

В.Г. Лебедев, Т.А. Насонова, Ю.Б. Дешевой, А.В. Лырщикова, О.А. Добрынина,
А.С. Самойлов, А.Ю. Бушманов, Б.Б. Мороз
**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК
СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ТЯЖЕЛЫХ
МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЯХ КОЖИ,
ВЫЗВАННЫХ ДЕЙСТВИЕМ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва. E-mail: vgleb468@yandex.ru

В.Г. Лебедев – вед.н.с., к.б.н.; Т.А. Насонова – вед.н.с., к.м.н.; Ю.Б. Дешевой – вед.н.с., к.м.н.; А.В. Лырщикова – вед.н.с., к.б.н.;
О.А. Добрынина – м.н.с.; А.С. Самойлов – ген. директор ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, д.м.н.; А.Ю. Бушманов – первый зам. генерального
директора, д.м.н., профессор; Б.Б. Мороз – зав. лаб., академик РАН, д.м.н.

Реферат

Цель: Исследование эффективности применения аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани при тяжелых местных радиационных поражениях кожи у крыс после воздействия рентгеновского излучения.

Материал и методы: Крыс породы Wistar массой 200–230 г подвергали локальному воздействию рентгеновского излучения в подвздошно-поясничной области спины на установке ЛНК-268 (РАП 100-10) в дозе 110 Гр (напряжение на трубке 30 кВ, ток 6,1 мА, фильтр Al толщиной 0,1 мм), при мощности дозы 17,34 Гр/мин. Площадь поля облучения составляла 8,2–8,5 см². Трансплантацию аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции (СВКФ) жировой ткани проводили однократно на 21-е или на 35-е сут после облучения. Выделение СВКФ осуществляли посредством ферментативной обработки жировой ткани. Суспензию СВКФ вводили подкожно в дозе 1×10⁶ клеток вокруг лучевой язвы. Тяжесть лучевого поражения кожи и эффекты клеточной терапии оценивали в динамике по клиническим проявлениям, с помощью планиметрии и патоморфологических методов.

Результаты: Установлено, что к 17–25-м сут после облучения на коже крыс образовывались лучевые язвы. В контрольной группе животных язвы сохранялись в течение всего периода наблюдения, более 3 мес. Через 83 и 90 сут после облучения площадь язв составляла 1,87±0,35 см² и 1,52±0,24 см² соответственно. У животных опытной группы при трансплантации аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани отмечалось достоверное уменьшение площади язв по сравнению с контрольными животными. У 80 % крыс, которым вводили СВКФ на 21-е сут после облучения, к 90-м сут после воздействия радиации происходило полное заживление язв с образованием атрофического рубца на месте лучевых поражений. Данные клинических и планиметрических наблюдений коррелировали с результатами гистоморфометрии.

Заключение: Трансплантация СВКФ жировой ткани способствует ускорению заживления лучевых язв после локального рентгеновского облучения в эксперименте, что указывает на перспективность использования клеточных продуктов, выделенных из жировой ткани, для терапии тяжелых местных лучевых поражений.

Ключевые слова: стромально-васкулярная фракция, жировая ткань, клеточные технологии, местные лучевые повреждения, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, лучевые язвы кожи

Поступила: 15.06.2016. Принята к публикации: 29.12.2016

Введение

Радиационные поражения кожи и подлежащих тканей могут возникать при неравномерном облучении в аварийных ситуациях, инцидентах с источниками ионизирующих излучений, а также как осложнения после рентгенотерапии и гамма-терапии опухолевых заболеваний. Для лечения больных с лучевыми ожогами в зависимости от периода и тяжести патологического процесса могут использоваться различные консервативные методы лечения, действие которых направлено на уменьшение воспалительной реакции, ограничение некробиотических процессов, улучшение микроциркуляции, обезболивание, борьбу с инфекцией и стимуляцию репаративных процессов. Однако в ряде случаев при консервативном лечении возникают длительно незаживающие лучевые язвы на фоне выраженного нарушения трофики облученных тканей, что требует хирургического вмешательства, которое не всегда возможно из-за общего состояния организма и сопутствующих заболеваний [1–2].

Одним из перспективных методов лечения тяжелых местных лучевых поражений является применение клеточной терапии с использованием мультипотентных мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (ММСК), выделенных из костного мозга [3–6]. ММСК секретируют различные иммуномодулирующие молекулы, которые могут уменьшить степень поражения и увеличить регенерационную активность

пораженных тканей. Вместе с тем, применение ММСК костного мозга сопровождается сложной процедурой забора биоматериала и обязательным длительным этапом культивирования для наработки достаточного количества клеток.

С развитием клеточных технологий все большее распространение приобретают минимально манипулированные аутологичные клеточные продукты, выделенные из жировой ткани [7, 8]. Для клеточной терапии используются как культивированные ММСК, полученные из жировой ткани, так и стромально-васкулярная клеточная фракция жировой ткани [9–11]. Стромально-васкулярная клеточная фракция (СВКФ) содержит стволовые клетки жировой ткани, эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов и их предшественники, перicytes, фибробласты, клетки крови, включая В- и Т-лимфоциты [12, 13]. Количество ММСК в общей популяции клеток СВКФ составляет около 1–5 %, в то время как содержание ММСК в аспирате костного мозга составляет лишь 0,005–0,01 %. Высокая концентрация ММСК в жировой ткани позволяет получать необходимое для трансплантации количество стволовых клеток без их наработки в процессе культивирования.

