

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР РЕАБИЛИТАЦИИ И КУРОРТОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Еремин Петр Серафимович

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО
ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РЕГЕНЕРАТОРНОГО
ПОТЕНЦИАЛА СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ
ТКАНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.1.33. Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия, медико-социальная реабилитация

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Рожкова Елена Анатольевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. КЛЕТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И НИЗКОИНТЕНСИВНОЕ ЛАЗЕРНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	16
1.1 Общая характеристика и регенеративные свойства стромально-васкулярной фракции жировой ткани, используемые в восстановительной медицине	16
1.2 Возможности применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани в лечении ран различного генеза	20
1.3 Перспективы применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани в восстановительном лечении ожоговых ран.....	25
1.4 Ограничения и сложности применения стромально-васкулярной фракции и мезенхимальных стволовых клеток в восстановительном лечении ран	28
1.5 Использование низкоинтенсивной лазерной терапии в программах реабилитации и немедикаментозного лечения разных заболеваний.....	31
1.6 Механизмы репаративно-регенераторного эффекта низкоинтенсивной лазерной терапии в лечении ран.....	34
1.7 Механизмы влияния низкоинтенсивной лазерной терапии на функциональную активность мезенхимальных стволовых клеток	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1 Дизайн и объект исследования	42
2.2 Определение эффективности выделения мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани с помощью ферментативного и механического способа	45
2.3 Методы определения энергии низкоинтенсивного лазерного излучения, эффективной для стимуляции регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани <i>in vitro</i>	51

2.4 Определение пролиферативного потенциала мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при воздействии кислой (рН 5.0) и щелочной среды (рН 8.0), как экспериментальной модели клеточного поведения в условиях острого и хронического воспаления <i>in vitro</i>	52
2.5 Определение влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на регенераторную способность стромально-васкулярной фракции жировой ткани в экспериментальной модели тяжелого термического ожога <i>in vivo</i>	53
2.6 Статистическая обработка результатов	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	56
3.1 Сравнительный анализ эффективности выделения мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани с помощью ферментативного и механического способа. 56	
3.2 Влияние энергии низкоинтенсивного лазерного излучения красного и ультрафиолетового спектра на регенераторный потенциал мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани.....	61
3.3 Пролиферативный потенциал мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при воздействии кислой (рН 5.0) и щелочной среды (рН 8.0), как экспериментальной модели клеточного поведения в условиях острого и хронического воспаления <i>in vitro</i>	66
3.4 Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения.....	70
красного и ультрафиолетового спектра на пролиферативную активность и жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в экспериментальной <i>in vitro</i> модели острого и хронического воспаления.....	70
3.5 Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на регенераторную способность стромально-васкулярной фракции в модели тяжелого термического ожога <i>in vivo</i>	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	85
ВЫВОДЫ	93
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	95
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Использование эффективных немедикаментозных технологий, в том числе низкоинтенсивного лазерного излучения, для повышения регенераторного потенциала стромально-васкулярной фракции жировой ткани имеет важное значение для восстановительной медицины.

Современная регенеративная медицина активно ищет подходы, позволяющие ускорить восстановление поврежденных тканей и раневых дефектов, и этом аспекте одним из перспективных методов является использование клеточных продуктов жировой ткани, в частности ее стромально-васкулярной фракции.

Стромально-васкулярная фракция состоит из внеклеточного матрикса и неадипоцитарных клеток, таких как фибробласты, стромальные клетки и сосудистые клетки [53, 87]. В проведенных ранее исследованиях продемонстрированы паракринные, противоапоптотические, противовоспалительные, проангиогенные и антисклеротические эффекты стромально-васкулярной фракции жировой ткани, которые могут иметь важное значение для разработки на ее основе новых немедикаментозных технологий восстановительной и регенеративной медицины [154].

Однако, несмотря на высокий дифференцировочный потенциал, культивируемые мезенхимальные клетки, входящие в состав стромально-васкулярной фракции жировой ткани, имеют относительно невысокую скорость пролиферации, особенно в случае получения аутологичного клеточного материала от пожилых людей или пациентов с отягощенным коморбидным статусом [74]. Кроме того, процесс накопления клеточной массы с целью последующей

аутотрансплантации предполагает длительное культивирование мезенхимальных стволовых клеток и большое число пассажей, результатом которого является ослабление регенераторного потенциала клеток [5].

В связи с этим, разработка новых технологий, способных увеличить регенераторный потенциал клеток стромально-васкулярной фракции, является важным шагом для сохранности жизнеспособности клеток и увеличения их активности. Одним из таких факторов может стать низкоинтенсивное лазерное излучение, терапевтический эффект которого связывают со стимулирующим эффектом на пролиферацию клеток и усилением регенерации тканей [24].

Низкоинтенсивное лазерное излучение является неинвазивным физическим методом, который обеспечивает широкий спектр терапевтических эффектов за счет воздействия на функциональное состояние органов и тканей организма без нарушения их морфологии, модулируя физиологические, биохимические и метаболические процессы в клетке, обеспечивая терапевтический пролиферативный и дифференцировочный эффект [51].

Исследования показывают, что низкоинтенсивное лазерное излучение оказывает выраженное регенераторное, иммуностимулирующее, противовоспалительное и антиотечное действие, что обосновывает использование лазерной терапии для лечения ран различной этиологии [25]. Воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением широко применяется в современной клинической практике, в том числе для ускорения регенерации раневых и ожоговых дефектов [7, 71].

Таким образом, разработка новых немедикаментозных технологий повышения регенераторного потенциала стромально-васкулярной фракции жировой ткани для ускорения заживления раневых дефектов, в том числе термических ран, является важной задачей. В этом аспекте, для повышения регенераторных возможностей стромально-васкулярной фракции жировой ткани при лечении раневых дефектов, вероятно, могут быть использованы эффекты воздействия низкоинтенсивным лазерным излучением.

Степень разработанности темы исследования

Анализ современного состояния проблемы показывает, что использование низкоинтенсивного лазерного излучения для повышения регенераторных свойств собственных клеток организма, в частности аутологичных клеточных продуктов жировой ткани, таких как стромально-васкулярная фракция, является перспективным направлением восстановительной и регенеративной медицины [18].

Аутологичные или аллогенные мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани использовались в клинических испытаниях для лечения таких состояний, как липоатрофия, мышечная дистрофия, цирроз печени, инфаркт миокарда, инсульт, повреждение спинного мозга, реакция «трансплантат против хозяина», остеоартрит, болезнь Крона, рак и другие [62].

Установлено, что дифференциация мезенхимальных стволовых клеток в специализированные клетки позволяет заменять поврежденные, больные и дефектные клетки и ткани. Кроме того, мезенхимальные стволовые клетки секретируют ряд ангиогенных, антиапоптотических и гемопоэтических факторов, которые способствуют восстановлению и регенерации тканей посредством аутокринных и паракринных действий [36, 115]. Показано, что мезенхимальные стволовые клетки высвобождают экзосомы и другие внеклеточные везикулы, которые несут биоактивные молекулы с иммуномодулирующими и регенеративными свойствами [70, 137].

Среди множества направлений клинического применения особого внимания заслуживает способность стромально-васкулярной фракции и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани способствовать регенерации ран, стимулируя естественный процесс заживления острых, хронических и сложных ран [12]. Использование продуктов жировой ткани может повысить скорость и сократить время заживления ран, а также достичь более полного восстановления тканей раневой поверхности со статистически значимыми различиями в показателях результатов по сравнению с традиционными методами лечения [55]. Кроме того,

были обнаружены потенциальные преимущества в снижении уровня боли у пациентов после использования клеточных продуктов жировой ткани [10]. Таким образом, регенеративная медицина, основанная на естественной способности стволовых клеток восстанавливать и регенерировать поврежденные ткани, является перспективным решением повышения эффективности современных методов лечения ожоговых ран [45, 135].

