

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕРАПЕВТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО
МОЗКУ ПРИ РАДІАЦІЙНИХ УРАЖЕННЯХ ШКІРИ У ЩУРІВ**

Кваліфікаційна робота
студентки 4 курсу, група БЗБТ-41
Підлісної Діани Олександрівни

Науковий керівник:
систент
Бондар Анастасія Юріївна

Науковий консультант:
Завідувач лабораторії
протирадіаційних засобів і
клітинних технологій ДУ «ІМРО
НАМН України», канд. біол. наук,
Узленкова Наталія Євгенівна

Допущено до захисту

2024 р.

Завідувач кафедри

д.б.н., проф. Божков Анатолій Іванович

Голова ЕК

Оцінка

.....2024 р

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

Робота включає 60 сторінок, містить 8 рисунків та 7 таблиць. Список використаної літератури містить 71 джерела, з них 71 – іноземні.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку, радіаційні ураження шкіри, локальне опромінення, експериментальна модель.

Радіаційні ураження шкіри погано піддається лікуванню та зараз клітинна терапія мезенхімальними стромальними клітинами (МСК), розглядається як перспективна лікувальна стратегія.

Актуальними є експериментальні дослідження у моделях на тваринних за визначенням ефективних варіантів лікування з допомогою МСК.

У даній роботі досліджено терапевтична активність МСК, виділених з кісткового мозку (МСК КМ), в експериментальній моделі радіаційних уражень шкіри у щурів.

Для цього була створена експериментальна модель радіаційного ураження шкіри за локальним опроміненням стегна щурів у дозі 50 Гр, проведено ізолювання та експансія МСК КМ при культивуванні *ex vivo* і вивчення їх терапевтичної ефективності при системному і місцевому введенні щурам з радіаційними ураженнями шкіри. У роботі представлений огляд та аналіз літератури про біологічні властивості та характеристики МСК КМ, механізми їх терапевтичної дії та можливості лікування МСК КМ радіаційних уражень шкіри.

ANNOTATION

The work includes 60 pages, contains 8 figures and 7 table. The list of used literature contains 71 sources, of which 71 are foreign.

Key words: bone marrow mesenchymal stromal cells, radiation skin damage, local irradiation, experimental model.

Radiation skin damage is difficult to treat and currently cell therapy with mesenchymal stromal cells (MSCs) has been considered as a promising treatment strategy.

Experimental studies on animal models are relevant to determine effective treatment options using MSC.

In the work the therapeutic activity of MSCs isolated from the bone marrow (BM MSC) was study in an experimental model of radiation skin damage in rats.

For this the experimental model of radiation skin damage was establishment by local irradiation of the rats thigh at a dose 50 Gy, the isolation and expansion of BM MSCs by cultivation *ex vivo* and study the therapeutic efficacy of cultured *ex vivo* allogeneic BM MSCs of rats on their systemic and local injection were carried out. The work presents a literature review and analysis on the biological properties and characteristics of BM-MSCs, mechanisms of their therapeutic action and the possibilities of BM MSCs treatment of radiation skin damage.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Біологічні властивості та характеристики мезенхімальних стромальних клітин: від відкриття до клінічної терапії ...	8
1.2 Можливості клінічного використання мезенхімальних стромальних клітин у лікуванні радіаційних уражень шкіри	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	30
2.1 Ізоляція та культивування МСК КМ.....	30
2.2 Експериментальне моделювання радіаційного ураження шкіри.....	32
2.3 Локальне та системне уведення аlogenних МСК КМ в експериментальній моделі радіаційного ураження шкіри у щурів	34
2.4. Статистичний аналіз	35
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	36
3.1 Терапевтичний вплив аlogenних МСК КМ в експериментальній моделі радіаційного ураження шкіри при локальному опроміненні стегна щурів у дозі 50 Гр.....	36
3.2 Протизапальна активність аlogenних МСК КМ при радіаційному ураженні шкіри у щурів з локальним опроміненням у дозі 50 Гр.....	44
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ЕКУ – ефективність колонієутворення
- КМ – кістковий мозок
- МСК – мезенхімальні стромальні клітини
- FBS – фетальна бича сироватка
- FGF – фактор росту фібробластів
- HGF – фактор росту гепатоцитів
- IGF-1 – інсуліноподібний фактор росту-1
- IL – інтерлейкін
- KGF – фактор росту кератиноцитів
- MCP – моноцитарний хемоатрактант білок-1
- MIP-1 α – запальний протеїн макрофагів-1 α
- PDE2 – простагландин E2
- PDGF – фактор росту тромбоцитів
- SDF-1 – стромальний фактор-1
- SFC – фактор ствольних клітин
- VEGF – фактор росту судинного ендотелію

ВСТУП

Радіаційні ураження шкіри зазвичай є найбільш поширеною формою радіаційної патології, тому що вони завжди виникають у випадках гострого опромінення людей високими дозами радіації, а також є одним з основних побічних ефектів при рутинній клінічній променевої терапії і процедурах радіаційної діагностики [1].

Радіаційні ураження шкіри зазвичай займають багато часу для загоєння, характеризуються повторними хвилями запалення у місці опромінення з рецидивами некротичних виразок і сильним болем. Пацієнти часто вимагають особливого догляду та довгострокової госпіталізації. Проте, зараз не існує загально прийнятих терапевтичних стандартів для цієї патології, що залишається значною клінічною проблемою.

Останні роки, клітинна терапія мезенхімальними стромальними клітинами (МСК), розглядається як перспективна лікувальна стратегія. Досліджено, що МСК практично не імуногенні та їх трансплантація не індукує реакції імунного конфлікту [2, 3]. Крім того, МСК здатні мігрувати в осередки запалення, ішемії та механічного ушкодження, що робить їх перспективними кандидатами для терапії при розробці біомедичних клітинних технологій у регенеративній біології і медицині, що бурхливо розвиваються [4]. Проте, МСК ще досі не знайшли широкого застосування при лікуванні радіаційних уражень шкіри. Основна причина обмеженості клінічного застосування МСК при цій патології полягає в недостатності даних щодо їхньої терапевтичної ефективності. Вирішення цієї проблеми потребує досліджень на експериментальних моделях на тваринах, які імітують клінічний стан та можуть бути використаними для визначення ефективних варіантів лікування.

У зв'язку з цим у роботі було досліджено терапевтична активність МСК, виділених з кісткового мозку (МСК КМ) на експериментальній моделі радіаційних уражень шкіри різного ступеня тяжкості у щурів.

Завдання роботи складалося: постанову експериментальної моделі радіаційного ураження шкіри при локальному опроміненні стегна щурів у дозі 50 Гр, освоєння методичних підходів до ізолювання та експансії мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку (МСК КМ) при культивуванні *ex vivo* та проведення експериментальних досліджень терапевтичної активності культивованих *ex vivo* алогенних МСК КМ за їх системним та локальним введенням в моделі радіаційного ураження шкіри у щурів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні властивості та характеристики мезенхімальних стромальних клітин: від відкриття до клінічної терапії

Відкриття МСК можна зарахувати до роботи, виконаної А. Фріденштейн ще в 1960-х роках, коли він спостерігав, що кістковий мозок є джерелом стовбурових клітин для мезенхімальних тканин у постнатальному житті. Після збору зразків кісткового мозку з гребеня клубової кістки Фріденштейн і його співробітники помістили суспензію на пластикові чашки для культур. Вони помітили, що після поступового видалення гематопоетичного аналога існувала популяція пластично-адгезивних, фібробластоподібних клітин, які могли диференціюватися в хондроцити та остеобласти, і назвали їх колонієутворюючими одиницями фібробластами. Пізніше вони були перейменовані в мезенхімальні стовбурові клітини через здатність диференціюватися в клітини мезодермального походження [5].

Проте варто зазначити, що А. Фріденштейн не був першим, хто припустив існування стовбурових клітин. До його відкриття МСК роботи кількох інших вчених відзначили важливі віхи в дослідженні стовбурових клітин і зробили внесок у наше поточне розуміння важливих концепцій стовбурових клітин і диференціації. Наприклад, О. Максимів був одним із перших, хто представив ідею стовбурових клітин та їх здатності диференціюватися в інші типи клітин у контексті кровотворення. Сьогодні велика частина наших знань про кровотворення походить від пропозиції Максимова про унітарну теорію кровотворення в 1906 році, яку він підтвердив і оновив у своїх пізніших роботах і довів, що всі клітини крові походять від загальної материнської клітини. З іншого боку, двоє інших вчених, А. Мак Каллох і Дж. Е. Тілл, були одними з перших, хто продемонстрував клональну природу клітин кісткового мозку за

допомогою серії експериментів із введенням клітин кісткового мозку в опромінених мишей, під час яких вони помітили, що у селезінці цих мишей утворилися грудки або «колонії селезінки» пропорційно кількості введених клітин кісткового мозку. Потім вони пов'язали спостереження з можливістю того, що ці колонії походять з однієї клітини кісткового мозку [6].

Зараз зрозуміло, що в кістковому мозку є принаймні два основних типи стовбурових клітин – гемопоетичні стовбурові клітини та негематопоетичні МСК. Було показано, що останнє є важливим у проліферації, диференціації та виживанні гемопоетичних стовбурових клітин *in vitro* [7]. Традиційно МСК виділяли з кісткового мозку, хоча було показано, що МСК кісткового мозку (КМ-МСК) становлять 0,001 % цілого кісткового мозку. Виділення МСК з кісткового мозку відбувається переважно шляхом адгезії до пластику, але ці клітини також можна сконцентрувати за допомогою центрифугування в градієнті Перколла. Хоча деякі дані свідчать про те, що ВМ-МСК дають початок усім мезенхімальним лініям у віддалених тканинах, було виявлено, що ці клітини знаходяться у віддалених від кісткового мозку мезенхімальних тканинах, таких як скелетні м'язи і жирова тканина. Виявлено, що МСК, отримані з жиру, схожі на ВМ-МСК, але їх легше виробляти. Повідомлялося, що ці клітини демонструють ширшу терапевтичну здатність порівняно з ВМ-МСК. МСК також були локалізовані в пуповинній крові, тканинах зубів, синовіальній рідині, піднебінних мигдаликах, паращитовидній залозі [8–10].

МСК демонструють гетерогенність у своїй морфології. Для опису зовнішнього вигляду цих клітин використовували різні терміни, зокрема (1) фібробластоїдні клітини, (2) гігантські жирові клітини та клітини ковдри, (3) веретеноподібні, сплюснені клітини та (4) дуже маленькі круглі клітини [11].

Морфологія цих клітин також сильно змінюється залежно від щільності їх посіву, різко змінюючись, особливо коли злиття досягається в умовах культури клітин. З цією метою зв'язок між морфологією та функціями їх клітин залишається неясним.

Встановлено, що КОЕ-ф мають стовбурову природу, тобто. мають здатність до самооновлення і диференціювання в різні мезенхімальні (адипогенну, хондрогенну, остеодну) клітинні лінії і немезенхімальні лінії. З урахуванням здатності цих клітин до самопідтримання та диференціювання у різні клітинні лінії мезенхіми, А.І. Саплан ввів термін «мезенхімальні стовбурові клітини».

Міжнародним суспільством клітинної терапії (ISCT) було внесено деякі поправки до номенклатури: введено термін «мультипотентні МСК» та визначено, що не завжди МСК є стовбуровими клітинами [12]. Крім того, термінологію включали джерело виділення МСК: жирова тканина, кістковий мозок і т.д. ISCT було введено мінімум критеріїв для визначення мультипотентних МСК. Відповідно до Міжнародного товариства клітинної терапії, людські МСК у стандартних умовах культивування повинні задовольняти щонайменше трьом критеріям: (1) вони повинні бути прилиплими до пластику; (2) вони повинні експресувати С105, CD73 і CD90, а не CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 або CD19 і HLA-DR поверхневі молекули за допомогою проточної цитометрії, і (3) вони повинні бути здатними диференціюватися в остеобласти, адипоцити та хондробласти. Однак цей набір критеріїв не є остаточним, оскільки на експресію маркерів клітинної поверхні можуть впливати зовнішні фактори, такі як ті, що секретуються допоміжними клітинами в початкових пасажах, і важливо зазначити, що *invitro* експресія маркерів клітинної поверхні може не корелювати з експресією *invivo*. Інші загально визнані маркери включають CD44, CD71, Stro-1 і молекули адгезії, такі як CD 106, CD166 і CD29 [13]. Крім того, важливою властивістю МСК є їх здатність

утворювати колонії веретеноподібно-витягнутих клітин, що за морфологією нагадують фібробласти, при культивуванні *ex vivo*.

Додавання різних факторів у середу для культивування МСК може призводити до їх диференціювання. У кістковому мозку недиференційовані МСК створюють мікрооточення ГСК. Вони продукують матриксні молекули, включаючи фібрoneктин, ламінін та колаген [14]. МСК також експресують ліганди для поверхневих молекул клітин гемопоетичних ліній: внутрішньоклітинні молекули адгезії 1-го та 2-го типів, молекулу адгезії судинного ендотелію 1-го типу, функціонально-пов'язаний антиген лімфоцитів 3-го типу, молекулу адгезії активованого лейкоциту [15]. При спільному культивуванні МСК формують кластери з ГСК, мегакаріоцитами та остеобластними попередниками і утворюють лінійно специфічні колонієутворюючі одиниці з CD34⁺-клітин кісткового мозку в довготривалих культурах. Крім того, МСК секретують цитокіни, необхідні диференціювання ГСК [16, 17]. Людські МСК експресують людський лейкоцитарний антиген (HLA) I класу, а під дією ІФН- γ - та II класу. При дослідженні рівня експресії поверхневих молекул головного комплексу гістосумісності (МНС) було показано, що МСК експресують середні рівні молекул I класу, тоді як молекули МНС II класу на поверхні клітин не виявлялися і були виявлені лише внутрішньоклітинні депозити алоантигенів II класу в клітинних лізатах за допомогою Westernblotting-методу, стимуляція ІФН- γ підвищувала вміст молекул як II, так і I класів на поверхні клітин. Експресія молекули HLA-I підвищувалася при диференціюванні МСК у клітини жирової, кісткової та хрящової тканин, але експресія молекул II класу при цьому не виявлялася [18]. У процесі вивчення МСК було виділено з різних тканин, включаючи жирову тканину, пуповинну кров, фетальну печінку, кров, кістковий мозок і легке [8].