В настоящее время аутологичная СВКФ жировой ткани используется для лечения дефектов кости [14], при реакции «трансплантат против хозяина» [15], для увеличения объема мягких тканей [16]. В ветеринарии при дегенеративных заболеваниях применение

аутологичной СВКФ считается признанным лечебным воздействием с эффектом улучшения состояния до 80 % [11].

В условиях локальных радиационных поражений ранее было показано, что введение ММСК, полученных из жировой ткани человека, уменьшало кожные повреждения у мышей после действия β -излучения в дозе 45 Гр [17]. На модели мини-свиней, подвергнутых локальному облучению кожи γ -излучением ^{60}Co в дозе 50 Гр, отмечен терапевтический эффект аутологичных культивированных ММСК [18]. Положительный эффект применения аутологичных некультивированных мезенхимальных клеток жировой ткани наблюдался у пациентов, которые имели хронические лучевые поражения различной степени после радиационного воздействия во время диагностических или терапевтических манипуляций [19].

Целью работы явилось изучение влияния аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани на заживление лучевых язв при тяжелых местных радиационных поражениях, вызванных воздействием рентгеновского излучения.

Материал и методы

Эксперименты были выполнены на 40 половозрелых крысах-самцах породы Wistar массой 200–230 г. Животные содержались в оптимальных для данного вида условиях, на стандартном рационе со свободным доступом к питьевой воде. Условия содержания и процедура эксперимента соответствовали общепринятым 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, напряжение 30 кВ, сила тока 6,1 мА, фильтр 0,1 мм Al, площадь поля облучения на поверхности кожи 8,2–8,5 см², при мощности дозы 17,34 Гр/мин. Дозиметрические измерения, проведенные с помощью тканезквивалентного фантома, показали, что при таких условиях облучения доза рентгеновского излучения на глубине 2 мм была порядка 30 Гр, а на глубине 5–10 мм – не более 10 Гр. Условия облучения позволяли ранее получать тяжелые лучевые поражения кожи у крыс с длительно незаживающими язвами [20].

Забор жировой ткани для получения СВКФ проводили под общим наркозом, методом шприцевой липосакции в брюшной и паховой областях, причем материал брали у того же животного, которому впоследствии вводили клеточный продукт.

Выделение СВКФ проводили посредством ферментативной обработки жировой ткани [13]. Измельченную жировую ткань инкубировали 30 мин в 0,015 % растворе коллагеназы I типа (Sigma, США) при 37 °С. Фермент инактивировали средой DMEM (StemCell Technology, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота

(Biological Industries, Израиль). Подсчет и оценку жизнеспособности клеток проводили на автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen, США). Содержание живых клеток составляло $92,1 \pm 5,8$ % при концентрации $1 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$ клеток на 1 мл суспензии. Сразу после подготовки клеточного продукта производилось его введение экспериментальным животным в общем объеме 1 мл путем обкалывания язвы в 5 точках по 0,2 мл суспензии клеток в каждую точку.

Клеточную терапию проводили при однократной трансплантации СВКФ жировой ткани на 21-е или на 35-е сут после облучения. В двух отдельных сериях экспериментов, при разных сроках введения СВКФ после облучения, животные были разделены на группы по 10 крыс в каждой: 1-я группа – контроль, облученные крысы без трансплантации клеток; 2-я группа – крысы, которым на 21-е или 35-е сут после облучения вводили СВКФ.

Для изучения изменений кожи в условиях клеточной терапии у контрольных животных и леченых крыс, которым трансплантировали СВКФ на 35-е сут после облучения, были проведены патоморфологические исследования кожной раны. На 5-е, 13-е и 26-е сут после введения клеток были забиты по 3–4 животных из каждой группы и взяты образцы кожи. Материал фиксировался и обрабатывался согласно рутинной гистологической методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрическое исследование включало определение толщины различных слоев тканей регенерата в области язвы, среднего количества кровеносных сосудов (за исключением капилляров) в поле зрения при стандартном увеличении ($\times 200$).

После облучения крыс проводили наблюдение за процессом развития местного лучевого поражения и эффективностью клеточной терапии. Тяжесть лучевого поражения кожи оценивали в динамике по клиническим проявлениям и с помощью планиметрии. У каждой крысы в фиксированные отрезки времени измеряли площадь лучевого поражения. Для этого проводили цифровую фотосъемку фото-