Использование низкоинтенсивного лазерного излучения вызывает положительный биологический ответ клеток организма. В частности, показана способность низкоинтенсивного лазерного излучения стимулировать пролиферативный потенциал и функциональную активность регенераторных клеток организма [22].

Не смотря на имеющиеся данные, остаются нерешенными ряд вопросов, как в отношении способов получения и свойств стромально-васкулярной фракции, так и в отношении эффективной методики лазерной стимуляции регенеративных свойств мезенхимальных стволовых клеток [16, 17].

На основании вышеизложенного, были определены цель и задачи исследования.

Цель исследования

Научное обоснование новой технологии повышения регенераторного потенциала стромально-васкулярной фракции жировой ткани путем воздействия низкоинтенсивным лазерным излучением для стимуляции заживления термических ран в эксперименте.

Задачи исследования

1. Провести сравнительный анализ эффективности двух способов выделения клеточного продукта жировой ткани - ферментативного и механического.

2. Изучить и определить параметры низкоинтенсивного лазерного излучения красного и ультрафиолетового спектра, эффективные для стимуляции регенераторного потенциала клеток жировой ткани в экспериментальной модели механического повреждения клеточного монослоя.

3. Исследовать ответ регенеративных клеток жировой ткани на условия, имитирующие острое и хроническое воспаление в экспериментальной клеточной модели.

4. Исследовать влияние низкоинтенсивного лазерного излучения красного и ультрафиолетового спектра на пролиферативную активность и жизнеспособность регенеративных клеток жировой ткани в экспериментальной клеточной модели острого и хронического воспаления.

5. Изучить эффективность и безопасность применения низкоинтенсивного лазерного излучения для усиления регенераторного потенциала стромально-васкулярной фракции в эксперименте на животной модели термического ожога.

Научная новизна исследования

По результатам проведенных исследований установлено, что ферментативная обработка жировой ткани является оптимальным способом получения клеточного продукта жировой ткани – стромально-васкулярной фракции с большим выходом ядродержащих клеток и высоким пролиферативным потенциалом регенеративных клеток.

Впервые на модели монослоя мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани показано, что для стимулирования регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток человека рекомендуется использовать низкоинтенсивный лазер красного спектра (длина волны 635 нм) с плотностью энергии 1 Дж/см²: при воздействии низкоинтенсивным лазерным излучением красного спектра с длиной волны 635 нм и энергией излучения 1 и 2 Дж отмечается достоверно значимое стимулирование пролиферации клеток к 48 часам

эксперимента, в то время как облучение низкоинтенсивным лазерным излучением ультрафиолетового спектра с длиной волны 365 нм с энергией излучения 0,02 и 0,1 Дж способствует увеличению скорости восстановления клеточного монослоя после повреждения через 24 часа, однако к 48 часам эксперимента данный эффект полностью нивелируется.

Установлено, что для оценки физиологических изменений в тканях, происходящих при заживлении ожоговых ран, рекомендуется использовать клеточную модель хронического воспаления путем изменения рН ростовой среды до 8,0. В частности, показано, что культивирование регенеративных клеток в условиях хронического воспаления (в среде с рН=8,0) приводит к снижению жизнеспособности клеток на 40% по сравнению с контролем через 72 часа эксперимента, в то время как культивирование клеток в условиях острой воспалительной реакции (в среде с рН=5,0) вызывает гибель 100% клеток уже через 48 часов эксперимента.

Впервые доказано, что воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением с длиной волны 635 нм и энергией излучения 1 Дж способствует значительному возрастанию пролиферативного потенциала и жизнеспособности культуры мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в модели хронического воспаления.

Результаты исследования позволили также впервые установить, что применение низкоинтенсивного лазерного излучения красного спектра (длина волны 635 нм) с плотностью энергии 1 Дж/см² позволяет существенно повысить жизнеспособность и улучшить пролиферативные свойства мезенхимальных стволовых клеток в клеточной культуре, а также снизить ускорить заживление ран при лечении термического ожога с помощью стромально-васкулярной фракции на животной модели.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в расширении представлений о фотобиологических эффектах лазерного воздействия, в частности

способности низкоинтенсивного лазерного излучения стимулировать мезенхимальные стволовые клетки с целью повышения их регенераторного потенциала.

По результатам исследования была разработана экспериментальная модель клеточного поведения в условиях хронического воспаления *in vitro* в щелочной среде с $pH=8,0$ культуральной среды, которая может быть использована для оценки функциональной активности культуры мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на разных стадиях заживления раны.

Был разработан новый метод стимулирования репаративных процессов, снижения воспалительной реакции и формирования грануляционной ткани термического ожога на животной модели на основе стромально-васкулярной фракции жировой ткани с предварительным воздействием на нее низкоинтенсивным лазерным излучением красного спектра (длина волны 635 нм) с плотностью энергии 1 Дж/см².

Разработанный подход комплексного применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани и низкоинтенсивного лазерного излучения может быть использован в перспективе для первонифицированного лечения ран у пожилых пациентов и пациентов с отягощенным коморбидным статусом, имеющих сниженный регенераторный потенциал.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена в рамках НИР государственного задания «Разработка инновационной технологии и научное обоснование применения низкоинтенсивных физических факторов для усиления регенераторного потенциала стромально-васкулярной фракции жировой ткани в эксперименте на животной модели термического ожога», № НИОКР 121040100051-7. Общий план исследования заключался в последовательном выполнении серии экспериментов, в которых результаты, полученные на каждом предыдущем этапе, служили основанием для постановки эксперимента на следующем этапе.

В первую очередь, проведено сравнение эффективности выделения стромально-васкулярной фракции жировой ткани с помощью ферментативного и механического способа. Затем на клеточных моделях *in vitro* были определены эффективные параметры низкоинтенсивного лазерного излучения для стимуляции регенераторного потенциала клеток жировой ткани в экспериментальной модели механического повреждения клеточного монослоя. В завершении исследования, использовали общепринятую животную модель тяжелого термического ожога у лабораторных крыс.

Для оценки регенераторного потенциала стромально-васкулярной фракции и мезенхимальных стволовых клеток определяли цитоморфологические и фенотипические признаки клеток с помощью световой микроскопии и цитофлуорометрии, оценивали жизнеспособность, пролиферативную и миграционную активность с помощью специфичного цитологического окрашивания и световой микроскопии, а также устанавливали функциональное состояние (апоптоз, некроз) и стадии клеточного цикла мезенхимальных стволовых клеток с помощью выявления специфичных мембранных маркеров. Эффективность терапии *in vivo* оценивали при визуальном наблюдении за ожоговой раной с выявлением характеристик тканевого поражения и, измеряя площадь раны в течении трех недель лечения.

Положения, выносимые на защиту

1. Ферментативный метод обработки является оптимальным способом получения клеточного продукта жировой ткани – стромально-васкулярной фракции с большим выходом ядродержащих клеток и высоким пролиферативным потенциалом регенеративных клеток за счет повышения в 9,34 раза количества ядродержащих клеток на 1 мл жировой ткани, в 2,83 раза жизнеспособности и в 9,93 раза общего количества ядродержащих клеток в 1 мл липоаспирата по сравнению с механическим методом.

2. Воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением красного спектра с длиной волны 635 нм и энергией излучения 1 Дж на модели хронического воспаления (при кислотности среды $\text{pH}=8,0$) способствует стимулированию пролиферативного потенциала и жизнеспособности культуры клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани за счет повышения количества регенеративных клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани, адгезированных на пластике в течение 72 ч, на 94% по сравнению с необлученной лазером культурой клеток.

3. Предварительное облучение стромально-васкулярной фракции низкоинтенсивным лазерным излучением с длиной волны 635 нм и плотностью энергии излучения 1 Дж/см² приводит к ускорению заживления поврежденной ткани у лабораторных животных, вызванной глубоким термическим ожогом, за счет большего уменьшения площади раневой поверхности - в 2,1 раза по сравнению с нативной стромально-васкулярной фракцией и в 3,5 раза по сравнению с противомикробным комбинированным средством, содержащим диоксометилтетрагидропиримидин и хлорамфеникол.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных данных подтверждается проведенным системным анализом достаточного числа российских и зарубежных источников литературы по исследуемой проблеме, адекватным количеством экспериментального материала, собранного при помощи общепринятых современных экспериментальных методик. Модель исследования построена таким образом, чтобы данные клеточных моделей *in vitro* верифицировались между собой и с данными животной модели *in vivo*. Используются современные методики сбора и обработки исходной информации. Данные проанализированы статистическими методами с использованием современного программного обеспечения. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальных научных источников (статьи в научных журналах из наукометрических базах данных).

Положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации полностью основаны на результатах собственных экспериментальных и статистических исследований. Сбор, анализ и интерпретация результатов проведены с использованием современных способов обработки информации и статистического анализа-программы IBM SPSS Statistics 19.

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 8 июля 2025 года на заседании Научно-методического совета по проблемам медицинской реабилитации, восстановительной медицины, лечебной физкультуры и спортивной медицины, курортологии и физиотерапии ФГБУ «НМИЦ РК» Минздрава России.

Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях, конгрессах и съездах: VII Международном конгрессе ассоциации ревмоортопедов, г. Воронеж (2023 г.); IV Конгрессе ОРТОБИОЛОГИЯ «Patient cases-от теории к практике» с международным участием, г. Москва (21-22 апреля 2023 г.); I Научно-практической конференции с международным участием «Превентивная медицина как основа качественного и здорового долголетия», г. Оренбург (27-28 апреля 2023 г.); VIII Международный конгресс «Бальнеотерапия в программах санаторно-курортного лечения и медицинской реабилитации», г. Москва (20-21 марта 2025 г.)

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование посвящено научному обоснованию и разработке инновационной технологии комплексного применения аутологичной клеточной терапии и низкоинтенсивного лазерного излучения для стимуляции ранозаживления, внедрение которой позволит улучшить прогноз и качество лечения пациентов со сниженным регенераторным потенциалом стволовых клеток жировой ткани, что соответствует паспорту специальности 3.1.33. Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия, медико-социальная реабилитация в части п. 2 «Изучение механизмов действия, предикторов и критериев эффективности и

безопасности применения немедикаментозных лечебных факторов и медико-социальных технологий в целях персонализированного подхода при разработке технологий повышения функциональных и адаптивных резервов организма, профилактики заболеваний, медицинской реабилитации пациентов, индивидуальных программ реабилитации и абилитации инвалидов» и п. 4 «Разработка и внедрение здоровьесберегающих технологий превентивной, трансляционной, персонифицированной и цифровой медицины с использованием природных лечебных факторов и других средств немедикаментозной терапии».

Личное участие автора в получении результатов

Диссертантом вместе с научным руководителем выполнено планирование работы и разработан дизайн исследования. Автор лично провел сбор и анализ литературных источников по изучаемой проблеме, совместно с научным руководителем разработал идею исследования и определил его цель и задачи, разработал экспериментальную схему исследования, включающую выбор эффективного способа получения стромально-васкулярной фракции, подбора параметров низкоинтенсивного лазерного излучения на *in vitro* моделях клеточной культуры мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и проверки эффективности комплексного применения стромально-васкулярной фракции и низкоинтенсивного лазерного излучения в животной модели *in vivo*. Соискатель самостоятельно провел все эксперименты *in vitro* и *in vivo* в рамках диссертационной работы, лично провел анализ полученных результатов с применением современных методов статистической обработки, подготовил научные публикации по теме исследования, сформулировал выводы, положения, выносимые на защиту и текст диссертации в целом.

Публикации

Всего опубликовано 136 работ, из них по теме диссертационного исследования опубликовано 15 научных работ, из которых 5 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций, и получен 1 патент на изобретение РФ.

Объем и структура работы

Диссертация содержит 115 страниц машинописного текста и состоит из оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа содержит 23 рисунка и 5 таблиц. Список литературы включает 164 источника, из них 28 отечественных, 136 – иностранных публикации.

ГЛАВА 1. КЛЕТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И НИЗКОИНТЕНСИВНОЕ ЛАЗЕРНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Общая характеристика и регенеративные свойства стромально-васкулярной фракции жировой ткани, используемые в восстановительной медицине

Несмотря на способность тканей человеческого организма к регенерации и самовосстановлению, заживление занимает значительное время и требует вспомогательного лечения. Трансплантация органов и тканей стала высокоэффективным подходом для пациентов с терминальными заболеваниями или тяжелыми дефектами тканей. Исторически, область трансплантологии развивалась с использованием костного мозга и крови в качестве основного источника терапевтических стволовых клеток. Сегодня известно, что взрослые стволовые клетки, такие как мезенхимальные стволовые клетки (МСК), можно обнаружить практически во всех постнатальных органах и тканях, включая костный мозг, амниотическую жидкость, зубную ткань, кровь, плаценту, кожу и другие. Несмотря на возможность выделения МСК из множества тканей взрослого человека, достаточное количество аутологичных МСК, пригодных для клинического использования, можно получить, главным образом, из костного мозга и жировой ткани. При этом жировая ткань и ее производные привлекают все большее внимание в качестве альтернативного материала для трансплантации и клеточной терапии.

Хорошо известно, что жировая ткань играет ключевую физиологическую роль в поддержании метаболического гомеостаза в организме. Жировая ткань хранит избыточную энергию в форме триглицеридов и является эндокринным

органом, который секретирует адипокины [63]. Одной из важнейших характеристик жировой ткани, помимо терморегуляции, поглощения ударов и накопления энергии, является то, что она является источником регенеративных клеток [62]. Изначально пересадка жира широко использовалась для восстановления объема, потерянного в результате травмы, абляционной хирургии, старения или врожденных дефектов. Так, еще в 1893 году Нейбер и др. удалили жир с предплечья и использовали его для заполнения объема и исправления неровностей контура лица, вызванных шрамом, и сообщили о прекрасных косметических результатах. Два десятилетия спустя Моррестин был первым, кто клинически и с пользой применил регенеративные клетки жировой ткани, перенеся частицы жировой ткани в раны солдат, раненых в Первой мировой войне [131]. Позднее показания к пересадке жира или его компонентов расширились до более регенеративных подходов, таких как улучшение заживления ран или стареющей кожи, а также лечение рубцов. Этот сдвиг был частично вызван развитием знаний о стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани. СВФ — это фракция жировой ткани без адипоцитов, которая состоит из внеклеточного матрикса и всех неадипоцитарных клеток, таких как клетки соединительной ткани: фибробласты, стромальные клетки и сосудистые клетки [53, 87].