Незабаром після відкриття методів виділення та культивування МСК ця область почала швидко розвиватися, і багато груп почали вивчати їхнє

терапевтичне застосування. Усього через кілька років після того, як були ідентифіковані МСК, почалися випробування на людях з метою оцінки безпеки та ефективності терапії МСК. Спочатку аутологічні МСК вивчалися для сприяння приживленню та відновленню гемопоезу після абляції та трансплантації кісткового мозку для лікування раку [19]. Одночасно дослідники провели низку новаторських досліджень, які використали терапевтичний потенціал алогенних трансплантатів МСК для лікування дітей з недосконалим остеогенезом, генетичним захворюванням скелетної дисплазії [20]. Невдовзі після цього було проведено додаткові дослідження з вивчення корисності алогенних МСК для лікування пацієнтів із синдромом Гурлера та метахроматичною лейко дистрофією [21–23]. Фокус цих ранніх досліджень був заснований на тому факті, що МСК функціонують як стромальні стовбурові клітини і, отже, можуть найкраще підходити для лікування захворювань та станів, що вражають сполучну та кровотворну тканину. Ці перші дослідження були важливими, оскільки вони надали попередні докази безпеки терапії МСК, а також основу для хороших виробничих процесів для отримання МСК у клінічному масштабі [24–26].

Хоча кістковий мозок визнаний основним джерелом МСК, через інвазивний характер аспірації кісткового мозку робляться зусилля щодо виявлення інших сильних і надійних джерел МСК для клінічних цілей. Повідомлялося про виділення МСК з периферичних джерел, таких як пуповинна кров (UCB), плацентарна тканина і жирова тканина, з клітинами, що демонструють подібні імунофенотипи та мультипотентність, хоча інші суперечливі дослідження відсутність МСК у цих периферійних місцях. Чи існує певний зв'язок між цими клітинами з різних джерел, неясно, оскільки ретельні дослідження мультипотентності *in vivo* ще не проведені. Крім того, важливо з обережністю ставитися до інтерпретації аналізу CFU-F МСК з інших місць, крім кісткового мозку, враховуючи, що багато адгезивних та

клоногенних фібробластоїдних клітин існують у не гематопоетичних тканинах. Було показано, що, незважаючи на фенотипову подібність або навіть ідентичність у деяких випадках, МСК, отримані з різних тканин, виявляють різні функції та активність. Вважається, що основою цих варіацій лежить ніша МСК, унікальна кожної тканини походження.

Фізичне розташування або ніша стовбурових клітин надає безцінну інформацію про їх роль та взаємодію всередині тканини (рис. 1.1). МСК кісткового мозку досліджувалися для терапевтичного використання ширше, ніж будь-який інший підтип, і нативні функції цих клітин у кістковому мозку вивчалися в надії знайти ключ до розгадки їхньої терапевтичної активності [27, 28].

Нішу МСК було важко виявити та ще важче спостерігати динамічно, оскільки не було ідентифіковано жодного унікального маркера МСК, а також тому, що порожнину кісткового мозку важко досліджувати *in vivo*. Тим не менш, ґрунтуючись на кореляціях між імунофенотипом та аналізами *ex vivo* CFU-F, дані підтверджують ідею про те, що МСК існують у периваскулярних місцях. Ця теорія узгоджується зі спостереженнями про те, що (а) МСК імовірно виявляються в багатьох типах тканин, включаючи синовіальну оболонку, окістя, жирову тканину, UCSB і плаценту; (б) кількість МСК у цій тканині залежить від щільності мікроциркуляторного русла; (с) МСК секретують фактори, які сприяють васкулогенезу та стабілізації ендотелію; та (г) вони можуть виявляти різні функціональні характеристики залежно від типу похідної тканини. Їхні стромальні аналоги можуть диференціюватися і мігрувати з цього простору, розташовуючись на аблюмінальній стороні синусоїдів кісткового мозку і утворюючи тривимірну мережу, що покриває капілярне русло.

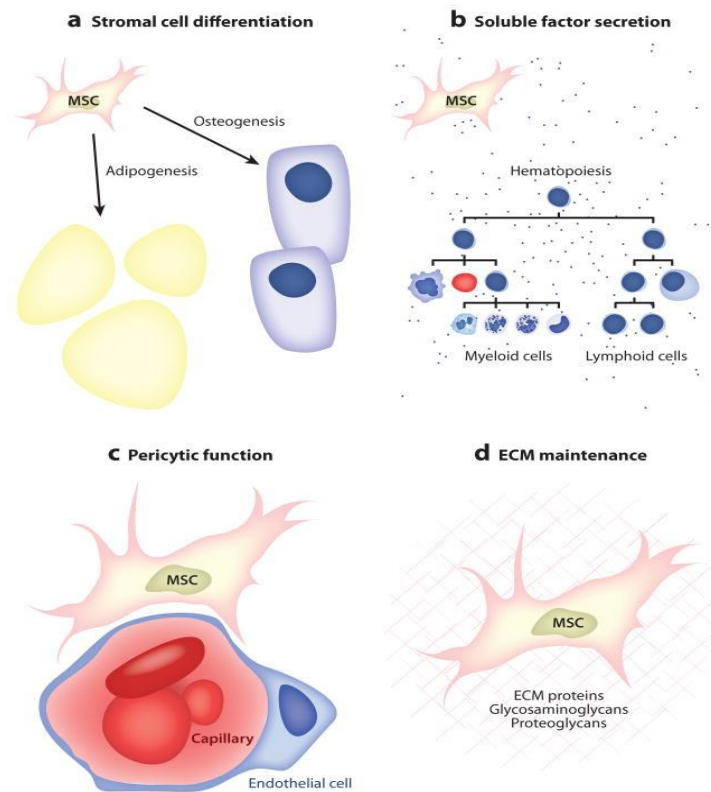


Рис. 1.1 Біологічні властивості МСК КМ [27]:(a) МСК можуть диференціюватися в клітини скелетної тканини в порожнині кісткового мозку. (b) МСК виділяють низку розчинних факторів, які беруть участь у розвитку кровотворення. (c) Враховуючи їх передбачувану периваскулярну локалізацію, МСК можуть виконувати клітинні функції, подібні до перицитів, які оточують синусоїди кісткового мозку. (d) МСК підтримують механічне мікрооточення кісткового мозку шляхом секреції та ремоделювання позаклітинного матриксу. Аббревіатура: ЕСМ, позаклітинний матрикс.

Відкриття дорослих стовбурових клітин підтвердило теорії про наявність регенеративних популяцій клітин у розвинених організмів і призвело до зростання інтересу до використання цих клітин як терапевтичні засоби.

Зокрема, в даний час дослідники вивчають можливість використання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), отриманих з кісткового мозку, у доклінічних та клінічних дослідженнях для усунення пошкоджень

шляхом посилення програм ендogenous відновлення, що є новою потужною парадигмою лікування захворювань людини. Успіх терапії на основі МСК був заснований на припущенні, що трансплантовані клітини проникають у пошкоджені тканини, прикріплюються до них та згодом диференціюються для заміни пошкоджених клітин [29]. Вважається, що донорські МСК при внутрішньовенному (iv) введенні входять у кровообіг, зберігають здатність локалізуватися у пошкодженій тканині, керуючись хемотаксичними сигналами та полегшують репарацію у різних умовах травми та захворювання [30–34].

Згідно з сучасними уявленнями, МСК є регенераторним резервом дорослого організму. З одного боку, МСК є унікальним пластичним матеріалом, оскільки мають високі проліферативні і диференціальні потенціали, та з іншого боку, вони виробляють широкий спектр ростових факторів (гемопоетичні ростові фактори, інтерлейкін-6 (IL6), інтерлейкін-11 (IL11), фактор стволових клітин (SFC), Flt3 ліганд, фактор росту судинного ендотелію (VEGF), фактор росту гепатоцитів (HGF), основний фактор росту фібробластів (FGF), простагландин E₂, індоламін та інші), за допомогою яких регулюють цілу низку клітинних процесів [35].

На сьогодні доведена присутність МСК у різних тканинах дорослого організму (КМ, адипогенна тканина, синовіальна оболонка, пульпа), але більш важливим депо МСК визначено КМ. Показано, що пул МСК КМ є неоднорідним та включає стовбурові/прогеніторні клітини з різними проліферативними і диференціальними властивостями. Серед клітин КМ, здатних до адгезії, присутні клоногенні МСК, що формують колонії в умовах культивування *in vitro*, у КМ виявляється одна клоногенна МСК на $(10 - 100) \times 10^3$ моноклеарних клітин.

За результатами досліджень [16] був кількісно оцінений диференціальний потенціал клоногенних МСК КМ. Встановлено, що 24 % клоногенних МСК КМ здатні до диференціювання в остеогенному, хондрогенному та адипогенному, 71 % – в остеогенному та хондрогенному

та 4 % – в остеогенному напрямках. Таким чином була підтверджена негемопоетична природа МСК КМ та доведено, що тільки 1/3 клоногенних МСК КМ є мультипотентними клітинами, які претендують на роль стовбурового компартменту строми КМ.

Пул МСК КМ, що включає мультипотентні (стовбурові) клітини, може бути багаторазово розмножений *ex vivo*. Це дає можливість одержання необхідної кількості МСК КМ для їх експериментального і клінічного застосування.

Клінічний розвиток препаратів на основі МСК для терапевтичного застосування включає ізоляцію МСК з КМ та експансію в культурі [7]. При культивуванні *ex vivo* МСК демонструють потенціал для формування декількох спеціалізованих типів клітин, включаючи нейрони, шкіру, кістку, жир, хрящ, сухожилля, м'язи (серцевий і скелетний), епітелій (легені, кишечник та нирки) та багато інших. Після трансплантації МСК КМ беруть участь у процесі загоєння як безпосередньо, через диференціювання, щоб замінити втрачені типи клітин, так і побічно, через місцеву секрецію цитокінів та інших біологічно активних молекул, які сприяють зменшенню запалення, попередженню утворення рубців і посиленню ендогенних механізмів реконструкції тканин [36].

Молекулярні механізми міграції МСК (хоумінг) у пошкоджені ділянки тканин оцінювалися у декількох незалежних лабораторіях за *in vitro* та *in vivo* підходами. Дані описують хемотаксис МСК щодо різних хемокінів, включаючи моноцитарний хемоатрактант білок-1 (MCP-1), запальний протеїн макрофагів-1 α (MIP-1 α), інтерлейкіни-8 (IL-8) і стромальний фактор-1 (SDF-1) За даними Wang L. та співавт. [18] спостерігається міграція *in vitro* МСК на очищені MCP-1, MIP-1 α та IL-8, а також на екстракти, одержані з тканини мозку постраждалих від дефіциту кисню (ішемічна травма). Втручання специфічних хемокінів було підтверджено інгібуванням спрямованої міграції у присутності блокуючих антитіл до кожного цитокіну.

Після міграції у пошкоджені тканини, МСК демонструють початкові протизапальні властивості та виявляють широкий спектр ефектів щодо модуляції запальної реакції. Вони експресують низький рівень основних молекул гістосумісності HLA class I, але вони позбавлені експресії молекул HLA class II і B7 ко-стимуляторних молекул, які беруть участь в антигенній презентації на поверхні клітини. Отже, МСК надаються «іммунні привілеї» за здатність уникати розпізнавання $CD4^+$ Т-хелперами і $CD8^+$ цитотоксичними Т-клітинами. На додаток до іммунних привілеїв, МСК активно послаблюють іммунну активність. Показано, що маркери клітинної поверхневої активації лімфоцитів, включаючи CD25, CD38 та CD69, зменшуються в присутності МСК. Проліферація Т-клітин інгібується через блок експресії цикліну D2, а також МСК інгібують вроджену іммунну відповідь, блокуючи опосередковану IL-2 активацію природних клітин-кілерів [37].

Крім того, уведення МСК індукує місцеву секрецію декількох паракринних факторів, які полегшують загоєння ран. Ці фактори включають ангиогенні, антиапоптотичні, мітогенні та хоумінг сигнали, такі як VEGF, HGF, інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1), FGF і SDF-1, що призводить до накопичення декількох різних популяцій клітин-попередників, у тому числі, кровоносних судин та інших тканино-специфічних клітин-попередників [38].

Виконані доклінічні та клінічні дослідження продемонстрували безпечність та ефективність уведення алогенних (імунологічно несумісних) МСК. Загальні уявлення щодо ефективності використання алогенних МСК все більше стосуються протизапальної і паракринної активності цих клітин [39, 40]. Проте, значний інтерес має оцінка ролі МСК у сприянні загоєнню ран за механізмом прямої диференціації і заміни втрачених клітин. Широко обговорюється доцільність використання алогенних та аутологічних (похідних від хворого) МСК для відновлення пошкоджених тканин [41].

З огляду на характерні протизапальні і репаративні властивості МСК можна вважати, що саме цій тип стовбурових клітин може бути ефективним при репарації тканин та органів, що постраждали від впливу іонізуючої радіації, зокрема, при лікуванні місцевих радіаційних уражень у шкірі [29].

Від системного введення МСК у вигляді внутрішньовенного лікування до доставки їх молекулярних секретів за допомогою екстракорпоральних пристроїв групи по всьому світу зосереджують свою увагу на цій клітині, прагнучи використовувати весь її терапевтичний потенціал. МСК є чудовим кандидатом для клітинної терапії, оскільки (а) МСК людини легко доступні; (б) виділення МСК нескладно і клітини можуть розростатися до клінічних масштабів за відносно короткий період часу; (с) МСК можна біоконсервувати з мінімальною втратою ефективності та зберігати для доставки за місцем надання медичної допомоги; та (d) випробування МСК на людях досі не виявили побічних реакцій на алогенні та аутологічні трансплантації МСК, що дозволяє створити реєстр сторонніх донорських МСК для розширення числа пацієнтів, які отримують одноразове виділення. Трансплантація МСК вважається безпечною та широко тестувалася у клінічних дослідженнях серцево-судинних, неврологічних та імунологічних захворювань з обнадійливими результатами. Але ж отримані результати припускають неповне розуміння основного механізму дії терапії МСК і вказують на важливість подальших доклінічних розробок.