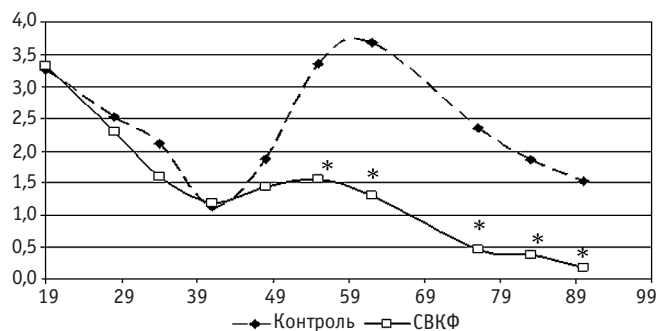


Рис. 1. Динамика заживления лучевых язв у крыс контрольной и опытной группы с введением СВКФ на 21-е сут после облучения. По оси ординат – площадь поражения, см²; по оси абсцисс – время после облучения (сут). * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

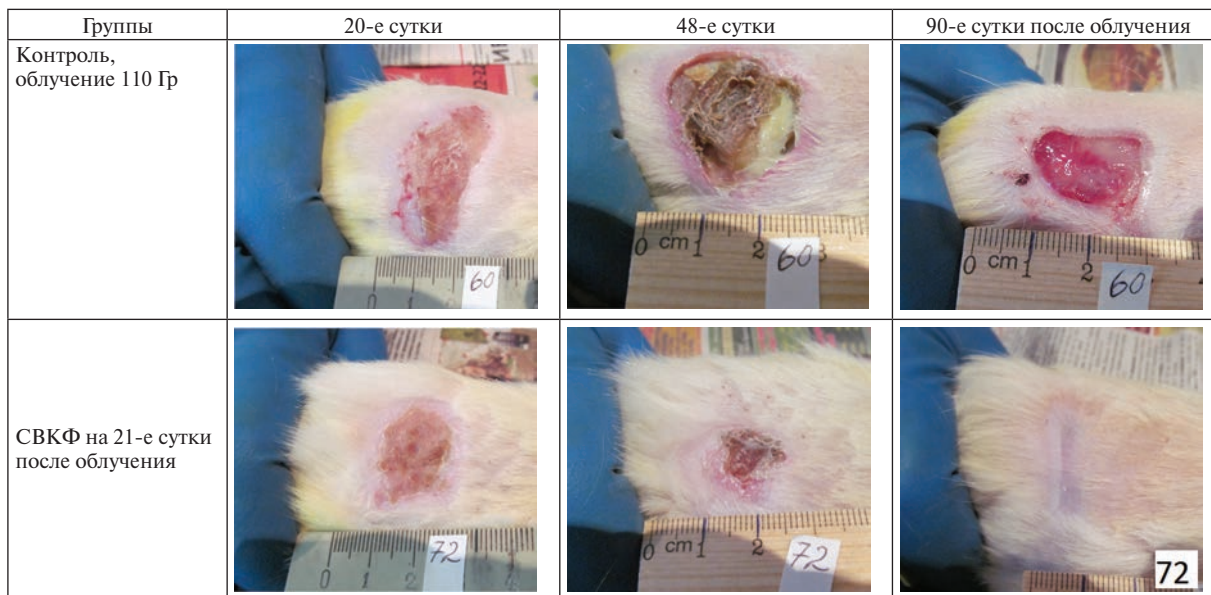


Рис. 2. Внешний вид лучевой язвы на 20-е, 48-е и 90-е сут после облучения у крыс из контрольной и опытной группы с введением СВКФ на 21-е сут после воздействия радиации

камерой Canon с последующей обработкой изображений в программе AutoCad 14 для подсчета площади язвенной поверхности. Анализировали данные по размеру пораженной области у животных в исследуемых группах и различия между группами по изменению площади язв в результате проводимой терапии. Полученные данные обрабатывали непараметрическими методами. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Динамика клинической картины лучевого поражения кожи у всех крыс до 40-х сут после облучения была примерно одинаковой. Латентный период длился 7–9 сут, в это время поражение кожи не определялось визуально. Затем появлялась гиперемия, нарушался нормальный тонус кожи. На 12–13-е сут после облучения у крыс регистрировались проявления сухого дерматита. К 14–16-м сут сухой дерматит переходил во влажный дерматит. К 17–25-м сут после облучения на коже крыс образовывались язвы, которые представляли собой слившиеся очаги с серозно-геморрагическим отделяемым, быстро ссыхающиеся в тонкие коричневые корочки. Затем у всех облученных животных до 40-х сут наблюдалось постепенное уменьшение площади лучевых язв. В дальнейшем у контрольных животных (в двух сериях экспериментов) наблюдалось волнообразное течение процессов местного лучевого поражения, с попеременными улучшениями и ухудшениями. Необходимо отметить, что в период 50–83-е сут после облучения у большинства крыс из контрольной группы не наблюдалось сокращения площади язвенных поверхностей, а было отмечено увеличение площади язв, сопровождающе-

еся усилением воспалительных и некротических процессов в пораженных тканях (рис. 1).