В 2001 году Зук и др. продемонстрировали *in vitro*, что популяции клеток, выделенных из жировой ткани, полученной путем липосакции, могут дифференцироваться в адипоциты, хондроциты, остециты и миоциты [164]. Сегодня известно, что в дополнение к этой способности, стволовые клетки жировой ткани (СКЖТ), в том числе МСК, обладают антиапоптотическими [128], антиоксидантными, противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами [81]. Эти клетки также проявляют ангиогенную функцию посредством регуляции экспрессии генов сосудистого эндотелиального фактора роста, гепатоцитарного фактора роста, субъединицы В тромбоцитарного фактора роста и основного фактора роста фибробластов [109], а также могут способствовать заживлению ран, стимулируя синтез коллагена фибробластами [38].

Большое количество СКЖТ в жировой ткани и легкая доступность подкожного жира являются очевидными преимуществами СВФ по сравнению с обычным костным мозгом и другими тканями. Так, 1 г жира содержит в 1000 раз больше стволовых клеток, чем 1 г костного мозга. Кроме того, техника выделения СКЖТ является более простой, чем выделение МСК из костного мозга [97]. Поэтому в настоящее время СВФ считается надежным и безопасным источником стволовых клеток для регенеративной медицины и тканевой инженерии.

При выделении СВФ подкожный жир обычно собирают с помощью техники Коулмана (ручной сбор жира, аспирированного с помощью тупой канюли и шприца), машинной липосакции и хирургической резекции. Выбор методов сбора влияет на жизнеспособность клеток и, следовательно, на выход МСК. Собранный липоаспират можно использовать с минимальной обработкой для аутологичной пересадки жира в эстетических и реконструктивных процедурах, которые включают коррекцию контурных аномалий, реконструкцию груди и косметические процедуры. В качестве альтернативы липоаспират можно дополнительно обработать для выделения МСК [12]. Первый шаг в выделении СКЖТ из липоаспирата включает отделение адипоцитов от оставшихся жировых клеток, что обычно достигается с помощью обработки ткани коллагеназой и последующего центрифугирования для отделения плавающих адипоцитов от СВФ, остающейся в осадке [139]. Для соответствия современным нормам надлежащей производственной практики (cGMP) были разработаны закрытые, стерильные и безопасные системы получения СВФ и выделения МСК. Они могут включать ферментативные или механические процедуры для высвобождения клеточных компонентов с использованием автоматизированного закрытого устройства [113] или экономически эффективного протокола, альтернативного автоматизированным методам [63]. Необходимо отметить, что МСК составляют до 1% клеток СВФ по сравнению с 0,001–0,002% МСК в костном мозге [64].

Свежеизолированную СВФ можно использовать напрямую без необходимости дальнейшего этапа культивирования клеток. Было показано, что это выгодно из-за синергического вклада различных стромальных сосудистых

компонентов. Эритроциты обычно удаляются с помощью лизирующего буфера со стандартным протоколом. МСК в СВФ могут быть селективно обогащены с помощью адгезии на пластике с последующим культивированием *in vitro*, иммуномагнитной сепарации или сортировки клеток проточной цитометрией. Однако выделение МСК может быть затруднено трудностями при отделении стволовых клеток от других типов клеток, которые имеют схожий иммунофенотип клеточной поверхности и схожие свойства клеточной культуры, в частности преадипоцитов и фибробластов [15]. Удаление загрязняющих преадипоцитов и фибробластов предотвращает разбавление или потерю МСК в культуре для использования в регенеративной медицине.

В регенеративной медицине аутологичные или аллогенные МСК использовались в клинических испытаниях для лечения таких состояний, как липоатрофия, мышечная дистрофия, цирроз печени, инфаркт миокарда, инсульт, повреждение спинного мозга, реакция «трансплантат против хозяина», остеоартрит, болезнь Крона, рак и другие [2, 4, 81]. Как и МСК, выделенные из костного мозга, МСК жировой ткани могут дифференцироваться в клетки мезодермального (остеобласты, адипоциты и хондроциты), энтодермального (гепатоциты, клетки поджелудочной железы) и эктодермального (нейроны) происхождения при индукции *in vitro* [35]. Дифференциация МСК в специализированные клетки позволяет заменять поврежденные, больные и дефектные клетки и ткани. Кроме того, МСК секретируют ряд ангиогенных, антиапоптотических и гемopoэтических факторов, которые способствуют восстановлению и регенерации тканей посредством аутокринных и паракринных действий. МСК также секретируют противовоспалительные или иммунодепрессивные факторы и оказывают иммуномодулирующее действие в клеточной терапии реакции «трансплантат против хозяина», аутоиммунных и воспалительных заболеваний [36, 115] МСК высвобождают экзосомы и другие внеклеточные везикулы, которые несут биоактивный груз (такой как белки, липиды, ДНК, мРНК, микро-РНК, тРНК и некодирующая РНК) с иммуномодулирующими и регенеративными свойствами [70, 137]. Экзосомы,

полученные из МСК, являются многообещающими бесклеточными терапевтическими подходами в регенеративной медицине [137] Среди множества направлений клинического применения особого внимания заслуживает способность СВФ и МСК способствовать заживлению ран.

1.2 Возможности применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани в лечении ран различного генеза

Как известно, кожа является самым большим органом человека и выполняет барьерную и защитную функцию от широкого спектра внешних воздействий. Повреждения кожи, возникающие в результате бытовых травм или чрезвычайных ситуаций, являются одной из наиболее распространенных проблем в медицине [21]. Повреждения можно классифицировать как острые и длительно незаживающие, в зависимости от характера повреждения и продолжительности процесса заживления. Острые раны, такие как травматические и хирургические раны, обычно заживают в относительно короткие сроки (до 1 месяца) в зависимости от размера и глубины раны. Длительно незаживающие раны, такие как пролежни или диабетические язвы, не заживают, или заживают очень долго (например, несколько месяцев), что приводит к образованию рубцов, и могут быть инфицированы бактериями и другими экзогенными факторами. Лечение ран с глубокими повреждениями и длительно незаживающих ран представляет собой сложную задачу как для пациентов, так и для хирургов [112]. Из-за сложных процессов репарации поврежденной ткани и возможных осложнений, лечение может быть сопряжено с многочисленными трудностями, каждая из которых требует комплексного подхода для обеспечения эффективного заживления и восстановления пациента [83].

Заживление ран представляет собой сложный биологический процесс, который принято делить на четыре последовательные фазы [120]. Гемостаз или первая фаза, которая инициируется кровотечением, вызванным «травмой», длится

от нескольких минут до нескольких часов. В этот период агрегированные тромбоциты высвобождают медиаторы, которые запускают вторую фазу - воспалительную. Через воспаление место раны переходит к аутолизу мертвых тканей, защищает себя от бактериальной инфекции и через несколько дней переходит в третью, пролиферативную фазу. Ангиогенез индуцируется во время этой гораздо более длительной фазы (3-4 недели) для восстановления и увеличения кровотока в новообразующейся ткани. Под действием факторов роста дермальные фибробласты размножаются, чтобы производить внеклеточный матрикс, а кератиноциты размножаются, чтобы создать новообразованный эпидермис, что приводит к полному закрытию раны. Обычно требуется несколько месяцев или лет, чтобы создать кожную ткань с ее окончательным составом и прочностью, что является четвертой или ремоделирующей фазой [19].

Каждая стадия воспалительно-репаративного процесса характеризуется своим значением кислотности раневого ложа. Так, например, стадия острого воспаления сопровождается снижением кислотности раневого ложа до pH 5,5-6, на стадии репаративной регенерации кислотность составляет порядка pH 7,0, хроническое воспаление характеризуется щелочной (pH 8,0) реакцией [132]. Хорошо известно, что кислотность среды оказывает влияние на функциональную активность клеток, а именно на пролиферацию, клеточный цикл, генерацию белков межклеточного матрикса, внутриклеточные сигнальные каскады, генерацию цитокинов и т.д. [68, 95, 123, 134].

