

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-001.27:611.018.26

Лебедев В.Г.<sup>1</sup>, Дешевой Ю.Б.<sup>1</sup>, Темнов А.А.<sup>1,4</sup>, Астрелина Т.А.<sup>1</sup>, Рогов К.А.<sup>2</sup>, Насонова Т.А.<sup>1</sup>,  
Лырщикова А.В.<sup>1</sup>, Добрынина О.А.<sup>1</sup>, Склифас А.Н.<sup>3</sup>, Мхитаров В.А.<sup>2</sup>, Трофименко А.В.<sup>4</sup>, Мороз Б.Б.<sup>1</sup>

## Изучение эффектов стромально-васкулярной фракции, культивированных стволовых клеток жировой ткани и паракринных факторов кондиционной среды при терапии тяжелых лучевых поражений кожи у крыс

<sup>1</sup> ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, 123182, г. Москва, Россия, ул. Живописная, д. 46;

<sup>2</sup> ФГБНУ «НИИ морфологии человека», 117418, г. Москва, Россия, ул. Цюрупы, д. 3;

<sup>3</sup> Институт биофизики клетки РАН, 142292, Московская область, г. Пущино;

<sup>4</sup> ФГАОУВО «Московский физико-технический институт» (государственный университет), 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Россия

**Цель** — изучение влияния трансплантации стромально-васкулярной фракции (СВФ), культивированных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) жировой ткани и введения паракринных факторов кондиционной среды, полученных при культивировании ММСК, на течение тяжелых местных радиационных поражений кожи. **Методика.** Крыс инбредной линии Wistar-Kyoto облучали на рентгеновской установке в дозе 110 Гр, при мощности дозы 20,0 Гр/мин. Напряжение на трубке 30 кВ, ток 6,1 мА, фильтр Al толщиной 0,1 мм, площадь поля облучения составляла 8,5 см<sup>2</sup>. Трансплантацию клеток СВФ жировой ткани проводили двукратно в дозах 2,2 × 10<sup>6</sup> и 3,0 × 10<sup>6</sup> на 28-е и 35-е сут после облучения, соответственно. Культивированные ММСК вводили в дозах 2,8 × 10<sup>6</sup> и 3,4 × 10<sup>6</sup> на 28-е и 35-е сут после действия радиации. Паракринные факторы кондиционной среды вводили пятикратно с 1-х по 10-е сут после облучения, подкожно по 1,0 мл (общий белок 8 мг/мл). Тяжесть лучевого поражения кожи и эффекты терапии оценивали в динамике по клиническим проявлениям, с помощью планиметрии и патоморфологических методов. **Результаты.** Выбранный режим радиационного воздействия вызывал тяжелые лучевые поражения кожи с длительно (до 5 мес) незаживающими язвами. Площадь лучевых язв у крыс контрольной группы в период с 28-х до 84-х сут медленно уменьшалась от 2,73±0,17 см<sup>2</sup> до 1,52±0,17 см<sup>2</sup>, а через 4 и 5 мес после облучения составляла 0,52±0,15 см<sup>2</sup> и 0,05±0,04 см<sup>2</sup>, соответственно. Во всех опытных группах после 84-х сут отмечалась тенденция к снижению площади лучевых язв, а через 4 мес после облучения уменьшение площади язв и снижение тяжести поражения в опытных группах по сравнению с контролем были статистически значимыми (p < 0,05). У 70-80 % крыс в опытных группах через 4 мес после облучения наблюдалась полная эпителизация радиационных ран с образованием атрофического рубца, а в контрольной группе в этот период атрофические рубцы наблюдались лишь у 40% крыс. **Заключение.** Трансплантация СВФ жировой ткани или культивированных ММСК, а также введение паракринных факторов кондиционной среды способствуют усилению регенераторных процессов в пораженной ткани, и могут быть в равной степени эффективны при терапии тяжелых лучевых поражений кожи в эксперименте.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; стромально-васкулярная фракция; жировая ткань; паракринные факторы; кондиционная среда; рентгеновское излучение; клеточная терапия; лучевые язвы кожи.

**Для цитирования:** Лебедев В.Г., Дешевой Ю.Б., Темнов А.А., Астрелина Т.А., Рогов К.А., Насонова Т.А., Лырщикова А.В., Добрынина О.А., Склифас А.Н., Мхитаров В.А., Трофименко А.В., Мороз Б.Б. Изучение эффектов стромально-васкулярной фракции, культивированных стволовых клеток жировой ткани и паракринных факторов кондиционной среды при терапии тяжелых лучевых поражений кожи у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(1): 24-32.