Первые три недели за животными наблюдали, не проводя никакой терапии, фиксируя развитие лучевых язв. После того, как язвы сформировались, было начато введение СВКФ. На рис. 1 представлены изменения площади местного лучевого поражения после облучения у крыс, которым вводили СВКФ на 21-е сут, по сравнению с контрольными животными. Установлено, что при трансплантации клеток СВКФ жировой ткани отмечалось устойчивое уменьшение площади язв, не наблюдалось предпосылок к ухудшению течения патологического процесса, отсутствовало нагноение и не отмечалось значительных проявлений воспалительной реакции. У 80 % животных, которым вводили СВКФ на 21-е сут, к 90-м сут после облучения происходило полное заживление язв с образованием атрофического рубца на месте лучевых поражений. В контрольной группе животных в течение всего периода наблюдения сохранялись зна-

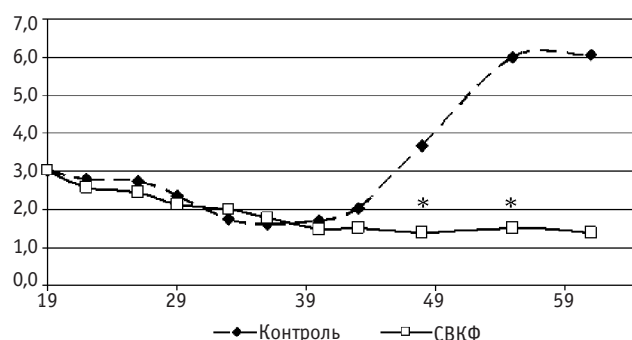


Рис. 3. Изменения площади лучевых язв у крыс контрольной и опытной группы с введением СВКФ на 35-е сут после облучения. По оси ординат – площадь поражения, см²; по оси абсцисс – время после облучения (сут). * – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p < 0,05)

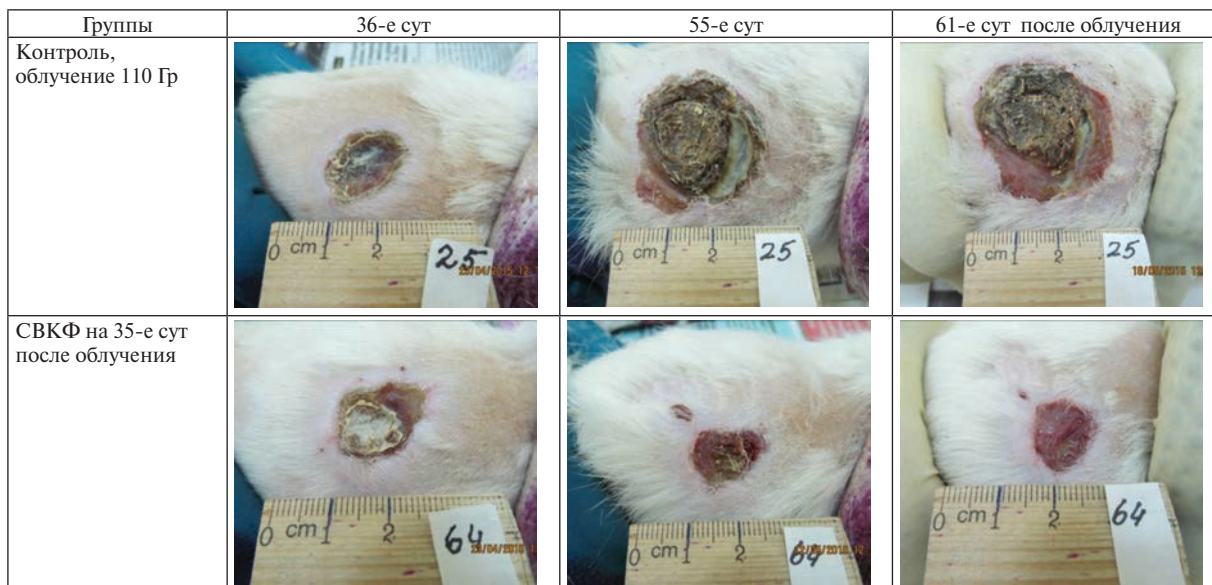


Рис. 4. Лучевые язвы на 36, 55 и 61-е сут после облучения у крыс из контрольной и опытной групп при трансплантации СВКФ на 35-е сут после воздействия радиации

чительные по площади язвы, а в некоторых случаях площадь поражений увеличивалась, и были отмечены усиление воспалительной реакции и появление признаков нагноения язв (рис. 2).

На рис. 3 представлены результаты изменения площади местного лучевого поражения у крыс в условиях трансплантации СВКФ на 35-е сут после локального воздействия рентгеновского излучения по сравнению с контрольными животными данной серии эксперимента. Показано, что однократное введение аутологичной СВКФ в этот период также приводит к стабильной положительной динамике заживления местных лучевых поражений. Площадь местного лучевого поражения в группе животных с введением СВКФ была достоверно меньше, чем в контроле на 48–55-е сут после облучения ($p < 0,05$).

У крыс опытной группы с введением СВКФ на 35-е сут после облучения не наблюдалось выраженной воспалительной реакции и нагноения язв (рис. 4).

Проведенные в 2015 г. Р.В. Деевым и П.С. Ереминым гистологические исследования показали, что

клиническая картина и данные планиметрии у крыс контрольной и опытной группы с введением СВКФ на 35-е сут после воздействия радиации коррелировали с результатами гистоморфометрии. Так, до момента введения аутологичной СВКФ динамика развития тканевого дефекта полностью совпадала с показателями в контрольной группе.