Терапия, основанная на использовании продуктов из человеческого жира, представляет собой новый подход, направленный на поддержку естественного процесса заживления острых, хронических и сложных ран. Обычно используемые в клинической практике жировые продукты это - СВФ, МСК, а также аутологичная жировая ткань, часто называемая жиром Коулмена, который в основном состоит из адипоцитов и СВФ. Недавний метаанализ [155] показал, что использование продуктов из человеческого жира может ускорить скорость заживления, сократить время заживления и достичь более полного заживления со статистически значимыми различиями в показателях результатов по сравнению с традиционными

методами лечения. Анализ гистологических результатов в различных исследованиях показал, что жировые экстракты могут способствовать эпителизации, отложению коллагена и васкуляризации, тем самым способствуя регенерации тканей и уменьшая воспалительные реакции. Кроме того, были обнаружены потенциальные преимущества в снижении уровня боли у пациентов после использования жировых экстрактов.

В отношении острых ран известно два завершенных, нерандомизированных контролируемых исследования и восемь продолжающихся клинических исследований [84]. Оба завершенных исследования сообщили о статистически значимом улучшении процента реэпителизации и времени заживления для групп, получивших лечение СВФ. В данных исследованиях аутологичная жировая ткань была получена от каждого пациента путем липосакции живота [46, 145]. Таралло и др. использовали набор MyStem EVO (MyStem LLC, Уилмингтон, Делавэр, США) для выделения СВФ неферментативным путем с помощью механического фракционирования с помощью центрифуги [145]. Червелли и др. использовали систему Celution™ 800/CRS и запатентованный фермент Celase™ 835/CRS Reagent (Cytori Therapeutics Inc., Сан-Диего, Калифорния, США) для ферментативной изоляции СВФ. Таралло и др. вводили приблизительно 8,3 см³ механически изолированного СВФ многократно в раны пациентов, которые обратились в отделение неотложной помощи с острой травмой кончика пальца [145]. Техника инъекции, включая глубину и количество инъекций, а также любые сопутствующие вмешательства, такие как уход за раной, не были указаны. Червелли и др. использовали микроканюли диаметром 1–2 мм для введения 2,5 см³ ферментативно изолированного СВФ непосредственно в ложе посттравматических язв нижних конечностей. После того, как силиконовый субстрат, обработанный препаратом на основе гиалуроновой кислоты, был зафиксирован на ране нейлоновыми швами 3,0, промытый липоаспират, смешанный с СВФ, который содержал около 2,5 см³ СВФ в общем объеме 170 см³, вводили подкожно вокруг краев раны. Шестнадцать дней спустя было проведено выскабливание ран, и дополнительный жир, усиленный СВФ, вводили микроканюлями в виде сетки.

При лечении ран кончиков пальцев Таралло и др. сообщили о преимуществе СВФ перед консервативным лечением по «количеству дней, необходимых для полного заживления» (22,3 дня против 24,9 дней, $p < 0,05$) [145]. При лечении посттравматических язв нижних конечностей Червелли и др. сообщили о преимуществе СВФ перед кюретажем и применением гиалуроновой кислоты в проценте реэпителизации через 9,7 недель ($97,9\% \pm 1,5\%$ реэпителизации против $87,8\% \pm 4,4\%$, $p < 0,05$) [46]. Гистопатологическое исследование показало образование грануляционной ткани через 3 недели, а через 7 недель — реактивную эпидермальную гиперплазию, обильные капилляры и фибробласты. Полная реэпителизация и присутствие дермального коллагена наблюдались через 16 недель.

Многие доклинические исследования на животных сообщили об эффективности СВФ, МСК или их секретлируемых экзосом при лечении хронических ран *in vivo*, используя различные источники, модели животных и способы введения [42, 149]. МСК распределяли в виде клеточной суспензии непосредственно в полости раны или вводили подкожно, или в мышцы вблизи раны. Однако последний способ введения не является оптимальным, поскольку он основан на множественных и болезненных местах инъекций, которые невозможно адекватно контролировать пространственно. Несколько исследований показали, что кластеризация в сфероиды усиливает терапевтические эффекты МСК способствуя закрытию ран и увеличивая их приживление с меньшим апоптозом клеток. Включение МСК в каркасы может обеспечить биосовместимую трехмерную среду, более близкую к ситуации *in vivo*, с более сильными взаимодействиями между клетками и между клетками и матриксом. МСК в физически стабильном каркасе могут быть локально сконцентрированы на всей поверхности раны и максимизировать свое влияние на процесс заживления. Многие каркасы в сочетании с стволовыми клетками были испытаны на ранах: хитозан, фибрин, гиалуроновая кислота, коллагеновая губка, коллагеновые пептидные каркасы, децеллюляризованные ткани, амниотические оболочки, тромбоцитарные гели и другие [42]. Эти биоматериалы не только обеспечивают

физическую трехмерную поддержку, но и могут быть биологически активными в отношении ран и/или МСК, в результате чего улучшаются целебные свойства, регуляция пролиферации, адгезии и состава секрета МСК.

Несколько неконтролируемых испытаний на людях продемонстрировали безопасность МСК при лечении хронических ран и сообщили обнадеживающие данные относительно его эффективности [42]. Об ускорении заживления хронических ран кожи в результате лечения СВФ или МСК сообщается в работах [58, 85, 125, 144]. Как СВФ [73, 88, 110, 111, 1428], так и МСК [105, 146] проявили эффективность в лечении диабетических язв в клинических экспериментальных исследованиях.

Хотя точные механизмы, посредством которых жировые продукты способствуют регенерации и заживлению, не полностью понятны, существует консенсус, что СВФ и МСК действуют на раны в первую очередь через производство регенеративного секрета [96], а не благодаря клеточной дифференциации. Показано, что МСК, в первую очередь, стимулируют ангиогенез через паракринную секрецию ангиопоэтинов, факторов роста VEGF, FGF-2, PDGF, TGF- β и HGF, в то же время поддерживая ангиогенез посредством собственной дифференциации в эндотелиальные клетки [127]. Помимо ангиогенеза, МСК продуцируют факторы роста клеток (такие как FGF, EGF, KGF, IGF), способствующие пролиферации дермальных фибробластов и кератиноцитов, способствуя дермо-эпидермальной реконструкции. Они также выделяют антифибрзные молекулы, которые могут положительно влиять на хронические раны, экспрессировать рецепторы, такие как Toll-подобные рецепторы и оказывают антимикробное действие [42]. Хотя сообщалось об уменьшении боли при применении МСК в лечении хронических ран прямое воздействие на нервную систему не было продемонстрировано. Хотя это не считается решающим, мультипотентные возможности МСК могут играть роль в их терапевтическом воздействии на раны, так как они действительно могут дифференцироваться в дермальные фибробласты, ускоряя образование грануляционной ткани [56, 162]

или кератиноцитоподобные клетки, обладающие способностью образовывать стратифицированный эпидермис [80].