**DOI: 10.25557/0031-2991.2019.01.24-32**

**Для корреспонденции:** Лебедев Владимир Георгиевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: vgleb468@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

**Поступила** 04.12.2018

Lebedev V.G.<sup>1</sup>, Deshevoy Y.B.<sup>1</sup>, Temnov A.A.<sup>1,4</sup>, Astrelina T.A.<sup>1</sup>, Rogov K.A.<sup>2</sup>, Nasonova T.A.<sup>1</sup>, Lirshchikova A.V.<sup>1</sup>, Dobrynina O.A.<sup>1</sup>, Sklifas A.N.<sup>3</sup>, Mkhitarov V.A.<sup>2</sup>, Trofimenko A.V.<sup>4</sup>, Moroz B.B.<sup>1</sup>

## Study of the effects of stromal vascular fraction, cultured adipose-derived stem cells, and paracrine factors of a conditioned medium in the treatment of severe radiation injuries of rat skin

<sup>1</sup>A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, 46, Zhivopisnaya str., Moscow 123182, Russian Federation;

<sup>2</sup>Research Institute of Human Morphology, Russian Academy of Medical Science, Moscow 117418, Russian Federation;

<sup>3</sup>Institute of Cell Biophysics, of the Russian Academy of Sciences, Moscow region, Pushchino 142292, Russian Federation;

<sup>4</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudnyy, 141701, Moscow region, Russian Federation

**Aim.** To study effects of stromal-vascular fraction (SVF) transplantation, cultured multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) of adipose tissue, and administration of paracrine factors of the conditioned MMSC culture medium on the course of severe, local radiation lesions of the skin. **Methods.** Wistar-Kyoto rats were irradiated with X-rays at a dose of 110 Gy and a dose rate of 20.0 Gy/min. The tube voltage was 30 kV, current – 6.1 mA, filter – 0.1 mm thick A1, and irradiation field area – 8.5 cm<sup>2</sup>. Transplantation of adipose tissue SVF cells was performed twice at doses of  $2.2 \times 10^6$  and  $3.0 \times 10^6$  on the 28th and 35th days after irradiation, respectively. Cultured MMSC was administered at doses of  $2.8 \times 10^6$  and  $3.4 \times 10^6$  on the 28th and 35th days after irradiation. Paracrine factors of the conditioned medium were administered five times from the 1st to the 10th day after irradiation at a dose of 1.0 ml, s.c. (total protein, 8 mg/ml). Severity of radiation damage of the skin and effects of the therapy were followed up by clinical manifestations using planar geometry and pathomorphological methods. **Results.** Radiation exposure under the specified conditions caused severe radiation injuries of the skin with nonhealing ulcers that persisted for up to 5 months after irradiation. In control rats the area of radiation ulcers slowly decreased between the 28th and 84th days from  $2.73 \pm 0.17$  cm<sup>2</sup> to  $1.52 \pm 0.17$  cm<sup>2</sup>, respectively, and was  $0.52 \pm 0.15$  cm<sup>2</sup> and  $0.05 \pm 0.04$  cm<sup>2</sup> at 4 and 5 months after irradiation. In all experimental groups, the healing was more intensive after the 84th day with a tendency to decrease the area of radiation ulcers; at 4 months after irradiation, statistically significant decreases in the area of ulcers and severity of lesions were observed in the experimental groups compared to the control ( $p < 0.05$ ). At four months after irradiation, 70–80% of rats in the treatment groups showed complete epithelialization of radiation wounds with formation of an atrophic scar whereas in the control group during the same period, atrophic scars were observed only in 40% of rats. **Conclusion.** Transplantation of adipose-derived SVF or cultured adipose tissue MMSC as well as administration of paracrine factors of the conditioned medium contributed to the enhancement of regenerative processes in the affected tissue and can be equally effective in the treatment of severe experimental radiation lesions of the skin.

**Keywords:** multipotent mesenchymal stromal cells, stromal vascular fraction, adipose tissue, paracrine factors, conditioned medium, X-ray, cellular therapy, radiation skin ulcers.

**For citation:** Lebedev V.G., Deshevoy Yu.B., Temnov A.A., Astrelina T.A., Rogov K.A., Nasonova T.A., Lirshchikova A.V., Dobrynina O.A., Sklifas A.N., Mkhitarov V.A., Trofimenko A.V., Moroz B.B. Study of the effects of the stromal vascular fraction, cultured adipose-derived stem cells and paracrine factors of the conditioned medium in the treatment of severe radiation injuries of skin in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019, 63(1): 24–32. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.01.24-32

**For correspondence:** Vladimir Lebedev, Candidate of Biology Sciences, Leading Researcher A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia Federation, e-mail: vgleb468@yandex.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Lebedev V.G., <http://orcid.org/0000-0002-4622-7329>

Deshevoy Yu.B., <http://orcid.org/0000-0003-2755-5674>

Nasonova T.A., <http://orcid.org/0000-0003-1511-4329>

Moroz B.B., <http://orcid.org/0000-0002-9982-723X>

**Received** 04.12.2018

## Введение

Широкое применение радиотерапии, радиологических процедур и радиоактивных материалов в ядерной медицине, а также использование источников ио-

низирующих излучений в промышленности может сопровождаться увеличением числа случаев локальных радиационных поражений. Тяжелые лучевые поражения кожи характеризуются развитием длительно незаживающих, хронических язв на фоне нарушения тро-

фики облученной ткани, степень деструкции которой имеет прямую зависимость от мощности, дозы и вида излучения [1-3]. Лечение хронических радиационных язв с применением обычных консервативных методов или пересадки кожи является очень сложной задачей. Даже при оптимальных условиях процесс заживления приводит к фиброзу и формированию атрофических рубцов. Кроме того, радиационные язвы часто инфицированы, что может приводить к сепсису [1, 4]. Значимость и высокая распространенность хронических язв при радиационных поражениях обуславливает актуальность разработки эффективных способов лечения.