Через 5 сут после введения клеток отмечался незначительный положительный эффект, а спустя 13 сут (48-е сут после облучения) наблюдались уже более явные различия и по большинству параметров (диаметр дефекта эпидермиса, глубина язвенного дефекта, толщина дермы в центре и у края дефекта) они достигали статистической значимости к концу выполнения этой серии экспериментов. В течение первых недель после введения СВКФ наблюдался регенерационный гистогенез во всех тканях, формирующих кожу у облученных животных (рис. 5). Многослойный плоский эпителий (эпидермис) при условии наличия в раневом дефекте сформированной грануляционной ткани или «жировой подушки» из введенных клеток про-

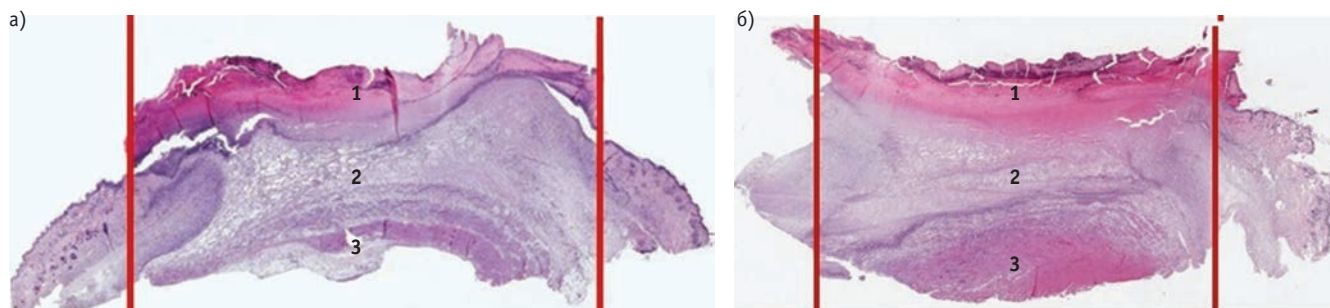


Рис. 5. Гистотопограммы лучевых язв у крыс в условиях введения СВКФ жировой ткани на 35-е сут после локального рентгеновского облучения в дозе 110 Гр. 48-е сут после облучения: а) контроль; б) СВКФ; световая микроскопия. Ув. ×200. Вертикальными линиями отмечены границы живого эпидермиса; 1 – струп; 2 – некротические массы и грануляционная ткань; 3 – кожная мышца

должал центростремительный рост. При этом конус роста был сформирован уплощенными кератиноцитами, располагавшимися в 2–3 слоя. Сохранение струпа, прочно связанного с краями дефекта, в ряде случаев препятствовало эффективному росту эпителиального пласта. Наличие статистически значимых различий в расстоянии до первого дифференцированного эпителиального придатка кожи (волосяного фолликула) говорит о том, что привнесенные в раневой процесс вместе с клеточным трансплантатом факторы способствуют оптимальной гистотипической дифференцировке регенерирующих структур, в частности клеток волосяных фолликулов и желез из относительно малодифференцированных кератиноцитов конуса роста.

Следует отметить, что к финальному сроку наблюдения целостность эпителиального покрытия не была восстановлена полностью даже у животных опытной группы, но при введении СВКФ отсутствовал язвенный дефект подлежащих тканей, и данный локальный объем был занят грануляционной тканью. Обращают на себя внимание различия в состоянии подлежащей реактивно измененной соединительной ткани, формирующей будущую дерму. На ранних сроках обширные объемы тканей в проекции облучения были представлены рыхлыми некротическими массами, включающими в себя фрагментированные коллагеновые волокна, некротически измененные клеточные элементы. У животных опытной группы отек был нивелирован уже к 48-м сут после облучения, что подтверждалось и статистически значимыми различиями в толщине пространства от базальной мембраны до кожной мышцы к 61-м сут после облучения.

Можно предположить, что восстановление местного лучевого поражения при введении СВКФ происходит не только за счет стимуляции нормального функционирования микроциркуляторного русла, но и за счет восстановления всех клеточных дифферонов кожи.

Таким образом, результаты проведенного нами исследования показывают, что применение аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции, полученных из жировой ткани, для лечения тяжелых лучевых поражений дает выраженный терапевтический эффект.

Тяжелые местные лучевые поражения кожи характеризуются развитием длительно незаживающих язвенных дефектов на фоне нарушения трофики облученных тканей. Изменения кожи после облучения являются следствием радиационного поражения стволовых и пролиферирующих клеток эпидермиса и дермы. Немаловажное значение также имеет поражение менее радиочувствительных элементов: эндотелия сосудов, фибробластов, эластической и мышечной оболочек сосудов [21, 22].