1.3 Перспективы применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани в восстановительном лечении ожоговых ран

Ожоги являются четвертой по распространенности причиной травм в мире. В 2019 году было зарегистрировано более девяти миллионов случаев ожогов во всем мире, что привело к 111 000 смертей (88 000–132 000) [90]. Несмертельные ожоговые травмы также часто приводят к тяжелым заболеваниям, включая длительное пребывание в больнице, физическое рубцевание и обезображивание, что влияет на психическое здоровье и приводит к снижению качества жизни. Ожоги чаще возникают из-за термического и радиационного повреждения, хотя химические и электрические ожоги также являются серьезной медицинской проблемой [94]. При разных причинах различные ожоги могут иметь различную патофизиологию, при этом процесс заживления ран остается в основе своей схожим. Термические ожоги принято классифицировать по разным степеням в зависимости от глубины поражения. При ожоге первой степени поражается верхний слой ороговевшего эпителия, что проявляется покраснением кожи, небольшим отёком и болью. Погибший эпителий слущивается через несколько дней без следов поражения. При ожоге второй степени эпидермис повреждается до росткового слоя, формируются небольшие пузыри с серозным содержимым. Через 1-2 недели повреждение полностью заживает за счёт сохранившегося регенераторного потенциала росткового слоя. При ожоге третьей степени поражаются все слои эпидермиса и дерма. Ожог четвёртой степени приводит к гибели подлежащих тканей, обугливанию мышц, костей, подкожно-жировой клетчатки [124].

Текущий стандарт лечения ожоговых ран включает сочетание хирургического вмешательства, современных перевязочных материалов и

поддерживающей терапии [1, 6]. Хирургическое вмешательство обычно включает очистку нежизнеспособной ткани и множественную пересадку кожи или реконструкцию лоскута. Современные перевязочные материалы используются для улучшения заживления ран путем поддержания баланса влажности, облегчения клеточной миграции и пролиферации, а также снижения риска инфекции. Однако лечение с помощью кожных трансплантатов ограничено наличием донорских участков, отторжением трансплантата и рубцеванием, и обычно недостаточно для восстановления дефектов кожи и мягких тканей. Несмотря на заметные достижения в методах лечения ожогов, включая использование новых методов пересадки кожи, заменителей кожи, созданных с помощью тканевой инженерии, синтетических перевязочных материалов и местного применения факторов роста, проблемы в эффективной регенерации дефектов кожи и профилактике гипертрофических рубцов сохраняются [14].

Регенеративная медицина, основанная на естественной способности организма восстанавливать и регенерировать поврежденные ткани, стала многообещающим решением для устранения недостатков современных методов лечения ожогов [28]. Существует несколько подходов и методов, включая применение стволовых клеток, используемых в регенеративной терапии для заживления ран, минимизации рубцевания и восстановлении нормальной функции кожи. Известно, что после травматического воздействия эндогенные стволовые клетки активируются и мигрируют к месту повреждения, играя ключевую роль в сложных сигнальных каскадах заживления ран [45, 135]. Они демонстрируют способность дифференцироваться в кератиноциты, фибробласты и эндотелиальные клетки, то есть типы клеток, имеющих решающее значение для восстановления тканей [136]. Однако последние данные свидетельствуют о том, что основной механизм, посредством которого эндогенные стволовые клетки усиливают процесс заживления ран, заключается в паракринных взаимодействиях с местными и иммунными клетками. Стволовые клетки секретируют ряд цитокинов и факторов роста, которые модулируют микросреду раны, тем самым смягчая воспаление и способствуя ангиогенезу, пролиферации клеток и отложению внеклеточного

матрикса [75, 9]. Следует отметить, что большинство клинических исследований изучали использование МСК костного мозга для лечения ожоговых ран. Первое клиническое применение стволовых клеток для лечения острых ожоговых травм было проведено в 2005 году. В этом случае пациенту с обширным ожогом кожи была проведена пересадка кожи с трансплантацией аллогенных МСК костного мозга. Лечение привело к ускоренному заживлению, характеризующемуся повышенной реэпителизацией, неоваскуляризацией и уменьшением рубцевания [126]. Позднее было описано применение аутологичных и трупных МСК костного мозга в сочетании с пересадкой кожи при тяжелых ожогах и сообщалось об улучшенных результатах заживления ран, включая улучшенную реэпителизацию и неоваскуляризацию [91, 156]. Кроме того, сообщалось о двух тяжелых случаях ожогов, в которых аллогенные МСК костного мозга культивировались на искусственном листе дермы с коллагеновым каркасом, что привело к ускоренному заживлению ран, усилению реэпителизации и уменьшению рубцевания [159]. Более того, проспективное исследование случай-контроль продемонстрировало эффективность как МСК, полученных из костного мозга, так и из пуповины, в улучшении заживления ран и уменьшении осложнений. Эти преимущества включали уменьшение образования рубцов и контрактур [30].

Предыдущие клинические исследования показали, что аутологичная пересадка жира может ускорить заживление хронически рубцовых тканей, образовавшихся в результате хронических ран и радиационно-индуцированных повреждений мягких тканей [61, 78]. В области лечения ожогов пересадка жира показала многообещающие результаты в качестве вспомогательной терапии, способствуя заживлению ран, сокращая типичное время заживления и сводя к минимуму возникновение гипертрофических рубцов [31, 121].

Применение СВФ было описано в случае рефрактерной контрактуры предплечья в контексте тяжелого детского ожога и множественных реконструктивных операций. После применения СВФ, засеянного в коллагеновый каркас, пациентка смогла восстановить большую часть своего диапазона движений в течение 5 лет наблюдения [37]. Применение производных жировой ткани также

изучалось для лечения хронических ран после лучевой терапии. В клиническом исследовании 20 пациентов с хроническими поражениями после лучевой терапии получили трансплантацию очищенного аутологичного липоасpirата. Лечение привело к улучшению или ремиссии симптомов у всех обследованных пациентов, даже у тех, у кого изначально были необратимые функциональные повреждения [129]. Акита и др. лечили пациента с трудноизлечимой крестцово-копчиковой раной через 40 лет после лучевой терапии, путем санации раны и инъекции изолированных аутологичных МСК и липоасpirата. Они сообщили о заживлении к 82-му дню без рецидивов [33]. В отчете о случае, опубликованном Иддинсом и соавторами, у пациента развилась рана на большом пальце, вызванная ионизирующим излучением, которая рецидивировала, несмотря на медицинское лечение. Обработка пораженной области с последующей инъекцией СВФ в ложе раны привела к успешному заживлению без рецидива в течение одного года наблюдения [76].

В этом контексте использование производных жировой ткани продолжает привлекать значительное внимание. В настоящее время предполагается, что регенеративные свойства и иммуномодулирующие эффекты СВФ и МСК могут обладать высоким терапевтическим потенциалом для улучшения процесса заживления ран и смягчения образования рубцов при ожогах.

1.4 Ограничения и сложности применения стромально-васкулярной фракции и мезенхимальных стволовых клеток в восстановительном лечении ран

За последние десятилетия научное и медицинское сообщество достигло значительного прогресса в понимании функциональных и регенеративных свойств производных жировой ткани. Однако несколько важных факторов ограничивают широкое применение СВФ и МСК в качестве рутинного метода лечения [42]. В первую очередь необходимо подчеркнуть, что отсутствие стандартизации жировых продуктов и общепринятого определения МСК препятствует перекрестной

интерпретации клинических испытаний. Далее следует отметить ограниченную производительность и высокие производственные затраты применения СВФ и МСК. Действительно, эти методы лечения основаны на живых и редких клетках, так, что одна «производственная партия» способна, в лучшем случае, удовлетворить лишь несколько десятков пациентов в случае аллогенной терапии. Этот аспект усугубляется в аутологичных подходах, где одна партия позволяет создать лечение для одного пациента. Проблемой также является особенно сложная цепочка поставок и логистики клеточных препаратов. Поскольку, как при аутологичном, так и при аллогенном подходе, сырье берется у человека, то процедура сбора должна выполняться в соответствующем больничном учреждении квалифицированным персоналом. После производства препарата лечение не проходит через традиционную цепочку распределения, как это происходит с большинством традиционных лекарств. При этом, сама процедура лечения не может быть осуществлена пациентом самостоятельно, а требует обученного персонала и условий больничного учреждения. Кроме того, автоматизация процедуры минимальна, а большая часть лечения основана на процессах, выполняемых вручную высококвалифицированными операторами. Отдельно отмечаются критические ограничения и проблемы безопасности с использованием для культивирования клеток добавок животного происхождения, таких как сыворотка животных.