В последние годы накоплено большое количество экспериментальных и клинических данных, которые показывают, что перспективным способом лечения местных лучевых поражений является применение клеточной терапии с использованием мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), выделенных из костного мозга или жировой ткани [5-9], причем жировая ткань является предпочтительным источником стволовых клеток. Стволовые клетки жировой ткани могут применяться как в виде культивированных ММСК [6, 7], так и в виде стромально-васкулярной фракции (СВФ) [8, 9]. Высокая концентрация ММСК в СВФ позволяет получать необходимое для трансплантации количество стволовых клеток без наработки их в культуре. Трансплантация стволовых клеток жировой ткани способствует значительному ускорению заживления кожных ран [8-10]. Считается, что благоприятный эффект трансплантации ММСК при различных видах патологических процессов связан с трофическим действием продуцируемых ферментов, цитокинов и ростовых факторов, необходимых для регенерации тканей [11, 12]. Установлено, что паракринные факторы, выделяемые стволовыми клетками в процессе культивирования, могут проявлять стимулирующий эффект на регенерацию при лечении химических и термических поражений [13].

Цель – сравнительное изучение эффектов стромально-васкулярной фракции жировой ткани, культивированных ММСК и паракринных факторов кондиционной среды при терапии тяжелых лучевых поражений кожи в эксперименте.

## Методика

Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Исследование было одо-

брено локальным этическим комитетом института. Эксперименты были выполнены на 40 крысах-самцах инбредной линии Wistar-Kyoto массой 250-280 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (г. Пушкино). Животные содержались в оптимальных для данного вида условиях, на стандартном рационе с свободным доступом к питьевой воде. Условия содержания и процедура эксперимента соответствовали общим правилам работы с использованием экспериментальных животных.

Крыс подвергали локальному воздействию рентгеновского излучения в подвздошно-поясничной области спины на установке ЛНК-268 (РАП 100 – 10) в дозе 110 Гр при мощности дозы 20,0 Гр/мин, напряжении 30 кВ, силе тока 6,1 мА, фильтр 0,1 мм Al, площадь поля облучения на поверхности кожи составляла 8,5 см<sup>2</sup>. Данные условия лучевого воздействия сопровождаются тяжелыми лучевыми поражениями кожи с длительно незаживающими язвами у крыс [14]. После облучения животные были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой:

1-я группа – облученный контроль;

2-я группа – крысы с введением СВФ;

3-я группа – крысы с введением культивированных ММСК;

4-я группа – крысы с введением паракринных факторов кондиционной среды.

Жировую ткань для получения СВФ при каждой трансплантации брали от интактных крыс, которые не использовались в дальнейшем. При заборе биоматериала животных наркотизировали внутрибрюшинным введением препарата «Золетил» (10 мг/кг, Virbac, Франция). Выделение СВФ проводили путем ферментативной обработки размельченной жировой ткани в 0,015 % растворе коллагеназы IA для растворения коллагеновых волокон и освобождения клеток. После центрифугирования и отмычки от фермента получали очищенную СВФ [15, 16]. Клетки СВФ вводили двукратно на 28-е и на 35-е сут после облучения в дозах  $2,2 \times 10^6$  и  $3,0 \times 10^6$ , соответственно.

Для изучения влияния культивированных ММСК жировой ткани использовали клетки второго пассажа, полученные от интактных крыс и наработанные *in vitro* [16]. Культивированные ММСК вводили двукратно в дозе  $2,8 \times 10^6$  и  $3,4 \times 10^6$  на 28-е и 35-е сут после действия радиации, соответственно. Подсчет и оценку жизнеспособности клеток проводили на автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen, США). Содержание живых клеток перед трансплантацией во всех экспериментах составляло 87-95%. Суспензию клеток СВФ или культивированных ММСК в 1 мл стерильного раствора Хенкса вводили под кожу в 5 точек

(по 0,2 мл на точку), вокруг лучевой язвы, отступив 5 мм от края. Паракринные факторы кондиционной среды культивированных ММСК получали по методу [17] и вводили подкожно в объеме 1,0 мл (общий белок 8 мг/мл) в 5 точек вокруг лучевой язвы на 1-е, 3-е, 6-е, 8-е и 10-е сут после облучения. Сроки введения клеточных и паракринных факторов определены на основании ранее проведенных экспериментов. После облучения крыс проводили наблюдение за процессом развития местного лучевого поражения и эффективностью терапии. Течение лучевого поражения кожи оценивали в динамике по клиническим проявлениям, с использованием балльной шкалы оценок [18] и с помощью планиметрии. Планиметрию проводили ежедневно, начиная с 8-х сут после облучения. У каждой крысы в фиксированные отрезки времени измеряли площадь лучевого поражения. Для этого проводили фотосъемку цифровой камерой Canon с последующей обработкой изображений и определением площади язвенной поверхности с помощью программы AutoCad 14. Анализировали динамику изменения площади радиационных ран и тяжести поражения у животных опытных групп по сравнению с облученным контролем.