Більш точне розуміння природних функцій МСК в кістковому мозку може дати основу розуміння їх основного способу(ів) дії. МСК спочатку вважалися стромальних клітин-попередників у кістковому мозку, і спочатку передбачалося, що вони виконують одну основну роль у своєму недиференційованому стані: поповнення стромальної тканини в кістковому мозку. Однак МСК та їх стромальні нащадки також виконують у кістковому мозку ряд альтернативних функцій, у тому числі секрецію

розчинних медіаторів, що підтримують кровотворення. Ці альтернативні функції нині характеризуються у тих трансплантації МСК, у результаті було показано, що паракринні взаємодії між МСК і клітинами-господарями безпосередньо пов'язані з терапевтичною активністю МСК. Хоча остаточно не доведено, чи необхідні приживлення та диференціювання МСК для забезпечення цієї паракринної підтримки, недавні дослідження показали, що менше 1% системно введених МСК зберігаються довше тижня після ін'єкції, а переваги терапії МСК, що спостерігаються, можуть бути результатом відмови від їх молекулярного вмісту під час введення. На цей час вважається, що інженерні підходи можуть покращити оптимізацію дозування МСК та забезпечити альтернативне використання МСК для доставки ліків як активні, динамічні засоби доставки.

Зовсім недавно групи по всьому світу досліджували трансплантацію МСК для лікування багатьох захворювань, ґрунтуючись на новопридбаному розумінні плейотропних функцій МСК, які посилюють ендогенне відновлення та послаблюють імунну дисфункцію. Приклади дизайнів клінічних досліджень представлені в таблиці 1.1. В даний час у всьому світі зареєстровано 79 центрів клінічних досліджень оцінки терапії МСК (<http://clinicaltrials.gov/>). У Сполучених Штатах найвища концентрація зареєстрованих центрів випробувань – 28, але на решту світу припадає більше половини їх загальної кількості (19 у Європі, 16 у Китаї, 5 на Близькому Сході, 4 в Індії, 3 у Китаї). Канаді, по 2 в Африці та Японії та 1 в Австралії), що вказує на сильний міжнародний інтерес до МСК як потенційного методу лікування. Більшість досліджень спонсоруються академічними медичними центрами, які вивчають нові можливості застосування МСК для лікування таких різноманітних станів, як критична ішемія кінцівок, пошкодження спинного мозку та цироз печінки.

Метою даного огляду був аналіз наукової літератури у галузі терапії МСК радіаційних уражень шкіри з особливим акцентом на гіпотези щодо механізму(ів) дії МСК. Більшість цитованих робіт присвячено системному

введенню МСК, отриманих з КМ (МСК КМ), оскільки цей терапевтичний метод вивчений ширше, ніж інші способи застосування терапії на основі МСК.

1.2 Можливості клінічного використання мезенхімальних стромальних клітин у лікуванні радіаційних уражень шкіри

Радіаційні ураження шкіри є найсерйознішою сучасною біомедичною проблемою, а існуючі технології їх лікування залишаються недостатніми. Останнім часом терапія стовбуровими клітинами стала багатообіцяючим новим терапевтичним підходом, при цьому найбільший інтерес становлять мезенхімальні стовбурові клітини (МСК). МСК виявилися привабливим типом клітин для клітинної терапії через простоту їх виділення, величезний потенціал диференціювання та імуномодуючий ефект при трансплантації.

Основними типами клітин, що вивчаються при загоєнні радіаційних уражень шкіри, є МСК, отримані з кісткового мозку (КМ), жирової тканини (АТ) та пуповини (УС) [31, 32]. Хоча існують невеликі відмінності в МСК з різних джерел, саме МСК, отримані з КМ (МСК КМ), найбільш часто випробуються у доклінічних дослідженнях в експериментальних моделях на тваринах як потенційні терапевтичні агенти при радіаційних ураженнях шкіри [33, 34]. Чисельні експериментальні дослідження на тваринах підтвердила ідею про те, що МСК виявляють позитивну терапевтичну дію, що призвело до їх застосування у клінічних умовах у разі аварійних ситуацій при лікуванні переопромінених осіб з радіаційними ураженнями шкіри [42].

Терапевтичне уведення МСК КМ, особливо у разі тяжких радіаційних уражень шкіри, що важко загоюються, призводить до посилення ангиогенезу, полегшення реепітелізації, поліпшення грануляції і прискорення закриття рани [11]. Механізми, що лежать в основі їхньої терапевтичної ролі, до кінця не вивчені, проте МСК активно реагують на

біологічні сигнали, пов'язані із запаленням, некрозом та пошкодженням тканин [33, 34, 42]. МСК можуть розташовуватись у пошкодженій шкірі, здійснювати пряме диференціювання у клітини шкіри та є резервуаром трофічних факторів, які можуть секретуватися та діяти паракринно [43, 44].

Крім того, у суворому запальному середовищі ран, що не загоюються, МСК можуть реагувати на запальні стимули, стаючи потужними імуносупресорами, тим самим полегшуючи перехід від запальної фази до проліферативної фази [45, 46].

В останні роки стає все більш очевидним, що приживлення МСК в місцях ушкоджень мало сприяє їхньому терапевтичному ефекту. Незважаючи на те, що є деякі свідчення трансдиференціювання МСК клітини шкіри, цей внесок може бути обмеженим, включаючи погане виживання трансплантованих клітин та ефективність їх приживлення і утримання у суворих умовах запалення у місцях пошкодження [47].

Однак, лікувальний ефект МСК залежить, перш за все, від їхньої паракринної дії, яка пом'якшує суворе мікросередовище хронічних ран і регулює локальні клітинні реакції. Натомість все більше усвідомлюється, що їх секретом є основним механізмом, що здійснює багатогранні функції, включаючи імуномодуляцію, ангиогенез, антиапоптоз, боротьбу з рубцями, хемоаттракцію та модуляцію місцевих стовбурових клітин та клітин-попередників [48, 49].

Інтерес до МСК і загоєнню ран обумовлений їхньою здатністю створювати організовану мережу молекул, що сприяє процесу відновлення/регенерації тканин. МСК можуть секретувати проангіогенні фактори, які можуть сприяти васкуляризації в області рани та утворення грануляційної тканини, серед яких фактор росту ендотелію судин (VEGF), фактори росту гепатоцитів (HGF), PDGF та основний фактор росту фібробластів (bFGF) надзвичайну важливість [50, 51].

Відомо, що радіаційні ураження шкіри та їх загоєння є складний багатофакторний процес, що відбувається в окремі фази, які перекриваються між собою: це фаза запалення, фаза проліферація клітин та фаза ремоделювання (рис. 1.2).

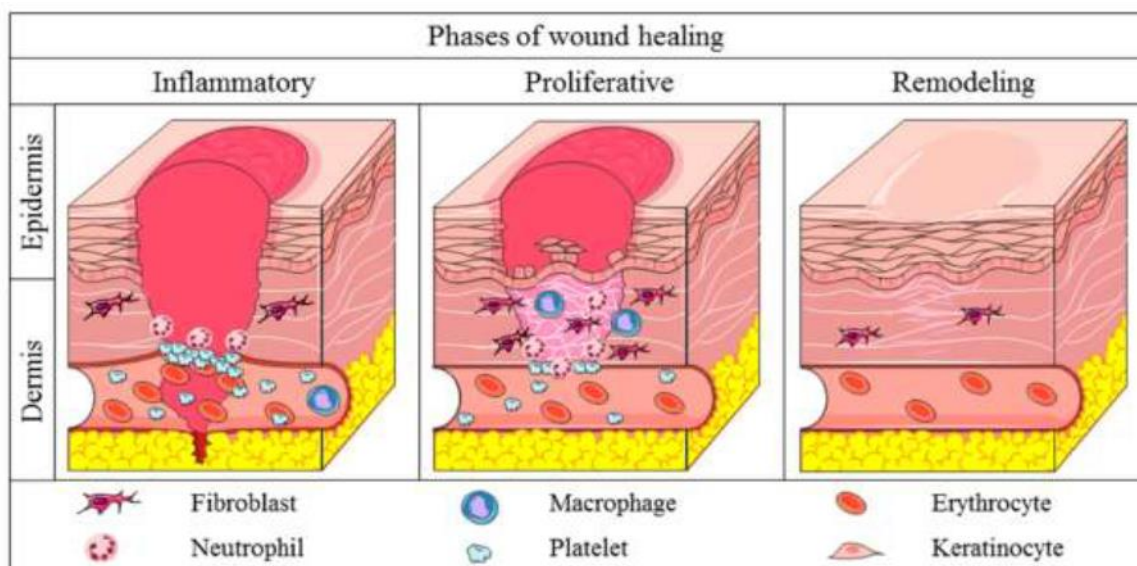


Рис 1.2 Фази фізіологічного загоєння радіаційного ураження шкіри [44].

Фаза запалення слідує відразу за радіаційним втручанням та включає рекрутування імунних клітин. Проліферативна фаза включає посилення клітинної міграції, зокрема, стовбурових клітин і фіброblastів, що стимулює синтез нового позаклітинного матрикса, а також неоваскуляризацію шкіри за рахунок посилення ангіогенних факторів. Фаза ремоделювання є останньою фазою процесу загоєння ран і характеризується відкладенням та деградацією різних колагенів для збільшення міцності нової шкіри. Отже, загоєння є складним процесом, що вимагає добре організованої інтеграції біологічних і молекулярних процесів міграції та проліферації клітин, відкладення та ремоделювання позаклітинного матриксу, скорочення рани, ангіогенезу та імуномодуляції. Виявлено, що MSC відіграють життєво важливу роль у просуванні кожного з цих процесів [52].

При радіаційних ураженнях процес загоєння шкіри не протікає нормально і не здатен відновити анатомічну та функціональну цілісність шкіри. У ході кількох доклінічних та клінічних випробувань було виявлено, що МСК прискорюють загоєння шкірних ран, сприяючи регенерації та ремоделюванню за допомогою рекрутування клітин та прямого диференціювання, посилення неоваскуляризації за секрецією ангіогенних факторів, а також імуномодуляції за рахунок активації або придушення імунних клітин [53].

При аномальному загоєнні радіаційних уражень реакція дермальних фібробластів порушується і не регулюється, що є серйозною перешкодою для успішного загоєння шкіри. Однак, кілька доклінічних досліджень показують, що МСК можуть стимулювати проліферативну фазу загоєння за допомогою стимулювання проліферації фібробластів та прискореної міграції у скретч-аналізах. Крім того, було показано, що МСК КМ секретують розчинний хемоаттрактант для дермальних фібробластів, підтримуючи спрямовану міграцію цих клітин до раневого ложа, засіяного МСК. МСК КМ індукували дермальні фібробласти для регулювання експресії генів, що беруть участь у гомеостазі позаклітинного матриксу та міжклітинної адгезії, які відіграють вирішальну роль у загоєнні ран [54, 55].

Останні дослідження продемонстрували, що мезенхімальні стовбурові клітини, отримані з пуповини людини (UC-MSC), демонструють підвищене накопичення колагену типів I і III після трансплантації у щурів [56]. Крім того, застосування мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини (A-MSC) у моделі на мишах показало підвищене співвідношення колагену III до колагену I *in vivo*, що зменшило утворення рубців. Також було виявлено, що МСК пригнічують деградацію колагенового матриксу та зберігають структурну цілісність ЕСМ за рахунок придушення матриксної металопротеїнази-1 (ММП-1), типу колагенази, яка переважно розщеплює колаген I, II та III типів. Нарешті,

виявлено, що, поряд з регуляцією синтезу та деградації колагену, МСК також сприяють синтезу еластину, який відповідає за забезпечення стійкості тканин, а також фібронектину, який насамперед бере участь у клітинно-адгезивних взаємодіях [57].

Процес реепітелізації включає утворення нового епітелію та додатків шкіри за рахунок активації проліферації та диференціювання кератиноцитів та їх подальшої міграції від краю рани до оголеної ділянки. Хоча МСК дійсно володіють здатністю спонтанно диференціюватися в кератиноцити в рановій тканині, їх вплив на епітелізацію при загоєнні ран залишається значною мірою паракринним. включаючи трансформуючий фактор росту бета (TGF- β) У свою чергу, було показано, що на моделях шкіри, оброблених МСК, утворюється багаточаровий, добре диференційований епідерміс, який можна порівняти з епідермісом людини [58]. Далі продемонстрували, що МСК збільшують товщину регенованого епідермісу, збільшують дермальнігребені та кількість клітин у регенованій шкірі, а також виробляють грануляційну тканину з регулярним розташуванням волокон на імунодефіцитних моделях мишей. Те ж дослідження також показало, що в ранах, оброблених МСК, додатково розвиваються волосяні фолікули, потові залози та інші придатки до нормальної шкіри. Це дозволяє припустити, що введення МСК здатне не лише прискорити загоєння ран, а й покращити якість загоєння ран та фізіологічне функціонування регенованої шкіри.

При загоєнні ран утворення нових кровоносних судин необхідно для підтримки новоствореної грануляційної тканини та виживання кератиноцитіву ложі рани. Неоваскуляризація здійснюється МСК у вигляді як прямої диференціювання лінії ендотеліальних клітин, і активації ангиогенних чинників у вигляді паракринної передачі сигналів. МСК в першу чергу сприяють секреції та активації фактору зростання ендотелію судин (VEGF) та ангиопоетину-1 (Ang-1). VEGF є найбільш ефективним та специфічним фактором росту, що регулює ангиогенез, який стимулює

проліферацію, міграцію та організацію ендотеліальних клітин. Ang-1 опосередковує дозрівання судин та допомагає підтримувати цілісність судин. Помітно високі рівні VEGF та Ang-1 були виявлені у моделях на мишах при обробленні ран МСК, що призвело до збільшення щільності нових судин, збільшення складності судинних структур та загального покращення мікроциркуляції шкірних ран [43].