Очевидно, что производственные и логистические ограничения увеличивают производственные издержки, что, в свою очередь, влияет на конечную цену лечения. Терапия мезенхимальными стволовыми клетками, скорее всего, будет занимать верхнюю позицию в диапазоне затрат во множестве предложений по лечению хронических ран [26]. Эти высокие первоначальные затраты необходимо сопоставить с общими затратами, которые в противном случае были бы понесены при использовании одной или нескольких стандартных терапий в течение времени, необходимого для лечения раны. Стоит отметить, что на лечение и уход за хроническими ранами приходится более 3% общих расходов на здравоохранение в развитых странах [42]. Большинство этих расходов обусловлено длительным

временем лечения/госпитализации в случаях, когда лечение затруднено. Поэтому даже умеренное увеличение показателя эффективности (т. е. сокращение времени лечения/госпитализации) в этой подгруппе пациентов, таким образом, окажет большое влияние на общие расходы.

Наряду с вышперечисленными организационными и регуляторными сложностями ряд биологических аспектов применения СВФ и МСК остаются нерешенными в настоящее время [13].

Во-первых, это гетерогенность жировой ткани как источника клеток. Жировая ткань включает 2 различных подтипа, белый и бурый, и ее состав может различаться в зависимости от анатомического расположения. Очевидно, что характеристики МСК также различаются в зависимости от типа и анатомической области собранной жировой ткани, при этом белая подкожная абдоминальная жировая ткань в настоящее время считается лучшим источником с точки зрения выхода и качества. Во-вторых, принципиально важным является метод сбора жира и метод, используемый для получения СВФ, которые во многом влияют на основные характеристики и функциональность клеток. В случае аллогенного подхода важной проблемой становится потенциальная иммуногенность МСК. Мезенхимальные стволовые клетки в целом долгое время считались гипоиммуногенными из-за отсутствия антигенов HLA класса II, низкой экспрессии антигенов HLA класса I и костимулирующих молекул, таких как CD40 и CD80. Однако некоторые исследования показали, что МСК могут стать более иммуногенными во время культивирования *in vitro* [40, 98].

В связи с потенциальной иммуногенностью аллогенных препаратов аутологичная трансплантация СВФ рассматривается как более предпочтительная в большинстве исследований [49]. В тоже время, статус донора становится критическим параметром, который может напрямую влиять на успех аутологичной терапии, так как показано, что возраст, пол, состояние здоровья и вес являются факторами, которые оказывают потенциальное влияние на регенеративный потенциал или пролиферативную способность МСК. Например, уменьшение количества сосудистых клеток-предшественников в жировой ткани с возрастом

приводит к снижению ангиогенного потенциала и способности устанавливать зрелую микроциркуляцию изолированной СВФ [49]. Избыточный вес отрицательно влияет на пролиферацию и дифференцировку МСК, что делает его критическим критерием при выборе донора в клинических приложениях [65]. Более того, ожирение приводит к увеличению провоспалительных макрофагов и CD8+ Т клеток, а также к снижению Tregs лимфоцитов в жировой ткани, что впоследствии влияет на состав СВФ. Хронические заболевания, такие как сахарный диабет, также могут влиять на эффективность МСК в заживлении ран [43, 93].

Также следует принимать во внимание, что выживаемость и пролиферативный потенциал МСК может снижаться после криоконсервации и размораживания липоаспираатов, а также в результате продолжительного культивирования в процессе накопления клеточной массы, который предполагает большое число пассажей.

В связи с вышесказанным, разработка новых методов, способных усилить регенераторный потенциал МСК, является важным шагом в дальнейшем развитии клинического применения производных жировой ткани для лечения ран.

1.5 Использование низкоинтенсивной лазерной терапии в программах реабилитации и немедикаментозного лечения разных заболеваний

Современные технологии медицинской реабилитации включают в себя широкий спектр методов аппаратной физиотерапии [3]. Лазеротерапия, в основе которой лежит использование низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), была первоначально открыта доктором Эндре Местером в 1967 году, который наблюдал стимулирующее действие НИЛИ на рост волос после облучения маломощным рубиновым лазером [89]. Сегодня НИЛИ имеет большое практическое значение в лечении и реабилитации многих заболеваний. Суть метода заключается в способности НИЛИ повлиять на функциональное состояние тканей, органов и систем организма человека, без нарушения их морфологической

структуры. Достигается данный эффект при использовании длины волны в диапазоне 300–10600 нм, плотностью энергии 1–4 Дж/см² и выходной мощностью не более 10-90 мВт что значительно ниже параметров, используемых при других формах лазерной терапии, таких как лазерная резка, термическая коагуляция тканей и лазерная абляция [141].

Отличительными особенностями лазерного излучения являются: монохроматичность, когерентность и поляризованность, которые обеспечивают такие преимущества НИЛИ как точность дозирования и равномерность облучения [23]. Лазеротерапия, основанная на применении НИЛИ, широко применяется в современной клинической практике. Разработано и внедрено множество методик, основанных на применении НИЛИ, особенно инфракрасного и красного диапазонов для лечения целого ряда заболеваний [25]. В обзоре Поддубной О.А. (2020) представлен краткий перечень показаний к назначению низкоинтенсивной лазеротерапии. Он включает в себя заболевания сердечно-сосудистой системы (ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, заболевания сосудов (артерий и вен) нижних и др.); заболевания дыхательной системы (бронхиты, пневмонии, бронхиальная астма и др.); заболевания пищеварительной системы (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, гастриты, гепатиты, холециститы, панкреатиты, колиты и др.); заболевания опорно-двигательной системы (артриты, артрозы, остеохондроз и др.); заболевания центральной и периферической нервной системы (сосудистые нарушения мозгового кровообращения, невралгии и др.); заболевания мочеполовой системы (эрозии шейки, матки, аднекситы, простатиты, пиелонефриты, циститы и др.); заболевания кожи (нейродермиты, псориаз, атопический дерматит и др.); заболевания ЛОР-органов (отиты, тонзиллиты, гаймориты и др.); заболевания стоматологического профиля (стоматиты, пародонтоз, гингивиты и др.); косметологическая практика и спортивная медицина; онкологические заболевания на этапе реабилитации [24] Широко применяется НИЛИ при лечении заболеваний хирургического профиля, таких как трофические язвы, плохо заживающие раны, переломы, травмы, остеомиелит, ожоги, пред- и послеоперационная подготовка и др.

Существенным преимуществом применения НИЛИ в клинической медицине является малое число противопоказаний. Комплексное применение лазеротерапии при лечении большинства заболеваний позволяет существенно снизить дозировку лекарственных средств и длительность их приема, одновременно повышая эффективность терапии. Важно отметить, что лазеротерапия не провоцирует аллергических реакций и привыкания, сокращает сроки лечения и реабилитационного периода, а полученный лечебный эффект сохраняется на более длительный срок. Лазеротерапия не вызывает дискомфорта и может быть выполнена в амбулаторных условиях, без необходимости госпитализации.