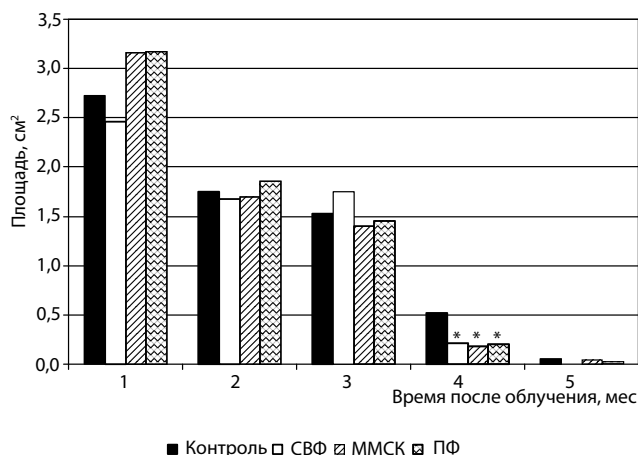
Животных выводили из эксперимента через 5 мес после облучения. Пораженный участок кожи по площади и глубине вырезался с захватом здоровых тканей. Материал фиксировали в 10% забуференном формалине и заливали в парафин. Срезы, толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрическое исследование включало подсчет клеток воспалительного инфильтрата, и среди них – фибробластов и фиброцитов, и рассчитывали отношение фибробластов к общему числу клеток. При анализе проводилась сравнительная количественная оценка клеточного состава созревающей грануляционной ткани в центре и на периферии дна рубцующихся язв.

Количественную обработку данных проводили с помощью программы Image Tool for Windows, v. 3.0 («UTHSCSA», США). После проверки выборки на нормальность распределения вычисляли среднюю арифметическую величину и стандартное отклонение средней арифметической. Проверку статистической значимости различий осуществляли по критерию Стьюдента (t). Математическую обработку количественных данных гистологических препаратов проводили с использованием непараметрической статистики с вычислением медианы и межпроцентильного размаха. Сравнение групп проводили при помощи метода множественных сравнений Krusal-Wallis (пакет статистических программ Statistica-8. «StatSoft»).

## Результаты и обсуждение

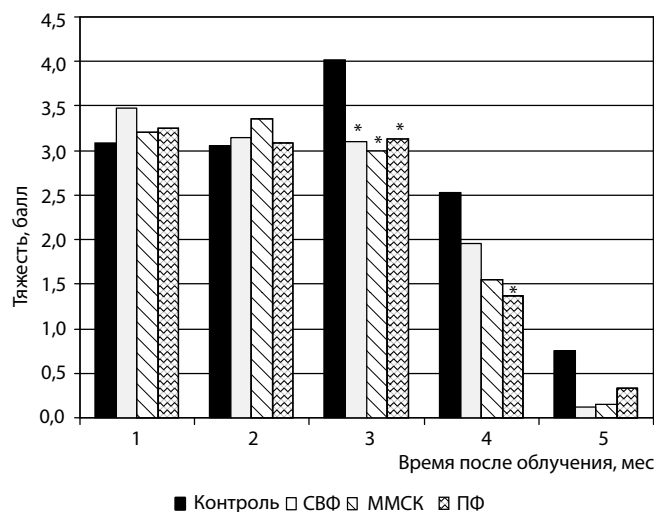
В начальный период после воздействия рентгеновского излучения в дозе 110 Гр при указанных в методах параметрах клиническая картина поражения кожи у всех животных была сходна. Так, на 8–11-е сут после локального облучения отмечались проявления сухого дерматита, а к 14–16 сут начиналась экссудация, и сухой дерматит переходил во влажный. Во всех экспериментальных группах к 21–28-м сут на коже крыс образовывались глубокие лучевые язвы, покрытые плотным струпом темно-коричневого цвета. Далее в контрольной группе животных наблюдалось очень медленное заживление с неравномерным у разных особей течением патологического процесса. Площадь лучевых язв у крыс контрольной группы в период с 28-х до 84-х сут после облучения снижалась в пределах от  $2,73 \pm 0,17$  см<sup>2</sup> до  $1,52 \pm 0,17$  см<sup>2</sup>, соответственно (рис. 1). У некоторых животных контрольной группы язвы сохранялись более 5 мес после облучения, и средняя площадь радиационных ран через 4 и 5 мес после облучения составляла  $0,52 \pm 0,15$  см<sup>2</sup> и  $0,05 \pm 0,04$  см<sup>2</sup>, соответственно.