Для стимуляции постлучевой регенерации кожи при местных радиационных поражениях представляется перспективным использование стволовых клеток жировой ткани. Так, ранее было показано, что введе-

ние ММСК из жировой ткани человека облученным мышам уменьшало кожные повреждения, причем отмечалось уменьшение фиброза, улучшалась организация коллагена и увеличивалось количество сосудов в соответствии с ревазуляризацией [17]. В экспериментах на крысах показана возможность стимуляции заживления локального радиационного поражения при введении культивированных ММСК, полученных из жировой ткани. Гистологические наблюдения и иммуно-гистохимический анализ в области реэпителизации показали, что эффект был связан с развитием новых кровеносных сосудов [23]. В экспериментах на мини-свиньях также был отмечен положительный эффект трансплантации культивированных стволовых клеток жировой ткани. Наблюдалось улучшение клинического состояния, расширение повторной эпителизации и стимулирование неоангиогенеза [18].

Учитывая гетерогенность популяции СВКФ жировой ткани, по-видимому, её эффект реализуется за счет нескольких патогенетических механизмов. ММСК, которые входят в её состав, способны к дифференцировке в различных направлениях и замещению различных клеток поврежденных участков тканей. Кроме того, СВКФ вырабатывает большое количество паракринных факторов, которые обеспечивают иммуномоделирующий эффект, предотвращают клеточную гибель, способствуют неоангиогенезу, ремоделированию фиброзной и соединительной тканей. За счет тканевых макрофагов в составе СВКФ может осуществляться очистка области поражения от токсичных продуктов распада тканей, что способствует уменьшению воспалительного процесса. Наличие в популяции эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов ускоряет процесс неоангиогенеза под действием ростовых факторов, продуцируемых ММСК. Влияние ММСК на регенерацию кожных повреждений может быть обусловлено их воздействием на течение нескольких механизмов раневого процесса: на приживание стволовых клеток в коже, их миграцию, дифференцировку и внедрение в различные структуры кожи. Определяющее значение для выраженности и длительности функционирования пересаженных клеток имеет степень адекватности микроокружения, т.к. именно физиологически активные вещества микроокружения или сигнальные молекулы определяют реализацию генетической программы пересаженных клеток. Активная миграция стволовых клеток может регулироваться и опосредоваться различными факторами, вырабатываемыми тканями микроокружения при повреждении: хемокинами, адгезивными молекулами и матриксными металлопротеазами [24–26]. По-видимому, стабильность, выраженность и длительность стимулирующего эффекта при использовании СВКФ может находиться в прямой зависимости от количества введенных клеток, от количества сохранившихся клеток в пораженном органе, а также от биологической активности самих трансплантированных клеток.

Заключение

Таким образом, аутологичная стромально-васкулярная клеточная фракция жировой ткани является перспективным материалом для разработки и совершенствования схемы комплексного лечения тяжелых местных радиационных поражений кожи. Внедрение в клиническую практику предполагает дальнейшее накопление экспериментальных данных, которые позволят обосновать оптимальные условия применения клеточной терапии с использованием стволовых клеток жировой ткани, способы и сроки трансплантации в зависимости от степени тяжести радиационного поражения и динамики развития патологического процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Радиационная медицина. Руководство для врачей-исследователей и организаторов здравоохранения. Под ред. Л.А. Ильина. – М.: ИздАТ. 2001. Т. 2. 432 с.
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. Т. 50. № 1. С. 37–47.
3. Мороз Б.Б., Онищенко Н.А., Лебедев В.Г. и соавт. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на течение местных лучевых поражений у крыс после локального β -облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2009. Т. 49. № 6. С. 688–693.
4. Котенко К.В., Мороз Б.Б., Дешевой Ю.Б. и соавт. Сингенные мультипотентные стволовые клетки в терапии длительно незаживающих лучевых язв кожи в эксперименте // Мед. радиол. и радиац. безопасность. 2015. Т. 60. № 2. С. 5–8.
5. Akito S., Akino K., Hiruno A. et al. Proposed regeneration therapy for cutaneous radiation injuries // Acta med. Nagasaki. 2006. Vol. 51. № 4. P. 50–55.
6. Huang L., Burd A. An update review of stem cell applications in burns and wound care // Indian J. Plast. Surg. 2012. Vol. 45. № 2. P. 229–236.
7. Gentile P., Orlandi A., Scioli M.G. et al. Adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery // Stem. Cells Transl. Med. 2012. Vol. 1. № 3. P. 230–236.
8. Gimble J. M., Bunnell B.A., Frazier T. et al. Adipose-derived stromal/stem cells. A primer // Organogenesis. 2013. Vol. 9. № 1. P. 3–10.
9. Nie C., Yang D., Xu J. et al. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis // Cell Transplant. 2011. Vol. 20. P. 205–216.
10. Amos P.J., Kapur S.K., Stapor P.C. et al. Human adipose-derived stromal cells accelerate diabetic wound healing: impact of cell formulation and delivery // Tissue Eng. Part. A. 2010. Vol. 16. P. 1595–1606.
11. Gentile P., Orlandi A., Scioli M.G. et al. Adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery // Stem. Cells Transl. Med. 2012. Vol. 1. № 3. P. 230–236.
12. Zuk P., Zhu M., Muzuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue implication for cell-based therapeutics // Tissue Eng. 2001. Vol. 7. № 2. P. 211–218.
13. Yoshimura K., Suga H., Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation // Regen. Med. 2009. № 4. P. 265–273.
14. Lendeckel S., Jodicke A., Christophis P. et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: Case report // J. Craniomaxillofac Surg. 2004. Vol. 32. № 6. P. 370–373.
15. Fang B., Song Y., Lin Q. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-vs.-host disease in two children // Pediatr. Transplant. 2007. Vol. 11. № 7. P. 814–817.
16. Yoshimura K., Sato K., Aoi N. et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: Efficacy of clinical use of adiposederived stem cells // Dermatol. Surg. 2008. Vol. 34. № 5. P. 1178–1185.
17. Sultan S.M., Stern C.S., Allen R.J.Jr. et al. Human fat grafting alleviates radiation skin damage in a murine model // Plast. Reconstr. Surg. 2011. Vol. 128. P. 363–372.
18. Forcheron F., Agay D., Scherthan H. et al. Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome // PLoS One. 2012. Vol. 7. e31694. P. 1–9.
19. Akita S., Yoshimoto H., Ohtsuru A. et al. Autologous adipose-derived regenerative cells are effective for chronic intractable radiation injuries. // Radiat. Protect. Dosimetry. 2012. Vol. 151. № 4. P. 656–660.
20. Котенко К.В., Мороз Б.Б., Насонова Т.А. и соавт. Экспериментальная модель тяжелых местных лучевых поражений кожи после действия рентгеновского излучения // Пат. физиол. и эксперим. терапия. 2013. № 4. С. 121–123.
21. Африканова Л.А. Острая лучевая травма кожи. – М.: Медицина. 1975. 192 с.
22. Осанов Д.П. Дозиметрия и радиационная биофизика кожи. – М.: Энергоатомиздат. 1983. 47 с.
23. 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. Vol. 20. P. 51–60.
24. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/ CXCR4 interactions // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2001. Vol. 938. P. 83–95.
25. Son B.-R., Marquez-Curtis L.A., Kucia M. et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by SDF-1–CXCR4 and HGF–c-met axes and involves matrix metalloproteinases // Stem Cells. 2006. Vol. 24. № 5. P. 1254–1264.
26. Ries C., Egea V., Karow M. et al. MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines // Blood. 2007. Vol. 109. № 9. P. 4055–4063.