МСК можуть сприяти реепітелізації місця рани за допомогою секреції епідермального фактору росту (EGF) та фактору зростання кератиноцитів (KGF). МСК мають протизапальну дію завдяки секреції індоламін-2,3-діоксигенази (IDO), простагландину E2 (PGE2) та стимульованого фактором некрозу пухлини- α (TNF- α) гена 6 (TSG-6), тим самим модулюючи як вроджені, так і адаптивні імунні реакції, що перешкоджають рубцюванню на користь регенерації [59].

Подальші чисельні роботи підтвердили, що паракринний ефект опосередковується позаклітинними везикулами, що секретуються, особливо екзосомами, при деяких моделях пошкоджень, таких як інфаркт міокарда, пошкодження нирок і відновлення скелетних м'язів. Ця паракринна гіпотеза також передбачає, що деякі проблеми безпеки, пов'язані з трансплантацією стовбурових клітин, можна легко подолати за допомогою позаклітинних везикул, отриманих зі стовбурових клітин, за відсутності вихідних стовбурових клітин. Вже досягнуто успіхів у трансляції позаклітинних везикул, що походять з МСК, у регенеративній терапії [60].

Більше того, згідно з доклінічними дослідженнями, позаклітинні везикули, отримані з МСК, можуть грати перспективну роль у лікуванні променевого ураження. Поточні та майбутні перспективи цих безклітинних методів лікування, які можуть застосовуватися для лікування людей, які зазнали надмірного впливу іонізуючого випромінювання, зараз активно обговорюються [61–66].

Хоча вплив екстремальної радіації зустрічається рідко, випадки, подібні до тих, що спостерігалися на атомних електростанціях у Чорнобилі та Фукусімі, все ще цілком можливі. Історично у роботі [67] автори вперше протестували здатність людських МСК загоювати радіаційні рани на мишачій моделі NOD/SCID. Через 24 години після опромінення мишам внутрішньовенно вводили МСК і спостерігали, як вони прикріплювалися до місця ушкодження, що супроводжувалося покращенням загоєння ран. Ці результати були підтвержені аналогічними дослідженнями через кілька років. Крім того, лікування цих пошкоджень МСК призводило до покращення васкуляризації ранової ділянки. Використовуючи експериментальну модель міні свиней, було виявлено, що аутологічні стовбурові клітини, отримані з жирової тканини (ASC), також здатні загоювати променеві рани [68].

На моделі радіаційно-індукованих виразок шкіри у щурів проводили уведення МСК разом із фактором зростання тромбоцитів (PDGF). Щури, що отримували МСК плюс PDGF, одужували швидше і демонстрували більш організоване відкладення колагену порівняно з контрольними щурами або тваринами, які отримували МСК або тільки PDGF [69].

Двома найбільш складними факторами, що впливають на загоєння шкірних ран, є фіброз та запалення, безперервний стан запалення в рані може створити каскад, який продовжує стан незагоєння. Отже, корисно зменшити кількість інфільтрованих запальних клітин, щоб загоєння рани могло прогресувати. Було показано, що МСК послаблюють запалення локально обпаленої шкіри, зменшуючи інфільтрацію нейтрофілів і макрофагів і продукцію прозапальних цитокінів, одночасно збільшуючи продукцію протизапальних цитокінів. Крім того, було виявлено, що МСК знижують експресію молекули внутрішньоклітинної адгезії 1 (ICAM1), яка, як відомо, опосередковує зв'язування лейкоцитів із дермальними фібробластами, отже, вказуючи на роль у запаленні. Нарешті, доклінічні дослідження впливу UC-MSC на регуляцію окисного стресу показали, що

кондиціоноване середовище MSC може пригнічувати виробництво супероксидних радикалів до базальних рівнів і сприяти синтезу супероксиддисмутази для оптимізації середовища загоєння та сприяння закриттю ран [15].

У роботі [70] використовували мишачу модель променевого ураження шкіри для вивчення впливу МСК на фіброз, індукований запаленням. Транскрипційний аналіз пошкодженої шкіри показав, що лікування МСК знижує експресію прозапального цитокіну IL-1 β , одночасно збільшуючи експресію IL-10 та PDGF. Ці результати були підтверджені цитокіновим імунним аналізом. Найцікавіше, що лікування МСК призводило до зниження інфільтрації прозапальних макрофагів (CD80+) та збільшення кількості протизапальних макрофагів (CD163+) у пошкодженій шкірі. Це дослідження показало, що МСК можуть пом'якшувати фіброз шкіри, спричинений радіацією, змінюючи фенотип макрофагів та зменшуючи місцеве запалення. Аналогічним чином, в іншому дослідженні з використанням моделі радіаційно-індукованого гострого пошкодження шкіри у щурів було показано, що лікування МСК знижує експресію TGF- β 1 та простагландину E2 (PGE2), одночасно збільшуючи рівні CXCL12 у пошкодженій шкірі порівняно з контрольною групою. Значний ангиогенез також спостерігався в дослідженні хронічних радіаційно-індукованих уражень шкіри, які лікували BMMSC, а також значне зменшення запалення, обидва з яких дозволило більш ефективно загоювати рани та покращити якість шкіри. У кожному з цих досліджень серйозних побічних ефектів не було повідомлялося, і протягом місяців після лікування не спостерігалось рецидиву рани або пухлиногенності.

В одному з досліджень проводили лікування радіаційного ураження шкіри у щурів генно-модифікованими МСК, що призводило до кращого формування грануляцій та зменшення утворення бактеріальних колоній порівняно з немодифікованими МСК. В іншому дослідженні з використанням тієї ж моделі на щурах вводили МСК, що експресують

фактор росту ендотелію судин 165 (VEGF 165) та бета-дефенсин-3 людини (hBD3). Це призвело до скорочення часу загоєння ран, поліпшення регенерації придатків шкіри та відкладення колагену [51]. У кожному з цих досліджень серйозних побічних ефектів не було повідомлялося, і протягом місяців після лікування не спостерігалось рецидиву рани або пухлиногенності.

Отже, трансплантовані МСК демонстрували значний терапевтичний потенціал у доклінічних дослідженнях та деяких успіх у клінічних випробуваннях (рис. 1.3). Однак, їх використання у клініці досить є обмеженим завдяки їх властивій клітинній гетерогенності та складної клітинної «поведінки», яку важко контролювати серед інших факторів.

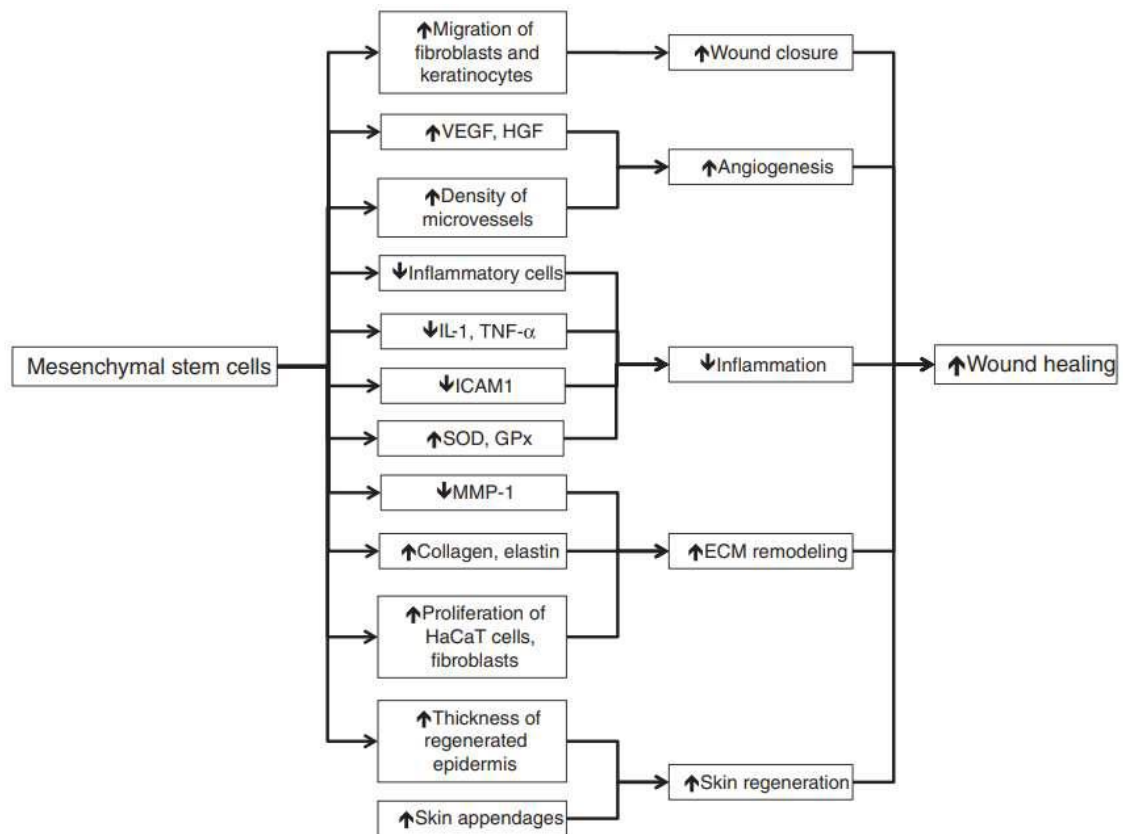


Рис. 1.3 Механізми терапевтичного впливу МСК КМ [58]: МСК можуть здебільшого через паракринну передачу сигналів контролювати міграцію клітин, посилювати та знижувати певні білки та фактори транскрипції для ремоделювання ЕСМ, епітелізація та ангіогенезу при одночасному зменшенні запалення.

Нещодавно дослідники почали вивчати синергетичні ефекти комбінованої терапії МСК та МСК-вмісних біоматеріалів, де біоматеріал слугує каркасом, який може забезпечити підтримку MSC під час ін'єкції. Біоматеріал також може надавати фізіологічно відповідні сигнали для контролю «поведінки» клітин та досягнення бажаного імуномодулюючого ефекту МСК. Останні досягнення в цій галузі, зосереджуються на найбільш часто використовуваних біоматеріалах, класифікованих на основі їх джерела, включаючи природні біоматеріали, синтетичні біоматеріали та поєднання природних і синтетичних біоматеріалів [71]. Обговорюються поточні проблеми, пов'язані з клінічним перекладом цих методів лікування, а також погляд на майбутні перспективи у цієї галузі.

Отже, можна зробити висновок, що терапія на основі МСК може бути перспективним та ефективним варіантом лікування радіаційних уражень шкіри. Однак необхідні додаткові дослідження щодо джерела клітин, дози, часу та шляху введення, перш ніж цю технологію можна буде впевнено впровадити в сучасну терапію.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводилось у лабораторії протирадіаційних засобів і клітинних технологій ДУ «ІМРО НАМН України», яка має свідоцтво про відповідність системи вимірювань вимогам ДСТУ ISO 10012:2005 №01-0011/2022 від 7 лютого 2022 р. чинне до 7 лютого 2025 р.

Всі експерименти виконувалися відповідно до внутрішніх протоколів, прийнятих Комітетом з біоетики та деонтології ДУ «ІМРО НАМН України».

Всі експерименти на тваринах (щури) виконувалися відповідно норм, які ґрунтуються на міжнародних принципах Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1998) та норм біомедичної етики, згідно із Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (21.02.2006 р.). Всього в експериментах було використано 147 статевозрілих білих нелінійних щурів (самки) масою тіла 160 – 180 г, які утримувалися за стандартними умовами на звичайному раціоні віварію.

2.1 Ізоляція та культивування МСК КМ

Отримання первинної суспензії клітин КМ здійснювали із стегнової кістки щурів. Культивування *ex vivo* МСК КМ проводили в умовах стерильного боксу у ламінарній шафі MN 120 (Class II фірми NUVE, Туреччина). Кістковий матеріал занурювали у транспортне середовище (199 середовище с солями Хенкса, з HEPES, без L-глутаміну, РАА, Австрія), доповнене пеніциліном 200 од/мл і стрептоміцином 200 мкг/мл. Біоматеріал залишали у транспортному середовищі протягом 40 – 60 хв при $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Вимивання клітин КМ з кісткових фрагментів людини або стегнової кістки щурів проводили за допомогою середовища 199 і стерильного шприца (10 мл). Отримані суспензії

переносили у стерильні пробірки з кришкою для подальшого центрифугування.

Центрифугування суспензій проводили з використанням центрифуги NF 800 (фірми NUVE, Туреччина) при 200 g протягом 10 хв при $t = 18\text{ }^\circ\text{C}$. Після видалення супернатанту клітинний осад був ресуспендований у середовищі MEM Alpha, без рибонуклеотидів, без L-глутаміну (BioWest, Франція), доповненому 2 mM L-глутаміну (BioWest, Франція), 15 % фетальної бичачої сироватки (FBS, BioWest, Франція) та пеніциліном 50 од/мл і стрептоміцином 50 мкг/мл для подальшого культивування.

Для підрахунку загальної кількості клітин КМ (міелокаріоцитів) брали 20 мкл суспензії, розводили в 380 мкл розчину 3 % оцтової кислоти. Кількість ядровмісних клітин підраховували у камері Горяєва.

Культивування *ex vivo* МСК КМ проводили в умовах стерильного боксу у ламінарній шафі MN 120 (Class II фірми NUVE, Туреччина). Культуру підтримували в інкубаторі CO₂ (модель EC-160, фірми NUVE, Туреччина), при $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$, 100 % вологості та з 5 % CO₂. Через 72 год неприкріплені клітини видаляли та проводили заміну культурального середовища. Субкультивування МСК проводили шляхом пересіву культур за загальноприйнятим способом. Проміжний прижиттєвий контроль за культурами здійснювали за допомогою інвертованого світлового мікроскопа Leica DM IL LED (Німеччина) з використанням окуляра $\times 10$ та об'єктивів $\times 10$ і $\times 20$. Культивовані МСК КМ з 2-го пасажу кріоконсервували під захистом 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО) (BioFroxx, Німеччина) у кріопробірках (BioSigma, Італія), які розміщували у контейнері Mr Frosty (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) та ставили у морозильну камеру з постійною $t = -70\text{ }^\circ\text{C}$ на 24 год. Заморожені кріопробірки переносили із контейнера Mr Frosty безпосередньо у морозильну камеру з постійною $t = -70\text{ }^\circ\text{C}$ для подальшого зберігання.