Динамика изменений площади лучевых язв у крыс в опытных группах, как при трансплантации СВФ или ММСК, так и с введением паракринных факторов, до 3-х мес после облучения значимо не отличалась от показателей у облученных контрольных животных. Затем у крыс опытных групп происходило более интенсивное заживление и наблюдалась тенденция к сни-



**Рис. 1.** Изменения площади лучевых язв после облучения в дозе 110 Гр у крыс контрольной и опытных групп с трансплантацией СВФ, культивированных ММСК и введением паракринных факторов.

По оси ординат – площадь поражения, см<sup>2</sup>; по оси абсцисс – время после облучения (мес); \* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 2.** Тяжесть течения патологического процесса после облучения в дозе 110 Гр у крыс контрольной и опытных групп с трансплантацией СВФ, культивированных ММСК и введением паракринных факторов. По оси ординат – тяжесть поражения, баллы; по оси абсцисс – время после облучения (мес); \* – показатели статистически значимо отличающиеся от контроля ( $p < 0,05$ ).

жению площади лучевых язв, а через 4 мес после облучения уменьшение площади лучевых язв у крыс в опытных группах по сравнению с контролем достигло статистически значимого уровня ( $p < 0,05$ ). На 140-е сут после облучения средняя площадь ран в группах с трансплантацией клеток СВФ, культивированных ММСК или введением паракринных факторов составляла  $0,004 \pm 0,002 \text{ см}^2$ ,  $0,004 \pm 0,003 \text{ см}^2$  и  $0,02 \pm 0,02 \text{ см}^2$ , по сравнению с  $0,05 \pm 0,04 \text{ см}^2$  в облученном контроле, соответственно.

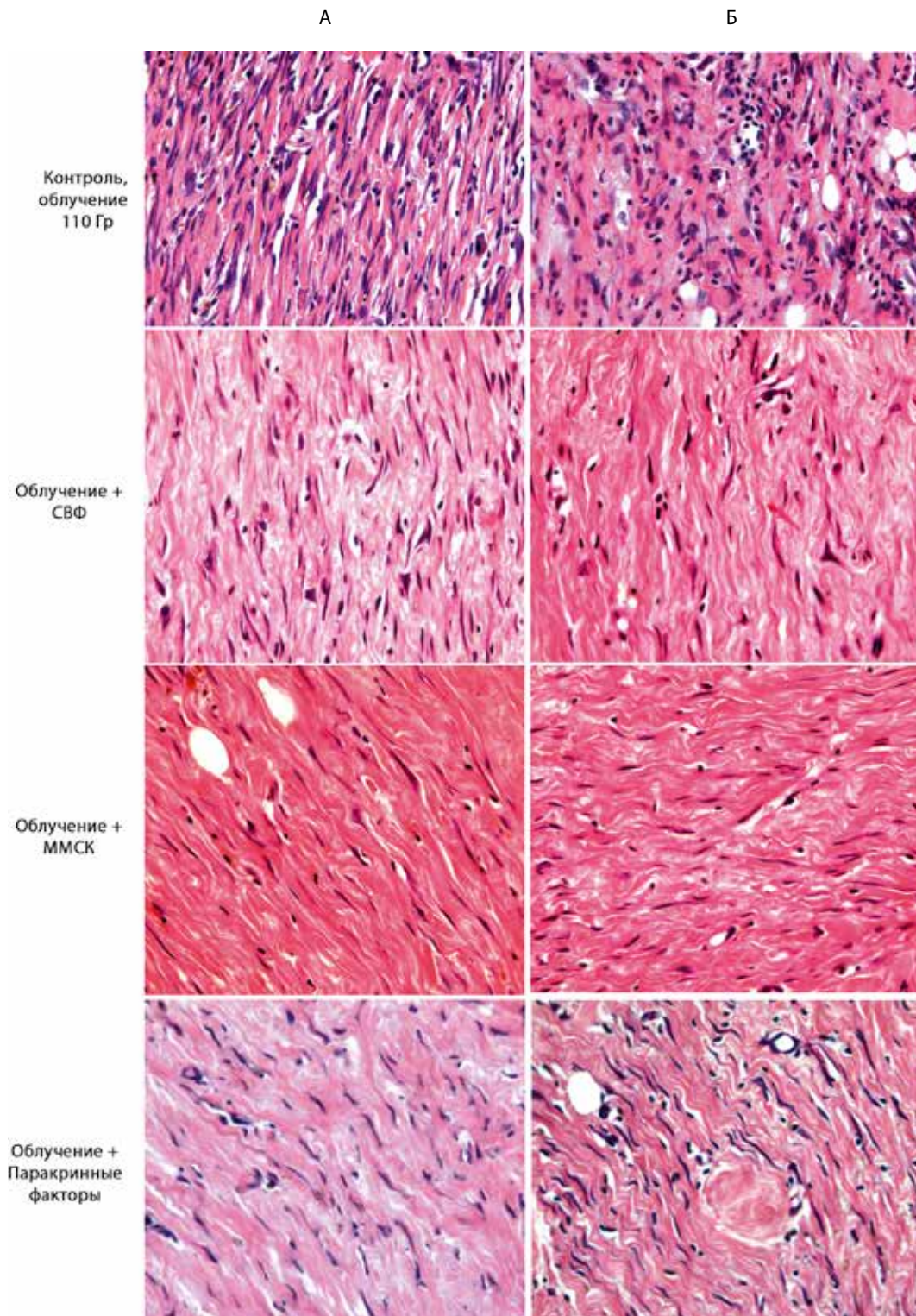
По динамике тяжести клинических проявлений лучевого поражения, выраженной в баллах, животные опытных групп отличались от контрольной группы более легким течением (рис. 2). Начиная с 84-х сут после облучения, различия тяжести поражения в контрольной и опытной группах были статистически значимыми ( $p < 0,05$ ). Визуально струпы у крыс в опытных группах были более тонкими и поверхностными, чем в контрольной группе. Через 4 мес после облучения у 70-80 % крыс в опытных группах наблюдалась полная эпителизация ран с образованием атрофического рубца, а в контрольной группе в этот период атрофические рубцы наблюдались лишь 40% крыс.