DOI 10.12737/25028

Transplantation of Autologous Cells of Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue in Severe Local Radiation Injuries of Skin Caused by X-rays

V.G. Lebedev, T.A. Nasonova, Yu.B. Deshevoy, A.V. Lyrschikova, O.A. Dobrynina, A.S. Samoylov, A.Yu. Bushmanov, B.B. Moroz

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, Russia. E-mail: vgleb468@yandex.ru

V.G. Lebedev – leading researcher, PhD in Biological Sciences; T.A. Nasonova – leading researcher, PhD in Medical Sciences; Yu.B. Deshevoy – leading researcher, PhD in Medical Sciences; A.V. Lyrschikova – leading researcher, PhD in Biological Sciences; O.A. Dobrynina – junior research fellow; A.S. Samoylov – General Director SRC-FMBC, MD; A.Yu. Bushmanov – First Deputy General Director, MD, Professor; B.B. Moroz – Head of Lab., Academician of RAS, MD.

Abstract

Purpose: To investigate the effectiveness of autologous cells of stromal vascular fraction of adipose tissue in severe local radiation skin injuries after the exposure of rats to X-rays.

Material and methods: Experiments were performed on Wistar rats, weighing 200–230 g. Rats were exposed locally in ilio-lumbar region using X-ray machine LNC-268 (RAP 100-10) at a dose of 110 Gy (30 kV tube voltage, current 6.1 mA, thick Al filter 0.1 mm), dose rate: 17.34 Gy/min. Area of the irradiation field was 8.2–8.5 cm². Transplantation of autologous cells of stromal vascular fraction (SVFC) of adipose tissue was carried out on 21st or 35th days after irradiation. SVFC isolation was performed by means of enzymatic treatment of adipose tissue. SVFC suspension was administered subcutaneously at a dose of 1×10⁶ cells per injection around the radiation ulcers. The severity of radiation damage to the skin and the effects of cellular therapy were evaluated in the dynamics of clinical manifestations, with the help of plane geometry and pathomorphometry.

Results: It was found that by the 17–25th day after irradiation radiation ulcers were formed on rat skin. In the control group of animals ulcers persisted throughout the observation period of more than 3 months. The area of ulcers was 1.87 ± 0.35 cm² and 1.52 ± 0.24 cm² at 83th and 90th days after irradiation, respectively. In animals of the experimental group, with autologous stromal vascular fraction of adipose tissue, was significant decrease in ulceration the area in comparison to control animals. In 80 % of the rats treated with SVFC on 21st day after exposure, to the 90th day after irradiation complete healing of ulcers occurred with the formation of atrophic scar at the site of radiation injuries. These clinical observations and planimetric were correlated with the results of histomorphometry.

Conclusion: Transplantation autologous SVFC of adipose tissue contributes to accelerate the healing of radiation ulcers after local x-ray exposure in the experiment, indicating that the prospects of using adipose tissue cell products for the treatment of severe local radiation injuries.