2.2 Експериментальне моделювання радіаційного ураження шкіри

З метою експериментального моделювання радіаційного ураження шкіри здійснювали локальне опромінення стегна щурів на рентгенівській установці Faxitron MultiRad 225 (виробник Faxitron Bioptics LLC, США), яка спеціально розроблена для безпечного опромінення малих лабораторних тварин (миші, щури) та біологічних зразків у лабораторних умовах. Рентгенівський приладу даній установці складається із металокерамічної рентгенівської трубки з фіксованим анодом і вихідним вікном випромінювання від 0,8 мм до 1,2 мм берилію. Технічні параметри даної установки передбачають точність регулювання напруги пучка на рентгенівській трубці від 5 кВ до 225 кВ ($\pm 0,1$ кВ) та сили току від 0,1 мА до 45 мА ($\pm 0,01$ мА) з автоматичним вибором фільтра (0,5 мм і 2,0 мм) Al або (0,1 мм і 0,3 мм) Cu і самостійним водяним охолодженням. В установку вбудовано програмований дозиметр, моторизована полиця для вертикального переміщення по висоті і регулювання дистанції від випромінювача у діапазоні від 15 см до 63 см, а також система колімації, яка дозволяє змінювати параметри пучка та розмір поля випромінювання з фокусуванням пучка у центрі поля випромінювання.

Під час опромінення тварин фіксували на спеціальній підставці з використанням свинцевого саркофагу для захисту інших частин тіла щура. Рентгенівське випромінювання було колімоване таким чином, що розміри поля опромінення складали $(3,0 \times 3,0)$ см, потужність дози складала 7,2 Гр/хв при нарузі на рентгенівській трубці 200 кВ, силі току 9,5 мА, дистанція «джерело – об'єкт» дорівнювала 37 см.

Потужність експозиційної дози у повітрі вимірювали за допомогою універсального дозиметра UNIDOS у комплекті з циліндричною іонізаційною камерою PTW 30013. Похибка вимірювання експозиційної дози рентгенівського випромінювання складала ± 4 %.

Локальне опромінення виконували за різними варіантами: 1 – без фільтрів; 2 – з використанням фільтра Al товщиною 0,5 мм; 3 – з

використанням фільтра Cu товщиною 0,3 мм. Щури були розподілені на 6 піддослідних груп, кожна складалася з 10 – 12 тварин. Поглинена доза на стегно щурів складала 50 Гр.

Експертну оцінку клінічного стану опромінених ділянок шкіри щурів проводили на підставі спеціально розробленої в лабораторії методики (затверджено Вченою радою ДУ «ІМРО НАМН України», протокол № 10 від 23.12.2021 р.).

Для цього використовували спеціально розроблену скоринг–шкалу у балах: 0 ступінь – шкіра без змін; I ступінь – легка еритема, сухе лущення та зниження потовиділення (1,0 – 1,5 балів); II ступінь – справжня еритема, сухе лущення та помірний набряк (2,0 – 2,5 балів); III ступінь – зливне вологе лущення, набряк та коричневі кірки (3,0 – 3,5 балів); IV ступінь – ерозії, що кровоточать, виразки і некрози (4,0 – 4,5 балів); V ступінь – розвиток ішемічного некрозу дерми (5,0 – 5,5 балів); VI ступінь – розвиток гангрени (6,0 балів). Застосована в експериментальній моделі скоринг шкала засновувалася на рекомендаціях Міжнародного союзу боротьби з раком для клінічної оцінки тяжкості радіаційного ураження шкіри, щоб більш точно відповідати оцінці, яка використовується в клініці.

Для аналізу площі ураження опромінену ділянку шкіри кожного щура фотографували цифровою камерою у кожний момент часу. За цими зображеннями визначали відсоток ураженої ділянки шляхом розрахунку відношення площі ураження до загальної опроміненої площі з використанням програми Image J, версія 1.47 (NIH, Bethesda, MD, USA). Радіаційні ураження визначалися як струпи, кірки та/або лущення і виразки. Площу опромінення визначали як площу, де спостерігалось випадання шерсті. Відсоток загоєння ран для кожного щура аналізували та дані усереднювали.

2.3 Локальне та системне уведення алогенних МСК КМ в експериментальній моделі радіаційного ураження шкіри у щурів

Після опромінення експериментальні тварини випадковим чином розподілялися на контрольну та піддослідні групи. Кожна група складалася з 12 – 15 тварин. Контрольну групу складали тварини з локальним опроміненням стегна у дозі 50 Гр (контроль опромінення). Піддослідні групи складалися з опромінених тварин, яким проводили локальне та/або системне уведення алогенних МСК КМ.

Кожному щуру в піддослідних групах з локальним уведенням галогенних МСК КМ робили внутрішньо шкірну багатоточкову ін'єкцію МСК КМ (в 1 мл фізіологічного розчину) по всьому периметру пошкодженої ділянки шкіри дворазово у дозі $1,5 \times 10^6$ клітин/мл на тварину на 14 добу та у дозі 1×10^6 клітин/мл на тварину на 21 добу після опромінення. Щурам контрольної групи багатоточково вводили 1,0 мл фізіологічного розчину.

В піддослідних групах з системним уведенням галогенних МСК КМ робили ін'єкцію у хвостову вену щура дворазово у дозі $1,5 \times 10^6$ клітин/мл на тварину на 14 добу та 21 добу після опромінення. В окремої групі піддослідних тварин робили однократну ін'єкцію алогенних МСК КМ у дозі $1,5 \times 10^6$ клітин/мл на тварину робили лише на 14 добу після опромінення. Щурам контрольної групи у хвостову вену вводили 1,0 мл фізіологічного розчину.

Системну запальну відповідь та протизапальну активність алогенних МСК КМ аналізували за рівнем С-реактивного білка у сироватці крові щурів на 1, 4, 14, 22 і 28 добу після опромінення. Кількісне вимірювання рівню С-реактивного білку проводили за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора Respons 910 (Dia Sys Diagnostic Systems GmbH, Німеччина). Для проведення цих досліджень щурів з кожної контрольної

та піддослідної групи ($n = 5-7$ щурів) евтаназували передозуванням (50 мг/кг) тіопенталу натрію («Бровафарма», Україна).

2.4. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою пакета програм Statistica, v.5.0 та Biostatistica, v.4.03 з використанням точного метода Фішера, критерія Манна-Уїтні та t-критерія Стьюдента. Значення виражали як середнє \pm SD. Значення $P < 0,05$ вважалося значущим.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Терапевтичний вплив алогенних МСК КМ в експериментальній моделі радіаційного ураження шкіри при локальному опроміненні стегна щурів у дозі 50 Гр

За даними клінічних спостережень на момент першого уведення МСК КМ на 14 добу після опромінення у дозі 50 Гр, у всіх тварин в контрольній і дослідній групах спостерігалися реакції вологої десквамації з виникненням ділянок оголеної поверхні у зоні опромінення (рис. 3.1 а, б).

У піддослідних тварин через 1 добу після одноразового уведення алогенних МСК КМ запальні реакції та почервоніння шкіри в опромінені ділянках візуально були менш вираженими, що помітно відрізнялося від стану шкіри у тварин в контрольній групі (рис. 3.1, в, г).

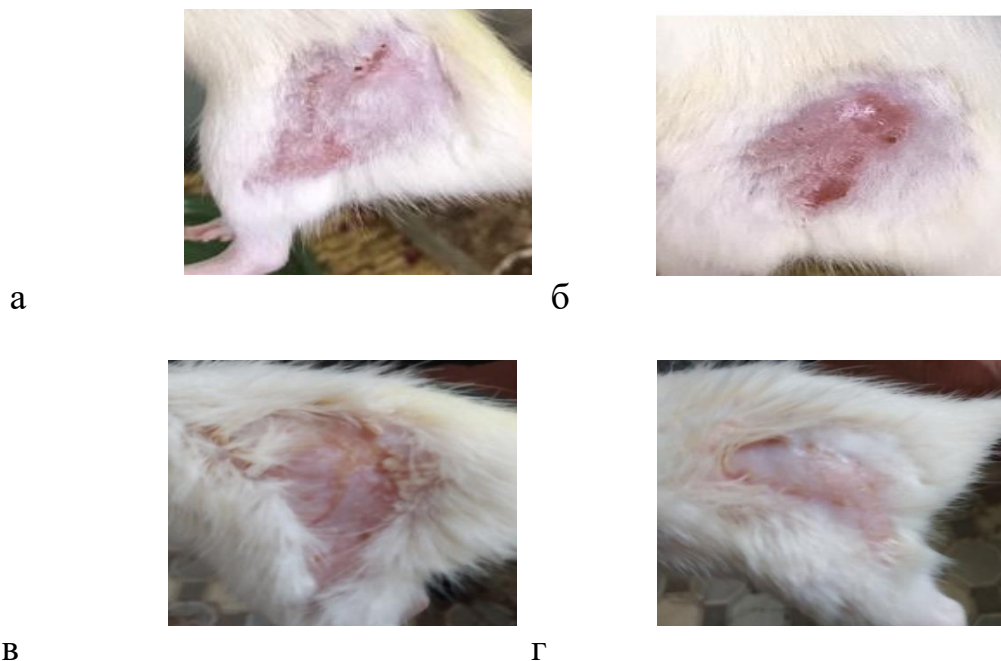


Рис 3.1 Клінічні реакції у шкірі щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр та уведення алогенних МСК КМ: 4а – контрольна група (14 доба після опромінення); б – дослідна група (14 доба після опромінення); в – дослідна група (до уведення МСК КМ, 14 доба після опромінення); г – дослідна група (1 доба після першого уведення МСК КМ, 15 доба після опромінення).

На 22 добу після опромінення у тварин у контрольній групі відбувалося розгортання вираженої клінічної реакції вологої десквамації балів з порушенням цілісності шкіри та утворенням кірок (рис. 3.2, а).



а

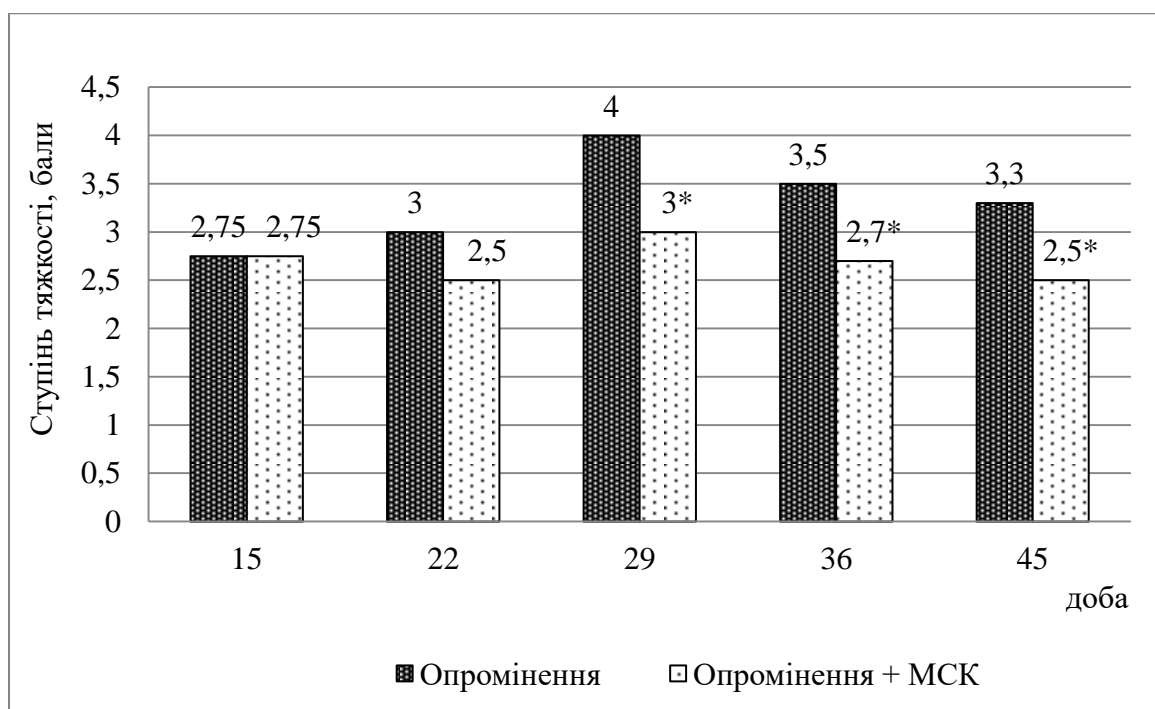


б

Рис. 3.2 Клінічні реакції у шкірі щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр та уведення алогенних МСК КМ: а – контрольна група (22 доба після опромінення); б – дослідна група (2 доба після другого уведення МСК КМ та 7 доба після першого уведення МСК КМ, 22 доба після опромінення).

Разом з цим, у піддослідних тварин у цей термін, тобто через 1 добу після другого уведення МСК КМ струпи були більш тоншими, світлими і поверхневими. В більшості випадків ураження шкіри в опромінені ділянках у цей строк обмежувалися появою жовтих кірок без виражених запальних реакцій (рис. 3.2, б).

За результатами скорінг аналізу було показано, що ступінь тяжкості клінічних реакцій у зоні опромінення у тварин з дворазовим локальним уведенням алогенних МСК КМ на 29 добу була достовірно зниженою в 1,32 разу та залишалася значимо зниженою у подальші строки (рис. 3.3).



Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем опромінення

Рис. 3.3 – Ступінь тяжкості радіаційних уражень шкіри у щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр та уведення алогенних МСК КМ

Як видно з даних, наведених у табл. 1.1, на початок введення МСК КМ площа уражених ділянок та відсоток ураженої поверхні шкіри у зонах опромінення за середніми значеннями достовірно не відрізнялися у тварин в контрольній і піддослідній групах.