Для оценки состояния пораженной кожи по истечении 5 мес после облучения и видимого заживления лучевых язв проводили гистологические исследования (рис. 3). Во всех группах крыс отмечена полная эпителизация поврежденной кожи. Новообразованный эпидермис характеризовался многорядностью и содержал роговой слой. Подлежащая рубцующаяся ткань была неравномерной толщины, с участками гиалиноза. Наиболее широкий рубцовый слой отмечался у животных контрольной группы. В поверхностных участках выявлены сосуды с утолщенными стенками. Придатки кожи в области заживших язв отсутствовали во всех группах животных. В подкожной мышце выявлялись деформирующие рубцовые изменения с умеренной диффузной круглоклеточной инфильтрацией. Из-за разрастания фиброзной ткани в глубоких отделах язвенных дефектов, жировой клетчатке количество липоцитов было снижено, наиболее отчетливо грубые склеротические изменения выявлены у животных контрольной группы.

Таблица

**Количественная оценка клеточных популяций в участке пораженной кожи у животных различных групп через 5 мес после облучения**

Группы	Показатели	Ме (25;75 процентиля)
Контроль, облучение 110 Гр	Все клетки воспалительного инфильтрата	238,5 (177; 375)
	Фибробласты, фиброциты	127,5 (102,5; 171,5)
	Отношение фибробласты, фиброциты / все клетки	0,53 (0,43; 0,59)
Облучение + СВФ	Все клетки воспалительного инфильтрата	167,5 (139,5; 193)
	Фибробласты, фиброциты	123 (102,5; 154)
	Отношение фибробласты, фиброциты / все клетки	0,79 (0,7; 0,85)
Облучение + ММСК	Все клетки воспалительного инфильтрата	185 (148,5; 199,5)
	Фибробласты, фиброциты	151 (111; 177,5)
	Отношение фибробласты, фиброциты / все клетки	0,88 (0,83; 0,93)
Облучение + Паракринные факторы	Клетки воспалительного инфильтрата	177 (134,5; 247,5)
	Фибробласты, фиброциты	130 (97; 187,5)
	Отношение фибробласты, фиброциты / все клетки	0,74 (0,71; 0,8)



**Рис. 3.** Микропрепараты периферической (А) и центральной зоны (Б) радиационного повреждения кожи у крыс из контрольной и опытных групп - с трансплантацией СВФ, культивированных ММСК и введением паракринных факторов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 40$ .

Количественные морфометрические исследования показали, что в соединительной ткани дермы у леченых животных выявлено снижение численности иммунокомпетентных клеток и относительное увеличение содержания фибробластов и фиброцитов (таблица). Эти данные, свидетельствуют о снижении воспалительной реакции и ускорении созревания грануляционной ткани в коже леченых животных, что создает благоприятные условия для завершения регенераторных процессов.

В настоящее время возможности применения ММСК жировой ткани для стимулирования заживления ран и регенерации тканей были продемонстрированы на различных экспериментальных моделях [4-9]. Вместе с тем, окончательно не выбран оптимальный источник стволовых клеток для эффективной терапии тяжелых местных лучевых поражений. В эксперименте и клинике применялись как культивированные ММСК, так и СВФ жировой ткани, причем наличие гетерогенного клеточного состава СВФ может приводить к лучшим терапевтическим результатам, которые наблюдались в сравнительных исследованиях на животных [19-21]. Преимуществом применения СВФ по сравнению с использованием культивированных ММСК является то, что, обладая противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами, влиянием на ангиогенез, эти клетки могут быть получены без проведения дополнительной обработки и создания специальных условий культивирования. Роль ММСК в заживлении кожных ран, по-видимому, связана с их противовоспалительными свойствами, которые опосредуются высвобождением растворимых паракринных факторов.