Key words: stromal vascular fraction, adipose tissue, cell technology, local radiation damage, multipotent mesenchymal stromal cells, radiation skin ulcers

REFERENCES

- Radiacionnaja medicina. Rukovodstvo dlja vrachej-issledovatelej i organizatorov zdravoohranenija. Pod red. L.A. Il'ina. – M.: IzdAT. 2001. T. 2. 432 s.
- Bushmanov A.Ju., Nadezhina N.M., Nugis V.Ju., Galstjan I.A. Mestnye luchevee porazhenija kozhi cheloveka: vozmozhnosti biologicheskij indikacii dozy (analiticheskij obzor) // Med. radiol. i radiac. bezopasnost'. 2005. T. 50. № 1. S. 37–47.
- Moroz B.B., Onishhenko N.A., Lebedev V.G. et al. Vlijanie mul'tipotentnyh mezenhimal'nyh stromal'nyh kletok kostnogo mozga na techenie mestnyh luchevyh porazhenij u krysa posle lokal'nogo β -obluchenija // Radiacionnaja biologija. Radioekologija. 2009. T. 49. № 6. S. 688–693.
- Kotenko K.V., Moroz B.B., Deshevoj Ju.B. et al. Singennyje mul'tipotentnye stvolovye kletki v terapii dlitel'no nezahivajushhih luchevyh jazv kozhi v jeksperimente // Med. radiol. i radiac. bezopasnost'. 2015. T. 60. № 2. S. 5–8.
- Akito S., Akino K., Hiruno A. et al. Proposed regeneration therapy for cutaneous radiation injuries // Acta med. Nagasak. 2006. Vol. 51. № 4. P. 50–55.
- Huang L., Burd A. An update review of stem cell applications in burns and wound care // Indian J. Plast. Surg. 2012. Vol. 45. № 2. P. 229–236.
- Gentile P., Orlandi A., Scioli M.G. et al. Adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery // Stem. Cells Transl. Med. 2012. Vol. 1. № 3. P. 230–236.
- Gimble J.M., Bunnell B.A., Frazier T. et al. Adipose-derived stromal/stem cells. A primer // Organogenesis. 2013. Vol. 9. № 1. P. 3–10.
- Nie C., Yang D., Xu J. et al. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis // Cell Transplant. 2011. Vol. 20. P. 205–216.
- Amos P.J., Kapur S.K., Stapor P.C. et al. Human adipose-derived stromal cells accelerate diabetic wound healing: impact of cell formulation and delivery // Tissue Eng. Part. A. 2010. Vol. 16. P. 1595–1606.
- Gentile P., Orlandi A., Scioli M.G. et al. Adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery // Stem. Cells Transl. Med. 2012. Vol. 1. № 3. P. 230–236.
- Zuk P., Zhu M., Muzuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue implication for cell-based therapeutics // Tissue Eng. 2001. Vol. 7. № 2. P. 211–218.
- Yoshimura K., Suga H., Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation // Regen. Med. 2009. № 4. P. 265–273.
- Lendeckel S., Jodicke A., Christophis P. et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: Case report // J. Craniomaxillofac Surg. 2004. Vol. 32. № 6. P. 370–373.
- Fang B., Song Y., Lin Q. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-vs.-host disease in two children // Pediatr. Transplant. 2007. Vol. 11. № 7. P. 814–817.
- Yoshimura K., Sato K., Aoi N. et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipotrophy: Efficacy of clinical use of adiposederived stem cells // Dermatol. Surg. 2008. Vol. 34. № 5. P. 1178–1185.
- Sultan S.M., Stern C.S., Allen R.J.Jr. et al. Human fat grafting alleviates radiation skin damage in a murine model // Plast. Reconstr. Surg. 2011. Vol. 128. P. 363–372.
- Forcheron F., Agay D., Scherthan H. et al. Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome // PLoS One. 2012. Vol. 7. e31694. P. 1–9.
- Akita S., Yoshimoto H., Ohtsuru A. et al. Autologous adipose-derived regenerative cells are effective for chronic intractable radiation injuries. // Radiat. Protect. Dosimetry. 2012. Vol. 151. № 4. P. 656–660.
- Kotenko K.V., Moroz B.B., Nasonova T.A. et al. Eksperimental'naja model' tjazhelyh mestnyh luchevyh porazhenij kozhi posle dejstvija rentgenovskogo izluchenija // Pat. fiziol. i jeksperim. terapija. 2013. № 4. S. 121–123.
- Afrikanova L.A. Ostraja luchevejaja travma kozhi. – M.: Medicina. 1975. 192 s.
- Osanov D.P. Dozimetrija i radiacionnaja biofizika kozhi. – M.: Jenergoatomizdat. 1983. 47 s.
- 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. Vol. 20. P. 51–60.
- Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/ CXCR4 interactions // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2001. Vol. 938. P. 83–95.
- Son B.-R., Marquez-Curtis L.A., Kucia M. et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by SDF-1–CXCR4 and HGF–c-met axes and involves matrix metalloproteinases // Stem Cells. 2006. Vol. 24. № 5. P. 1254–1264.
- Ries C., Egea V., Karow M. et al. MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines // Blood. 2007. Vol. 109. № 9. P. 4055–4063.