У піддослідних тварин на 22 добу площа уражених ділянок шкіри практично не змінювалася відносно попередніх розмірів, у той час як у тварин з контрольним опроміненням цей показник зростав майже у 1,26 разу (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Площа уражених ділянок шкіри (см²) та відсоток ураженої площі (%) у щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр та уведення алогенних МСК КМ ($X \pm S_x$)

Показник	Термін спостереження, доба				
	15 (1МСК)	22 (2МСК)	28	36	42
Опромінення 50 Гр					
Площа ураженої ділянки (см ²)	5,3 ± 0,4	5,7 ± 0,3	5,9 ± 0,7	5,2 ± 0,4	5,5 ± 0,3
% ураженої площі	58,9 ± 4,0	63,3 ± 5,9	65,6 ± 5,2	57,8 ± 5,6	62,2 ± 4,9
Опромінення + МСК КМ (локально)					
Площа ураженої ділянки (см ²)	5,8 ± 0,6	5,5 ± 0,3	5,0 ± 0,4*	4,2 ± 0,2*	3,6 ± 0,2*
P_1					
% ураженої площі	64,5 ± 4,5	61,1 ± 5,1	55,5 ± 5,2	46,3 ± 5,1	40,0 ± 3,8
P_1	0,386	0,805	0,230	0,150	0,007

Примітка. P_1 – порівняно з контролем опромінення

У піддослідних тварин через 7 діб після дворазового локального уведення алогенних МСК КМ, тобто починаючи з 28 доби після опромінення, площа уражених ділянок шкіри у зоні опромінення послідовно зменшувалася за середніми розмірами та спостерігалось більш інтенсивне загоєння шкіри.

На 42 добу у піддослідних тварин середній відсоток ураженої поверхні шкіри не перевищував (40,0 ± 3,8) % відносно загальної площі опроміненої зони, що було у 1,63 разу нижчі, чим у тварин в контрольній групі. Відмінності між середніми розмірами площі ураження у піддослідних і контрольних тварин були статистично достовірними (табл.1.1).

На кінцевому етапі дослідів, на 72 добу після опромінення, у 26,7 % тварин в контрольній групі на пізніх етапах спостерігалися радіаційні ураження, що не загоювалися до кінця спостережень (рис. 3.4).

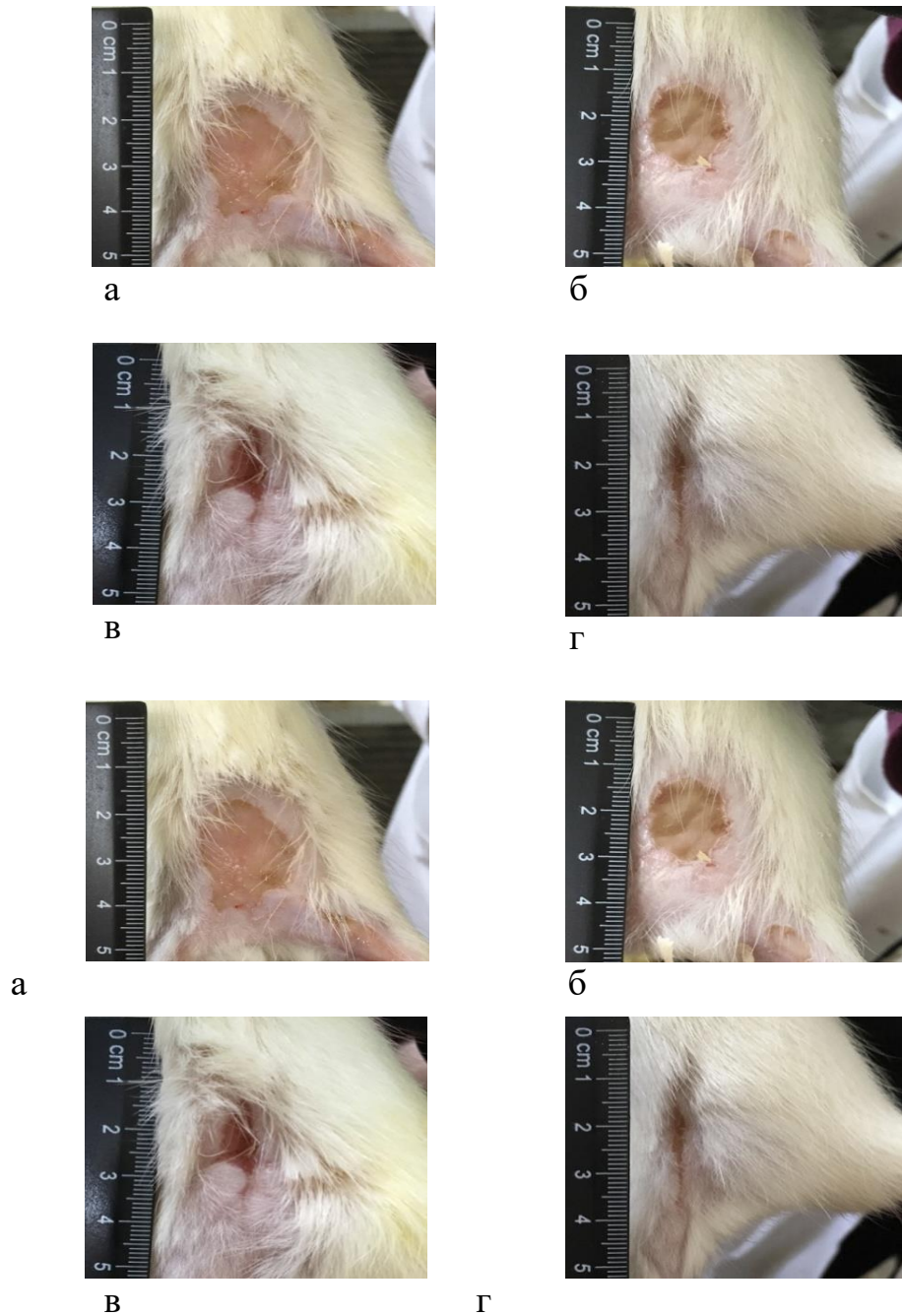


Рис. 3.4 Клінічні реакції у шкірі щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр та уведення алогенних МСК КМ: а – контрольна група (36 доба після опромінення); б – дослідна група (21 доба після дворазового уведення МСК КМ, 36 доба після опромінення); в – контрольна група (72 доба після опромінення); г – дослідна група (58 доба після дворазового уведення МСК КМ, 72 доба після опромінення).

Навпаки, у тварин з уведеними алогенними МСК КМ визначалося загоєння радіаційних уражень (рис. 3.4). У більшості випадків, у 60,0 % піддослідних тварин, на опромінених ділянках відновилося зростання волосся та відсоток площі незагоєної поверхні шкіри у зоні опромінення за середнім значенням не перевищував $(4,9 \pm 1,2)$ %.

В окремій серії дослідів проводили системне уведення алогенних МСК КМ, які трансплантували у хвостову вену щурам дворазово на 14 та 21 добу або одноразово у лише на 14 добу після локального опромінення стегна у дозі 50 Гр.

Як показали проведені дослідження, у піддослідних тварин з дворазовим системним уведенням алогенних МСК КМ прогресування радіаційного ураження у зонах опромінення шкіри помітно затримувалося. До 42 доби спостережень клінічні реакції в уражених ділянках шкіри у 15,3 % тварин обмежувалися лише вологим лущенням різного ступеня тяжкості без виникнення радіаційних виразок (рис. 3.5, а).

У піддослідних тварин з одноразовим системним уведенням алогенних МСК КМ помітного поліпшення стану шкіри в уражених ділянках шкіри не спостерігалось. На 42 добу практично у всіх тварин продовжувалося утворення кірок у незагоєних ділянках ураженої поверхні шкіри (рис. 3.5, б).

За результатами скорінг аналізу, у піддослідних тварин з системним уведенням МСК КМ ступінь тяжкості клінічних реакцій в зоні опромінення обмежувалася середньою величиною $(3,0 - 4,0)$ балів, у той час як у контрольних тварин визначалося стійке прогресування виразкових процесів $(5,0 - 5,5)$ балів (табл. 3.1).

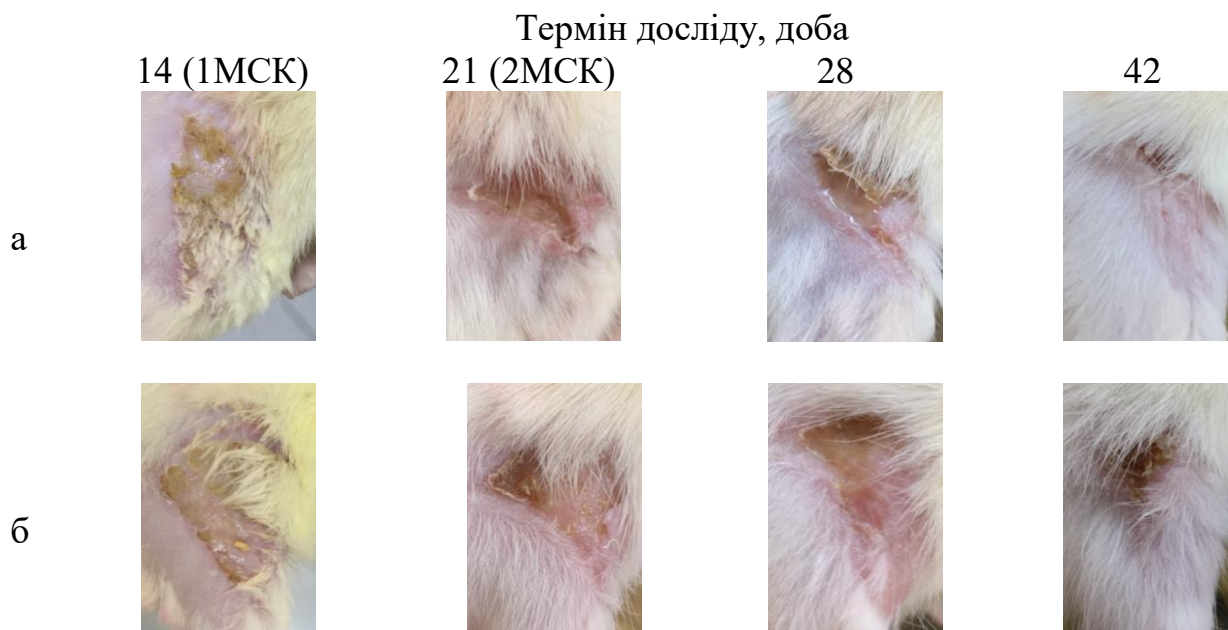


Рис. 3.5 – Клінічні реакції у шкірі після локального рентгенівського опромінення у дозі 75 Гр щурів та системного уведення алогенних МСК КМ: а – дворазове уведення алогенних МСК КМ; б – одноразове уведення алогенних МСК КМ

Таблиця 3.1

Ступінь тяжкості радіаційних уражень шкіри у щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр та системного уведення алогенних МСК КМ, бали ($X \pm S_x$)

Дослід	Термін спостереження, доба				
	15 (1МСК)	22 (2МСК)	28	36	42
Опромінення	$3,0 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,3$
Опромінення + МСК КМ (системно, дворазово)	$2,8 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,3$
P_1	0,195	0,111	0,005	0,016	0,008
Опромінення + МСК КМ (системно, одноразово)	$2,9 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,3$
P_1	0,500	0,195	0,024	0,195	0,046

Примітка. P_1 – порівняно з контролем опромінення

Незважаючи на те, що системне уведення алогенних МСК КМ призводило до зниження ступеня тяжкості гострих реакцій в опроміненій шкірі, пізніше у більшості піддослідних тварин відбувалося прогресування радіаційного ураження з утворенням пізніх хронічних виразок. На пізніших етапах площа уражених ділянок та темпи загоєння шкіри статистично не відрізнялись у контрольних та піддослідних тварин (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Площа уражених ділянок шкіри (см²) та відсоток ураженої площі (%) у щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр та системного уведення алогенних МСК КМ, ($X \pm Sx$)

Показник	Термін спостереження, доба				
	15 (1МСК)	22 (2МСК)	28	36	42
Опромінення 75 Гр					
Площа ураженої ділянки (см ²)	5,6 ± 0,4	5,7 ± 0,5	5,9 ± 0,8	5,5 ± 0,6	5,3 ± 0,5
% ураженої площі	62,2 ± 5,7	63,3 ± 5,2	65,7 ± 4,9	61,1 ± 5,6	58,9 ± 4,9
Опромінення + МСК КМ (системно, дворазово)					
Площа ураженої ділянки (см ²)	5,8 ± 0,4	5,6 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,0 ± 0,3	4,9 ± 0,5
P ₁	0,720	0,878	0,449	0,470	0,582
% ураженої площі	64,4 ± 5,1	62,2 ± 5,0	57,8 ± 5,2	55,6 ± 5,0	54,4 ± 5,1
P ₁	0,730	0,881	0,291	0,280	0,514
Опромінення + МСК КМ (системно, одноразово)					
Площа ураженої ділянки (см ²)	5,8 ± 0,3	5,6 ± 0,3	5,5 ± 0,3	5,3 ± 0,4	5,0 ± 0,4
P ₁	0,696	0,867	0,648	0,786	0,648
% ураженої площі	64,4 ± 4,9	62,2 ± 5,1	61,1 ± 4,6	58,9 ± 5,0	55,6 ± 5,0
P ₁	0,745	0,809	0,507	0,502	0,646

Примітка. P₁ – порівняно з контролем опромінення

Отже, за результатами проведених досліджень було встановлено терапевтичну ефективність алогенних МСК КМ при локальному уведенні щурів з радіаційним ураженням шкіри різної ступені тяжкості.

Встановлено, що локальне уведення алогенних МСК КМ значно знижувало тяжкість гострих клінічних реакцій в опроміненій шкірі на ранній фазі радіаційного ураження, сприяло більш повноцінному загоєнню уражених ділянок шкіри у більш скорочені строки та запобігало виникненню радіаційних виразок на пізніх етапах у тварин, опроміненіх у дозі 50 Гр.

Разом с тим, системне уведення алогенних МСК КМ мало виразний терапевтичний ефект лише на ранніх етапах після опромінення, що виражалося у зниженні тяжкості гострих клінічних реакцій в опроміненій шкірі, але ж у більшості випадків системне втручання галогенних МСК КМ не попереджало прогресування радіаційного ураження шкіри у більш віддалені строки після опромінення.