Проведенное исследование показывает, что у животных, подвергнутых очень высоким дозам облучения (110 Гр), введение паракринных факторов кондиционной среды может оказывать стимулирующее влияние на заживление лучевых язв, сопоставимое с эффектами трансплантации стволовых клеток жировой ткани. Возможно, что все 3 терапевтических воздействия (введение после облучения СВФ, ММСК или паракринных факторов) осуществляются через механизмы, связанные с усилением регенерационных процессов в связи с освобождением ткани от поврежденных структур, причем выраженность регенерации может иметь свои пределы, что и проявляется в сходстве эффектов на течение лучевых поражений.

Полученные данные позволяют предполагать, что применение препарата, содержащего паракринные факторы кондиционной среды, при комбинированном лечении тяжелых местных радиационных поражений кожи может уменьшить степень воспалительной реакции, и создать благоприятные условия для проведения

клеточной терапии с использованием мезенхимальных стволовых клеток.

Таким образом, трансплантация СВФ и культивированных ММСК жировой ткани, а также введение паракринных факторов кондиционной среды могут в равной степени стимулировать восстановление кожи при тяжелых местных лучевых поражениях, и способствуют более раннему заживлению хронических лучевых язв.

### Литература

1. *Радиационная медицина. Руководство для врачей-исследователей и организаторов здравоохранения.* Под ред. Л.А. Ильина. М.; ИздАТ. 2001; Т. 2.
2. Бушманов А.Ю., Надежина Н.М., Нугис В.Ю., Галстян И.А. Местные лучевые поражения кожи человека: возможности биологической индикации дозы (аналитический обзор). *Мед. радиол. и радиац. безопасность.* 2005; 50(1): 37–47.
3. Африканова Л.А. *Острая лучевая травма кожи.* М.; Медицина, 1975.
4. Marfia G, Navone SE, Di Vito C, et al. Mesenchymal stem cells: potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. *Organogenesis.* 2015; 11(4): 183–206. Published online 2015 Dec 10. DOI: 10.1080/15476278. 2015.1126018.
5. Francois S, Mouiseddine M, Mathieu N, et al. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Annals of Hematology.* 2007; 86(1): 1–8.
6. Huang S-P, Huang C-H, Shyu J-F, et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. *J. Biomed. Sci.* 2013; 20(1): 51–60.
7. Forcheron F, Agay D, Scherthan H, et al. Autologous adipose-derived stem cells favour healing in minipig model treatment of cutaneous radiation syndrome. *PLOS One.* February 2012; 7(2). e 31694. DOI: 10.1371/journal.pone.0031694.
8. Akita S, Akino K, Hirano A, et al. Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury. *Stem cells int.* 2010 Dec1; 2010:532704. DOI:10.4061/2010/532704.
9. Лебедев В.Г., Насонова Т.А., Дешевой Ю.Б. и др. Влияние трансплантации сингенных клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани на течение тяжелых местных лучевых поражений у крыс после действия рентгеновского излучения. *Рад. биол. Радиоэкология.* 2017; 57(3): 264–71.
10. Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 2007; 48(1): 15–24.
11. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, et al. Cell therapy based on a adipose-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler. Thromb. Biol.* 2009; 29(4): 503–10.
12. Feisst V, Meidinger S and Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning.* 2015; 8: 149–62.
13. Темнов А.А., Волкова А.Г., Мелерзанов А.В. и др. Эффект кондиционированной среды, полученной из культивированных мезенхимальных стволовых клеток, на регенерацию эндотелия при HCl-индуцированном повреждении трахеи у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 28–36.
14. Котенко К.В., Мороз Б.Б., Насонова Т.А. и др. Экспериментальная модель тяжелых местных лучевых поражений кожи по-

