengenic differentiation: comparison of human and rat bone marrow mesenchymal stem cells / A. Scuteri, E. Donzelli, D. Foudah [et al.] // *Int J Stem Cells.* – 2014. – V. 7. – № 2. – P. 127-134.
232. Comparison of Endothelial Differentiation Capacities of Human and Rat Adipose-Derived Stem Cells / H. Orbay, K. Devi, P. A. Williams [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2016. – V. 138. – № 6. – P. 1231-1241.
233. Brett, D. A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings / D. Brett // *Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice.* – 2008. – V. 20. – № 12. – P. 347-356.
234. Exosomes are comparable to source adipose stem cells in fat graft retention with up-regulating early inflammation and angiogenesis / B. Chen, J. Cai, Y. Wei [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 2019. – V. 144. – № 5. – P. 816e-827e.
235. Lozito, T. P. Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs / T. P. Lozito, R. S. Tuan // *J Cell Physiol.* – 2011. – V. 226. – № 2. – P. 385-396.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель генерального
директора

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им.

А.И. Бурназяна ФМБА России

А.Ю. Бушманов

«26» января 2024 г.

А К Т

внедрения результатов диссертационного исследования

Брунчукова Виталия Андреевича на тему:

«Экспериментальное применение клеточных технологий при радиационных
ожогах»

В Центр биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, выполненной в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный Центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России.

1. Наименование предложения: изучение эффективности применения МСК плаценты человека, слизистой десны человека и их паракринных факторов в составе концентратов кондиционированных сред при местных лучевых поражениях кожи у лабораторных животных.
2. Аннотация: методы лечения (МСК, концентраты культуральной и кондиционированных сред в дозе 2 млн на 1 кг) эффективны при МЛП кожи и приводят к сокращению площади поражения, ускоренному заживлению язвы, улучшению регенеративных процессов (ускорение перехода раневого процесса в стадию регенерации и эпителизации). Кроме того, применение МСК слизистой десны человека приводит к улучшению васкуляризации и уменьшению

воспалительных процессов в очаге лучевого поражения в большей степени, чем аналогичные клетки, полученные от лабораторных животных (крысы).

3. Эффект от внедрения: Полученные результаты исследований применения МСК слизистой десны и концентрата кондиционированной среды ММК слизистой десны в зависимости от донора биоматериала (человек и крыса) противоположно различаются, которые можно использовать для дальнейшего изучения влияния и оценки методов лечения на процессы регенерации и заживления местных лучевых поражений. Результаты проведенных исследований демонстрируют сокращение язвенной поверхности (от 85 до 95%) МЛП у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения при применении МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека, концентрата кондиционированной среды МСК плаценты человека. Полученные результаты имеют важное теоретическое значение для радиобиологии, комбустологии, хирургии, регенеративной медицины и клеточной терапии, так как вносят существенный вклад в понимание механизмов регенерации кожного покрова при местных лучевых поражениях и позволяют рекомендовать для применения МСК слизистой десны человека и концентрата кондиционированной среды МСК плаценты для эффективного лечения местных лучевых поражений.

4. Место и время использования предложения: Центр биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России 2019-2024 г.

5. Форма внедрения: практическое применение.
6. Патентноспособность: не патентноспособный.
7. Предложение: собственное.
8. Почтовый адрес: 123182, г. Москва, ул. Маршала Новикова, 23

Руководитель Центра биомедицинских и аддитивных технологий Т.А. Астрелина