3.2 Протизапальна активність алогенних МСК КМ при радіаційному ураженні шкіри у щурів з локальним опроміненням у дозі 50 Гр

У дослідях з введенням алогенних МСК КМ тваринам з локальним опроміненням стегна у дозі 50 Гр проводили визначення рівню С-реактивного білку у сироватці крові.

Згідно до отриманих результатів, у контрольних тварин з локальним опроміненням стегна у дозі 50 Гр рівень С-реактивного білка у сироватці крові достовірно перевищував, майже у 2 рази, нормальний діапазон цього показника в інтактних тварин вже на 1 добу після опромінення та потім залишався достовірно підвищеним протягом всього періоду спостережень (табл. 3.3).

У період розгортання гострих клінічних реакцій вологої десквамації з порушенням цілісності шкіри та виникненням ерозій в опроміненіх ділянках шкіри, у групі тварин з контрольним опроміненням рівень С-

реактивного білку демонстрував кілька піків та достовірно зростав відповідно на 22 добу у 3,0 рази та на 28 добу у 3,4 рази порівняно з інтактним контролем, що свідчило про виникнення потужних системних та місцевих запальних хвиль у тварин в ці строки після опромінення.

У тварин з радіаційними ураженнями шкіри, що не загоювалися на 42 добу спостережень, значення С-реактивного білку у сироватці крові залишалися достовірно підвищеними у 2,9 разу (табл. 3.3).

У піддослідних тварин через 1 добу після першого локального уведення алогенних МСК КМ місцеві запальні реакції з почервонінням шкіри у зоні опромінення візуально було менш вираженим, але ж значення С-реактивного білку у сироватці крові залишалися на такому же рівні, як у тварин в групі з контрольним опроміненням (табл. 3.4).

Разом з тим, на 28 добу після опромінення, тобто через 7 діб після другого локального уведення алогенних МСК КМ, рівень С-реактивного білку у сироватці крові достовірно знижувався у 2,0 рази, що узгоджувалося із поліпшенням стану шкіри та зниженням місцевого запалення в опромінених ділянках порівняно з контрольними тваринами.

Таблиця 3.3

Кількість С-реактивного білку у сироватці крові щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр, мг/л.

Дослід	Термін спостереження, доба					
	n	$\bar{X} \pm S_x$	Me	min	max	P ₁
Інтактні тварини	5	8,7 ± 0,5	8,0	7,2	9,3	–
1 д	5	17,1 ± 1,5	16,9	13,9	18,3	0,001
4 д	5	12,4 ± 1,0	12,1	10,2	13,0	0,011
15 д	7	15,6 ± 1,7	15,2	13,6	15,8	0,008
22 д	5	26,1 ± 3,1	25,5	20,5	26,8	0,001
28 д	7	29,8 ± 3,3	28,2	27,8	33,2	0,001
42 д	7	25,4 ± 3,9	23,1	22,4	27,5	0,005

Примітка. P₁ – порівняно з інтактним контролем.

Крім того, на 42 добу після опромінення, тобто через 21 добу після другого локального уведення галогенних МСК КМ, у піддослідних тварин, в яких спостерігалось загоєння шкіри, значення С-реактивного білку у сироватці крові визначалися практично на вихідному рівня в інтактних тварин практично досягали нормальних величин (табл. 3.4)

Таблиця 3.4

Кількість С-реактивного білку у сироватці крові щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр з локально введеними алогенними МСК КМ, мг/л.

Дослід	Термін спостереження, доба						
	n	$\bar{X} \pm S_x$	Me	min	max	P ₁	P ₂
Інтактні тварини	5	8,7 ± 0,5	8,0	7,2	9,3	–	–
1 д	7	16,5 ± 1,3	16,1	14,2	17,2	0,001	0,770
4 д	7	12,1 ± 0,9	11,8	9,8	12,9	0,002	0,725
15 д (1МСК)	7	14,2 ± 1,0	13,9	12,8	15,0	0,001	0,491
22 д (2МСК)	7	16,3 ± 2,1	16,8	15,9	18,6	0,001	0,021
28 д	7	14,7 ± 1,8	13,9	13,1	15,4	0,001	0,001
42 д	7	10,9 ± 1,2	9,9	9,0	11,2	0,114	0,001

Примітка. P₁ – порівняно з інтактним контролем; P₂ – порівняно з контрольним опроміненням.

Крім того, на 42 добу після опромінення, тобто через 21 добу після другого локального уведення алогенних МСК КМ, у піддослідних тварин, в яких спостерігалось загоєння шкіри, значення С-реактивного білку у сироватці крові визначалися практично на вихідному рівня в інтактних тварин практично досягали нормальних величин (табл. 3.4).

У піддослідних тварин з дворазовим системним введенням алогенних МСК КМ рівень С-реактивного білку у сироватці крові був достовірно зниженим через 1 добу після першого уведення МСК КМ – у

1,5 рази та через 1 добу після другого уведення МСК КМ – у 2,2 рази порівняно з опроміненним контролем (табл. 3.5).

Відповідно, на 28 та 42 добу після опромінення, саме у період розгортання гострих клінічних реакцій у шкірі, значення показника залишалися зниженими відповідно у 2,1 рази та 1,9 рази відносно опроміненого контролю (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Кількість С-реактивного білку у сироватці крові у щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр з системно введеними (дворазово) алогенними МСК КМ, мг/л.

Дослід	Термін спостереження, доба						
	n	$\bar{X} \pm S_x$	Me	min	max	P ₁	P ₂
Інтактні тварини	5	8,7 ± 0,5	8,0	7,2	9,3	–	–
1 д	7	15,5 ± 1,7	15,2	14,8	16,1	0,008	0,518
4 д	7	12,3 ± 1,5	12,7	11,3	14,2	0,080	0,922
15 д (1МСК)	7	10,6 ± 1,2	10,2	9,5	11,8	0,234	0,033
22 д (2МСК)	7	12,1 ± 1,0	11,8	10,9	13,3	0,023	0,001
28 д	7	14,1 ± 1,3	13,8	12,9	14,5	0,007	0,001
42 д	7	13,2 ± 1,2	12,6	10,8	14,4	0,013	0,001

Примітка. P₁ – порівняно з інтактним контролем; P₂ – порівняно з контрольним опроміненням.

Ці результати поєднувались з клінічними даними, згідно до яких у піддослідних тварин з дворазовим системним уведенням алогенних МСК КМ у цей період прогресування запальних процесів в опроміненої шкірі помітно затримувалося та клінічні реакції у більшості випадків обмежувалися вологим лущенням різного ступеня тяжкості без виникнення хронічних виразок, що не загоювалися.

Водночас, у піддослідних тварин з одноразовим системним уведенням алогенних МСК КМ ці ефекти при вимірюванні С-реактивного білка у сироватці крові були менш вираженими (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Кількість С-реактивного білку у сироватці крові у щурів після локального рентгенівського опромінення у дозі 50 Гр з системно уведеними (одноразово) алогенними МСК КМ, мг/л.

Дослід	Термін спостереження, доба						
	n	$\bar{X} \pm S_x$	Me	min	max	P ₁	P ₂
Інтакт. тварини	5	8,7 ± 0,5	8,0	7,2	9,3	–	–
1 д	7	16,2 ± 1,5	15,9	14,2	15,8	0,002	0,689
4 д	7	12,7 ± 1,1	12,9	10,8	13,3	0,016	0,851
15 д(1МСК)	7	11,9 ± 1,6	10,8	9,8	12,9	0,134	0,139
22 д	7	15,2 ± 1,4	14,8	13,2	16,7	0,004	0,005
28 д	7	16,2 ± 1,9	16,0	15,6	17,1	0,009	0,004
42 д	7	17,8 ± 2,2	16,9	14,6	18,9	0,007	0,115

Примітка. P₁ – порівняно з інтактним контролем; P₂ порівняно з контрольним опроміненням.

Таким чином, за результатами проведених досліджень був продемонстровано виражений протизапальний потенціал алогенних МСК КМ при локальному та системному терапевтичному введенні в експериментальній моделі радіаційного ураження шкіри після рентгенівського опромінення стегна щурів у дозі 50 Гр.

Терапевтичне дворазове системне введення алогенних МСК КМ забезпечувало стійке зниження рівню С-реактивного білку у сироватці крові опромінених тварин, практично, у 2 рази. В ранній запальній фазі радіаційного ураження шкіри це сприяло зниженню системних та місцевих запальних реакцій, що узгоджувалося із зниженням ступені тяжкості гострих клінічних реакцій в уражених ділянках шкіри у зоні опромінення.

Терапевтичне одноразове системне введення алогенних МСК КМ було менш ефективним за протизапальною дією. При локальному введенні алогенних МСК КМ зміни рівню С-реактивного білку у сироватці крові при ранньому запаленні були менш вираженими порівняно із системним введенням, але ж терапевтичні ефекти після другої ін'єкції алогенних МСК

КМ були більш вираженими та значними за зниженням запальних реакцій та попередження прогресування радіаційного ураження шкіри на більш пізніших етапах після опромінення.

ВИСНОВКИ

У даній роботі було досліджено терапевтичний вплив алогенних МСККМ в експериментальній моделі радіаційного ураження шкіри у щурів. За отриманими результатами були отримані наступні висновки:

1. Було обґрунтовано актуальність дослідження, проаналізовано біологічні властивості і характеристики МСК КМ, які обумовлюють їх терапевтичний потенціал, а також окремі механізми терапевтичної дії та можливості клінічного використання МСК КМ у лікуванні радіаційних уражень шкіри

2. Було розроблено модель радіаційного ураження шкіри за локальним опроміненням стегна щурів у дозі 50 Гр для експериментальної оцінки терапевтичної активності алогенних МСК при локальному та системному уведенні тваринам (щурам).

2. Встановлено, що терапевтична ефективність алогенних МСК КМ в моделі радіаційного ураження шкіри відрізнялась залежно від способу уведення (локальна ін'єкція або системна трансплантація) та кратності уведення алогенних МСК КМ.

4. Доведено, що дворазова локальна ін'єкція алогенних МСК КМ тваринам в моделі радіаційного ураження шкіри знижувала тяжкість гострих клінічних реакцій шкіри у зоні опромінення, прискорювала загоєння опромінених ділянок шкіри та уповільнювала прогресування радіаційного ураження шкіри на пізній стадії.

5. Виявлено, що дворазова системна трансплантація алогенних МСК КМ робила виразний протизапальний ефект за стійким зниженням, у 2 рази, рівню С-реактивного білку у сироватці крові в ранній запальній фазі, що узгоджувалося із зниженням тяжкості гострих клінічних реакцій в уражених ділянках шкіри. Терапевтичне одноразове системне уведення алогенних МСК КМ було менш ефективним за протизапальною дією.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Medical Management of Radiation Injuries, Safety Reports Series: International Atomic Energy Agency (2020). No. 101. Vienna: *International Atomic Energy Agency*. ISBN 978–92–0–161919–8.
2. Flamant, S., Loinard, C., & Tamarat, R. (2023). MSC beneficial effects and limitations, and MSC-derived extracellular vesicles as a new cell-free therapy for tissue regeneration in irradiated condition. *Environmental Advances*, 13, 100408. DOI: 10.1016/j.envadv.2023.100408.
3. Mastrolia, I., Foppiani, E. M., Murgia, A., Candini, O., Samarelli, A. V., Grisendi, G., ... & Dominici, M. (2019). Challenges in clinical development of mesenchymal stromal/stem cells: concise review. *Stem cells translational medicine*, 8(11), 1135–1148. DOI: 10.1002/sctm.19-0044.
4. Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem cells*, 37(7), 855–864. DOI: 10.1002/stem.3016.
5. Minguell, J. J., Conget, P., & Erices, A. (2000). Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 881–887. DOI: 10.1590/s0100-879x2000000800003.
6. Caplan, A. I. (2015). Adult mesenchymal stem cells: when, where, and how. *Stem cells international*, 2015. DOI: 10.1155/2015/628767.
7. Al Naem, M., Bourebaba, L., Kucharczyk, K., Röcken, M., & Marycz, K. (2020). Therapeutic mesenchymal stromal stem cells: Isolation, characterization and role in equine regenerative medicine and metabolic disorders. *Stem cell reviews and reports*, 16, 301–322. DOI: 10.1007/s12015-019-09932-0.
8. Heo, J. S., Choi, Y., Kim, H. S., & Kim, H. O. (2016). Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *International journal of molecular medicine*, 37(1), 115–125. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2413.

9. Russo, E., Lee, J. Y., Nguyen, H., Corrao, S., Anzalone, R., La Rocca, G., & Borlongan, C. V. (2020). Energy metabolism analysis of three different mesenchymal stem cell populations of umbilical cord under normal and pathologic conditions. *Stem Cell Reviews and Reports*, *16*, 585–595. DOI: 10.1007/s12015-020-09967-8.
10. Peng, L., Jia, Z., Yin, X., Zhang, X., Liu, Y., Chen, P., ... & Zhou, C. (2008). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem cells and development*, *17*(4), 761–774. DOI: 10.1089/scd.2007.0217.
11. Benderitter, M., Herrera-Reyes, E., & Tamarat, R. (2022). Mesenchymal stromal cells in the regeneration of radiation-induced organ sequelae: will they make the difference?. *Journal of Radiological Protection*, *42*(2), 024001. DOI: 10.1088/1361-6498/ac6dd8.
12. Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
13. Lazarus, H. M., Koc, O. N., Devine, S. M., Curtin, P., Maziarz, R. T., Holland, H. K., ... & Bacigalupo, A. (2005). Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biology of blood and marrow transplantation*, *11*(5), 389–398. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.02.001.
14. Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem cells*, *25*(11), 2896–2902. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0637.
15. Yu, Y., Yoo, S. M., Park, H. H., Baek, S. Y., Kim, Y. J., Lee, S., ... & Kang, K. S. (2019). Preconditioning with interleukin-1 beta and interferon-gamma enhances the efficacy of human umbilical cord blood-derived

mesenchymal stem cells-based therapy via enhancing prostaglandin E2 secretion and indoleamine 2, 3-dioxygenase activity in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(10), 1792–1804. DOI: 10.1002/term.2930.