- сле действия рентгеновского излучения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 57(4): 121–3.
15. Zuk P, Zhu M, Muzuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue implication for cell-based therapeutics. *Tissue Eng*. 2001 Apr; 7(2): 211–28. DOI: 10.1089/107632701300062859.
  16. Bunnell BA, Flaata M, Gagliardi Ch. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008 Jun; 45(2): 115–20. DOI: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
  17. Темнов А.А., Астрелина Т.А., Рогов К.А. и др. Исследование влияния факторов кондиционной среды, полученной при культивировании мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, на течение тяжелых местных лучевых поражений кожи у крыс. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2018; 63(1): 35–9.
  18. Осанов Д.П. *Дозиметрия и радиационная биофизика кожи*. М.; Энергоатомиздат, 1983.
  19. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, et al. Stromal vascular fraction: a regenerative reality? Part 1: current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2016; 69: 170–9. doi: 10.1016/j.bjps.2015.10.015.
  20. Gimble J.M., Guilak F., Bunnell B. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2010 Jun 29; 1(2): 19. doi: 10.1186/scrt19.
  21. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and cultured expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for adipose therapeutics and the International Society for cellular therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013; V. 15: 641–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>.
  8. Akita S, Akino K, Hirano A, et al. Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury. *Stem cells int*. 2010 Dec 1; 2010:532704. DOI:10.4061/2010/532704.
  9. Lebedev VG, Nasonova TA, Deshevoy YuB. et al. Transplantation of autologous cells of the stromal-vascular fraction of adipose tissue in severe local radiation injuries caused by X-ray radiation. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2017; 62(1): 5–11. (in Russian. English abstracts. PubMed).
  10. Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci*. 2007; 48(1): 15–24.
  11. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, et al. Cell therapy based on a adipose-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009; 29(4): 503–10.
  12. Feisst V, Meidinger S and Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning*. 2015; 8: 149–62.
  13. Temnov AA, Volkova AG, Melerzanov AV, et al. Effect of conditioned medium from mesenchymal stem cells on regeneration of endothelium at HCl-induced damage trachea in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya*. 2017; 61(2): 28–36. (in Russian).
  14. Kotenko KV, Moroz BB, Nasonova TA, et al. Experimental model of severe local radiation damage of the skin after the action of X-ray radiation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya*. 2013; 57(4): 121–3. (in Russian).
  15. Zuk P, Zhu M, Muzuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue implication for cell-based therapeutics. *Tissue Eng*. 2001 Apr; 7(2): 211–28. DOI: 10.1089/107632701300062859.
  16. Bunnell BA, Flaata M, Gagliardi Ch. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008 Jun; 45(2): 115–20. DOI: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
  17. Temnov AA, Astrelina TA, Rogov KA, Lebedev VG, Nasonova TA, Lyrschikova AV, et al. Investigation of the Influence of the Conditioning Medium Factors Obtained During the Cultivation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on the Course of Severe Local Radiation Injuries of Skin in Rats. *Meditsinskaya radiologiya i Radiatsionnaya bezopasnost*. 2018; 63(1): 35–9. (in Russian). DOI: 10.12737/article\_5a82eb9a9bbac1.67972336.
  18. Osanov DP. *Dosimetry and radiation biophysics of the skin [Dozimetriya i radiatsionnaya biofizika kozhi]*. Moscow; Energoatomizdat. 1983. (in Russian)
  19. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, et al. Stromal vascular fraction: a regenerative reality? Part 1: current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2016; 69: 170–9. doi: 10.1016/j.bjps.2015.10.015.
  20. Gimble J.M., Guilak F., Bunnell B. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2010 Jun 29; 1(2): 19. doi: 10.1186/scrt19.
  21. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and cultured expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for adipose therapeutics and the International Society for cellular therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013; V. 15: 641–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>.

## References

1. *Radiation Medicine. A guide for medical researchers and health care organizers*. Ed. L.A. Ilyin. Moscow; Izdat. 2001; Vol. 2. 432 pp. (in Russian. English abstracts. PubMed).
2. Bushmanov AYu, Nadezhina NM, Nugis VYu, Galstyan IA. Local radiation damage to human skin: the possibility of a biological dose indication (analytical review). *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2005; 50(1): 37–47. (in Russian. English abstracts. PubMed).
3. Afrikanova LA. *Acute radiation injury to the skin [Ostraya luchevaya travma kozhi]*. Moscow; Meditsina, 1975. (in Russian).
4. Marfia G, Navone SE, Di Vito C, et al. Mesenchymal stem cells: potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. *Organogenesis*. 2015; 11(4): 183–206. Published online 2015 Dec 10. DOI: 10.1080/15476278.2015.1126018.
5. Francois S, Mouseddine M, Mathieu N, et al. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Annals of Hematology*. 2007; 86(1): 1–8.
6. Huang S-P, Huang C-H, Shyu J-F, et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. *J. Biomed. Sci*. 2013; 20(1): 51–60.
7. Forcheron F, Agay D, Scherthan H, et al. Autologous adipose-derived stem cells favour healing in minipig model treatment of cutaneous radiation syndrome. *PLOS One*. February 2012; 7(2). e 31694. DOI: 10.1371/journal.pone.0031694.



**Сведения об авторах:**

*Лебедев Владимир Георгиевич*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России;

*Дешевой Юрий Борисович*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

*Темнов Андрей Александрович*, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт»;

*Астрелина Татьяна Алексеевна*, доктор мед. наук, руководитель центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России;

*Рогов Константин Аркадьевич*, доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. ФГБНУ морфологии человека;

*Насонова Тамара Алексеевна*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России;

*Лырицкова Алла Васильевна*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России;

*Добрынина Ольга Александровна*, науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России;

*Склифас Алла Николаевна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГУН «Институт биофизики клетки РАН»;

*Мхитаров Владимир Аршакович*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ морфологии человека»;

*Трофименко Александр Викторович*, канд. мед. наук, зав. лаб. ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт»;

*Мороз Борис Борисович*, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, зав. лаб. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.