16. Muraglia, A., Cancedda, R., & Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of cell science*, 113(7), 1161–1166. DOI: 10.1242/jcs.113.7.1161.

17. Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells*, 8(8), 886. DOI: 10.3390/cells8080886.

18. Desgres, M., & Menasche, P. (2019). Clinical translation of pluripotent stem cell therapies: challenges and considerations. *Cell Stem Cell*, 25(5), 594–606. DOI: 10.1016/j.stem.2019.10.001.

19. Lin, W., Huang, L., Li, Y., Fang, B., Li, G., Chen, L., & Xu, L. (2019). Mesenchymal stem cells and cancer: clinical challenges and opportunities. *BioMed Research International*, 2019. DOI: 10.1155/2019/2820853.

20. Xu, W., Yang, Y., Li, N., & Hua, J. (2023). Interaction between Mesenchymal Stem Cells and Immune Cells during Bone Injury Repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14484. DOI: 10.3390/ijms241914484.

21. Wang, S., Huo, J., Liu, Y., Chen, L., Ren, X., Li, X., ... & Zheng, Y. (2023). Impaired immunosuppressive effect of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes on T cells in aplastic anemia. *Stem Cell Research & Therapy*, 14(1), 285. DOI: 10.1186/s13287-023-03496-0.

22. de Castro, L. L., Lopes-Pacheco, M., Weiss, D. J., Cruz, F. F., & Rocco, P. R. M. (2019). Current understanding of the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells. *Journal of Molecular Medicine*, 97(5), 605–618. DOI: 10.1007/s00109-019-01776-y.

23. Al Demour, S., Jafar, H., Adwan, S., AlSharif, A., Alhawari, H., Alrabadi, A., ... & Awidi, A. (2018). Safety and potential therapeutic effect of two intracavernous autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells injections in diabetic patients with erectile dysfunction: an open label phase I clinical trial. *Urologia internationalis*, *101*(3), 358–365. DOI: 10.1159/000492120.
24. Parekkadan, B., & Milwid, J. M. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual review of biomedical engineering*, *12*, 87–117. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-070909-105309.
25. Deans, R. J., & Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental hematology*, *28*(8), 875–884. DOI: 10.1016/s0301-472x(00)00482-3. PMID: 10989188.
26. da Silva Meirelles, L., Fontes, A. M., Covas, D. T., & Caplan, A. I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews*, *20*(5–6), 419–427. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.
27. Iacopetti, I., Perazzi, A., Patruno, M., Contiero, B., Carolo, A., Martinello, T., & Melotti, L. (2023). Assessment of the quality of the healing process in experimentally induced skin lesions treated with autologous platelet concentrate associated or unassociated with allogeneic mesenchymal stem cells: preliminary results in a large animal model. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*, 1219833. DOI: 10.3389/fvets.2023.1219833.
28. Andrews, P. W., Ben-David, U., Benvenisty, N., Coffey, P., Eggan, K., Knowles, B. B., ... & Stacey, G. N. (2017). Assessing the safety of human pluripotent stem cells and their derivatives for clinical applications. *Stem cell reports*, *9*(1), 1–4. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.05.029.
29. Yang, P., Zhang, S., Yan, T., Li, F., & Zhang, S. (2023). The therapeutic application of stem cells and their derived exosomes in the treatment of radiation-induced skin injury. *Radiation Research*, *199*(2), 182–201. DOI: 10.1667/RADE-22-00023.1.

30. Bhatt, J., Bhat, A. R., Singh, A. P., Pawde, A. M., Bhat, I. A., & Sharma, G. T. (2021). Studies on the efficacy of single and twice application of mesenchymal stem cells in full thickness cutaneous wound healing. *Indian Journal of Animal Research*, *55*(11), 1330–1336. DOI: 10.18805/IJAR.B-4212.
31. Cheng, Y., & Song, G. (2021). Mesenchymal stem cells and skin injury repair. *Sheng wu yi xue Gong Cheng xue za zhi= Journal of Biomedical Engineering= Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi*, *38*(2), 387–392. DOI: 10.7507/1001-5515.202011017.
32. Huang, Y. Z., Gou, M., Da, L. C., Zhang, W. Q., & Xie, H. Q. (2020). Mesenchymal stem cells for chronic wound healing: current status of preclinical and clinical studies. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *26*(6), 555–570. DOI: 10.1089/ten.TEB.2019.0351.
33. Cerqueira, M. T., Marques, A. P., & Reis, R. L. (2012). Using stem cells in skin regeneration: possibilities and reality. *Stem cells and development*, *21*(8), 1201–1214. DOI: 10.1089/scd.2011.0539.
34. Riccobono, D., Francois, S., Valente, M., Forcheron, F., & Drouet, M. (2014). Advances in Stem Cell Therapy: Specific Applications in the Treatment of Cutaneous Radiation Syndrome. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, *4*(3), 1-13. DOI: 10.4172/2157-7633.1000186.
35. Tan, K., Zhu, H., Zhang, J., Ouyang, W., Tang, J., Zhang, Y., ... & Deng, X. (2019). CD73 expression on mesenchymal stem cells dictates the reparative properties via its anti-inflammatory activity. *Stem cells international*, *2019*. DOI: 10.1155/2019/8717694.
36. Shi, Y., Wang, Y., Li, Q., Liu, K., Hou, J., Shao, C., & Wang, Y. (2018). Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nature Reviews Nephrology*, *14*(8), 493–507. DOI: 10.1038/s41581-018-0023-5.
37. Nauta, A. J., & Fibbe, W. E. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *110*(10), 3499–3506. DOI: 10.1182/blood-2007-02-069716.

38. P De Miguel, M., Fuentes-Julian, S., Blazquez-Martinez, A., Y Pascual, C., A Aller, M., Arias, J., & Arnalich-Montiel, F. (2012). Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Current molecular medicine*, 12(5), 574–591. DOI: 10.2174/156652412800619950.
39. Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y., & Wu, Y. (2008). Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PloS one*, 3(4), e1886. DOI: 10.1371/journal.pone.0001886.
40. Singer, N. G., & Caplan, A. I. (2011). Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 457–478. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130230.
41. Prockop, D. J., & Oh, J. Y. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(1), 14–20. DOI: 10.1038/mt.2011.211
42. Akita, S., Akino, K., Hirano, A., Ohtsuru, A., & Yamashita, S. (2010). Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. *Health physics*, 98(6), 858–862. DOI: 10.1097/HP.0b013e3181d3d52c.
43. Loinard, C., Benadjaoud, M. A., Lhomme, B., Flamant, S., Baijer, J., & Tamarat, R. (2023). Inflammatory cells dynamics control neovascularization and tissue healing after localized radiation induced injury in mice. *Communications Biology*, 6(1), 571. DOI: 10.1038/s42003-023-04939-3.
44. Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665–706. DOI: 10.1152/physrev.00067.2017.
45. Rodgers, K., & Jadhav, S. S. (2018). The application of mesenchymal stem cells to treat thermal and radiation burns. *Advanced drug delivery reviews*, 123, 75–81. DOI: 10.1016/j.addr.2017.10.003.

46. Huang, Y. Z., Gou, M., Da, L. C., Zhang, W. Q., & Xie, H. Q. (2020). Mesenchymal stem cells for chronic wound healing: current status of preclinical and clinical studies. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 26(6), 555–570. DOI: 10.1089/ten.TEB.2019.0351.
47. Cerqueira, M. T., Pirraco, R. P., & Marques, A. P. (2016). Stem cells in skin wound healing: are we there yet?. *Advances in Wound Care*, 5(4), 164–175. DOI: 10.1089/wound.2014.0607.
48. Choi, S., Yoon, M., & Choi, K. Y. (2022). Approaches for regenerative healing of cutaneous wound with an emphasis on strategies activating the Wnt/ β -catenin pathway. *Advances in wound care*, 11(2), 70–86. DOI: 10.1089/wound.2020.1284.
49. 54. Zhang, J., La, X., Fan, L., Li, P., Yu, Y., Huang, Y., ... & Xing, Y. (2015). Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell transplantation in rat burn models. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(5), 5129. PMID: 26191208; PMCID: PMC4503080.
50. Chen, J. S., Wong, V. W., & Gurtner, G. C. (2012). Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cutaneous wound healing. *Frontiers in immunology*, 3, 192. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00192.
51. Zheng, K., Wu, W., Yang, S., Huang, L., Chen, J., Gong, C., ... & Tan, J. (2015). Bone marrow mesenchymal stem cell implantation for the treatment of radioactivity-induced acute skin damage in rats. *Molecular medicine reports*, 12(5), 7065-7071. DOI: 10.3892/mmr.2015.4270.
52. Fang, Z., Chen, P., Tang, S., Chen, A., Zhang, C., Peng, G., ... & Chen, X. (2021). Will mesenchymal stem cells be future directions for treating radiation-induced skin injury?. *Stem Cell Research & Therapy*, 12, 1-11. DOI: 10.1186/s13287-021-02261-5.
53. Ahangar, P., Mills, S. J., & Cowin, A. J. (2020). Mesenchymal stem cell secretome as an emerging cell-free alternative for improving wound repair. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7038. DOI: 10.3390/ijms21197038.

54. Finkelstein, S., Kanee, L., Behroozian, T., Wolf, J. R., van den Hurk, C., Chow, E., & Bonomo, P. (2022). Comparison of clinical practice guidelines on radiation dermatitis: a narrative review. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 30(6), 4663–4674. DOI: 10.1007/s00520-022-06829-6.
55. Mahjoor, M., Fakouri, A., Farokhi, S., Nazari, H., Afkhami, H., & Heidari, F. (2023). Regenerative potential of mesenchymal stromal cells in wound healing: unveiling the influence of normoxic and hypoxic environments. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. DOI: 10.3389/fcell.2023.1245872.
56. Mallis, P., Alevrogianni, V., Sarri, P., Velentzas, A. D., Stavropoulos-Giokas, C., & Michalopoulos, E. (2020). Effect of cord blood platelet gel on wound healing capacity of human mesenchymal stromal cells. *Transfusion and Apheresis Science*, 59(3), 102734. DOI: 10.1016/j.transci.2020.102734.
57. Fathke, C., Wilson, L., Hutter, J., Kapoor, V., Smith, A., Hocking, A., & Isik, F. (2004). Contribution of bone marrow–derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem cells*, 22(5), 812–822. DOI: 10.1634/stemcells.22-5-812.
58. Wang, K. X., Cui, W. W., Yang, X., Tao, A. B., Lan, T., Li, T. S., & Luo, L. (2021). Mesenchymal stem cells for mitigating radiotherapy side effects. *Cells*, 10(2), 294. DOI: 10.3390/cells10020294.
59. Iddins, C. J., DiCarlo, A. L., Ervin, M. D., Herrera-Reyes, E., & Goans, R. E. (2022). Cutaneous and local radiation injuries. *Journal of radiological protection*, 42(1), 011001. DOI: 10.1088/1361-6498/ac241a.
60. Nanduri, L. S. Y., Duddempudi, P. K., Yang, W. L., Tamarat, R., & Guha, C. (2021). Extracellular vesicles for the treatment of radiation injuries. *Frontiers in pharmacology*, 12, 662437. DOI: 10.3389/fphar.2021.662437.

61. An, Y., Lin, S., Tan, X., Zhu, S., Nie, F., Zhen, Y., ... & Wu, J. (2021). Exosomes from adipose-derived stem cells and application to skin wound healing. *Cell Proliferation*, *54*(3), e12993. DOI: 10.1111/cpr.12993.
62. Casado-Díaz, A., Quesada-Gómez, J. M., & Dorado, G. (2020). Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells (MSC) in regenerative medicine: applications in skin wound healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 146. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00146.
63. Forsberg, M. H., Kink, J. A., Hematti, P., & Capitini, C. M. (2020). Mesenchymal stromal cells and exosomes: progress and challenges. *Frontiers in cell and developmental biology*, *8*, 551810. DOI: 10.3389/fcell.2020.00665.
64. Ciferri, M. C., Quarto, R., & Tasso, R. (2021). Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic tools: from pre-clinical to clinical applications. *Biology*, *10*(5), 359. DOI: 10.3390/biology10050359.
65. Gowen, A., Shahjin, F., Chand, S., Odegaard, K. E., & Yelamanchili, S. V. (2020). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: challenges in clinical applications. *Frontiers in cell and developmental biology*, *8*, 149. DOI: 10.3389/fcell.2020.00149.
66. Elsharkasy, O. M., Nordin, J. Z., Hagey, D. W., de Jong, O. G., Schiffelers, R. M., Andaloussi, S. E., & Vader, P. (2020). Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how?. *Advanced drug delivery reviews*, *159*, 332–343. DOI: 10.1016/j.addr.2020.04.004.
67. Bensidhoum, M., Gobin, S., Chapel, A., Lemaitre, G., Bouet, S., Waksman, G., ... & Martin, M. T. (2005). Therapeutic effect of human mesenchymal stem cells in skin after radiation damage. *Journal de la Societe de Biologie*, *199*(4), 337–341. DOI: 10.1051/jbio:2005035.
68. Agay, D., Scherthan, H., Forcheron, F., Grenier, N., Hérodin, F., Meineke, V., & Drouet, M. (2010). Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Experimental Hematology*, *38*(10), 945-956. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.06.008.

69. 75. Jin, I. G., Kim, J. H., Wu, H. G., & Hwang, S. J. (2016). Effect of mesenchymal stem cells and platelet-derived growth factor on the healing of radiation induced ulcer in rats. *Tissue engineering and regenerative medicine*, *13*(1), 78–90. DOI: 10.1007/s13770-015-0055-x.

70. Horton, J. A., Hudak, K. E., Chung, E. J., White, A. O., Scroggins, B. T., Burkeen, J. F., & Citrin, D. E. (2013). Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation. *Stem cells*, *31*(10), 2231-2241. DOI: 10.1002/stem.1483.

71. Keshavarz, R., Olsen, S., & Almeida, B. (2023). Using biomaterials to improve mesenchymal stem cell therapies for chronic, nonhealing wounds. *Bioengineering & translational medicine*, *9*(1), e10598. DOI: 10.1002/btm2.10598.