В настоящее время выпускается большое количество аппаратов для лазеротерапии, технические характеристики которых позволяют использовать фотобиомодулирующий эффект НИЛИ в различных применениях. Основными документами, регламентирующими работу с лазерными аппаратами, являются: ГОСТ Р-50723–94. «Лазерная безопасность. Общие требования безопасности при разработке и эксплуатации лазерных изделий»; «Санитарные нормы и правила устройства и эксплуатации лазеров № 5804–91»; ОСТ 42–21–16–86. «Система стандартов безопасности труда, отделения, кабинеты физиотерапии»; Приказ Минздравмедпрома Российской Федерации от 14.03.1996 г. № 90 «О порядке проведения предварительных и периодических медицинских осмотров работников и медицинских регламентах допуска к профессии»; «Типовая инструкция по охране труда при проведении работ с лазерными аппаратами»; МУ287–113–00. «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения. Требования к размещению лазерных аппаратов, организации рабочих мест и помещениям» изложены в следующих документах: ГОСТ Р-50723–94, СанПиН 5804–91, ССБТ ОСТ 42–21–16–86. Лазерные аппараты должны использоваться в соответствии с «Санитарными нормами и правилами эксплуатации лазеров» СНИП 5804–91, а кабинеты лазеротерапии оборудоваться согласно СНИП 11–69–78 (6) и 11–4–79, 11–69–78 [24].

1.6 Механизмы репаративно-регенераторного эффекта низкоинтенсивной лазерной терапии в лечении ран

Вскоре после обнаружения способности лазерного облучения стимулировать рост волос, пионер лазерной терапии Местер показал, что НИЛИ способствует пролиферации клеток, синтезу коллагена и микроциркуляции, тем самым ускоряя заживление, уменьшая воспаление и способствуя регенерации тканей при заживлении ран [99-101]. Это открытие заложило основу для клинического применения лазеров в лечении хронических ран и послеоперационном восстановлении. Результаты последующих многолетних экспериментально-клинических исследований доказывают выраженный репаративно-регенераторный эффект НИЛИ. Показано, что НИЛИ способствует нормальному восстановлению структурных элементов ткани взамен погибших и окончательное заживление с восстановлением целостности поврежденной ткани в различных областях применения.

Большое внимание уделяется применению НИЛИ в лечении ран полости рта [104]. В рандомизированных клинических исследованиях показана эффективность НИЛИ в заживлении раны после удаления третьих моляров [119] и [34]; заживлении после лоскутной операции при лечении пародонтита [84]; заживлении после операции по установке зубных имплантов [44] заживлении периапикальных поражений [133]; уменьшении боли в височной, медиальной крыловидной и латеральной крыловидной мышцах при миофасциальном болевом синдроме [79]. Согласно систематическому обзору и мета-анализу клинических исследований [29], НИЛИ является эффективным методом ускорения заживления ран и облегчения боли у пациентов после гингивэктомии. Пациенты, получившие терапию НИЛИ демонстрируют значительно более высокое среднее значение индекса заживления по сравнению с контрольной группой на 3-й день и 7-й день после операции. Анализ также выявил снижение послеоперационной боли после НИЛИ терапии. Авторы другого систематического обзора и мета-анализа [60],

отметили также статистически значимое увеличение полной эпителизации раны на 14-й послеоперационный день в дополнение к вышеуказанным эффектам НИЛИ.

Особое внимание привлекает НИЛИ как эффективный и неинвазивный инструмент в лечении трофических язв стопы при сахарном диабете. Несмотря на применение комплексного лечения, включающего различные подходы, проблемы с заживлением язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы остаются актуальной клинической задачей, вызывая сложности как для медицинских работников, так и для пациентов. Традиционные методы лечения, такие как очистка ран, пересадка кожи, вазодилататоры и антибиотики, не всегда достигают удовлетворительного результата. Недавний мета-анализ 11 исследований, включающих 657 пациентов, выявил, что у пациентов с диабетическими язвами стопы I–II степени НИЛИ значительно увеличивает скорость полного заживления, площадь усадки раны и скорость бактериальной очистки раны по сравнению с контрольной группой, а также снижает частоту инфицирования [48]. Сходное заключение было сделано на основании систематического обзора 24 клинических исследований, включающих 1821 пациента с сахарным диабетом 1 и 2 типа. Показано, что терапия НИЛИ значительно улучшает скорость полного выздоровления у пациентов с диабетической язвой стопы по сравнению с пациентами в контрольной группе и группе плацебо [103]. Оптимальными параметрами для точечного бесконтактного применения являются длина волны 632 – 685 нм, мощность 30 -50 мВт, дозировка 3 - 6 Дж/см², длительность 30 – 80 сек [110]. По мнению авторов обзора, [140] НИЛИ с длиной волны в инфракрасном диапазоне (850 - 890 нм) и мощностью 3 - 7 Дж/см² также ускоряет заживление диабетических язв.

В целом физиотерапия с помощью НИЛИ широко применяется при различных кожных ранах, включая раны от язв проказы, бариатрической хирургии, грыжесечения, шрамов от тиреоидэктомии, ожогов, донорских участков для трансплантации кожи, эпизиотомии и других [141]. По состоянию на конец 2024 года сообщается о 18-ти рандомизированных контролируемых исследованиях, в которых проанализировано 670 кожных ран с определением процентного

уменьшение размера раны, скорости полного заживления раны и субъективного ощущения боли [141]. Метаанализ этих исследований показал, что НИЛИ приводит к значительному уменьшению размера раны ($p < 0,0001$), что приводит к увеличению скорости полного заживления ран ($p = 0,0003$) и уменьшению боли ($p = 0,02$). Тип низкоуровневого лазера, используемого в исследованиях, варьировался. В восьми исследованиях указывалось использование красного диодного лазера. Длина волны варьировалась от 400 до 890 нм с модальной длиной волны 660 нм.

Установлено, что НИЛИ может быть эффективным при лечении ожогов кожи как недорогое и неинвазивное лечение [39]. Например, в двойном слепом рандомизированном клиническом исследовании [147] обнаружено влияние терапии НИЛИ на процесс заживления донорского участка у пациентов с ожоговой язвой после операции по пересадке кожи. В работе было выбрано восемнадцать донорских участков у 11 пациентов с ожоговой язвой 3 степени. Донорские участки были разделены на 2 части, для лазерного облучения и контроля случайным образом. Группа лазерной терапии облучалась красным, 655-нм лазерным светом, 150 мВт, 2 Дж/см², в дни 0 (сразу после операции), 3, 5 и 7. перевязка и другой терапевтический уход за обоими участками были одинаковыми. Размер донорского участка уменьшился в обеих группах в течение 7-дневного периода исследования ($P < 0,01$), и это уменьшение было значительно больше в группе, получившей облучение НИЛИ ($P = 0,01$).

Известно, что механизм заживления ран при кожных ожогах представляет собой взаимодействие каскадного высвобождения цитокинов и внеклеточного матрикса и включает следующие этапы: спонтанное и взаимозависимое воспаление, пролиферацию и ремоделирование. Ранние стадии восстановления — это пролиферация и отек, которые могут модулировать осложнения, такие как одновременное уменьшение количества лейкоцитов и макрофагов, фибробластов и ангиогенеза. Эти осложнения могут привести к образованию рубцов и сращений тканей. Механизм воздействия лазера на биологические ткани в основном связан со стимуляцией высвобождения цитохромоксидазы, и он активирует

внутриклеточные каскадные реакции и увеличивает внутриклеточный и молекулярный синтез и впоследствии увеличивает синтез РНК и ДНК, что, в свою очередь, увеличивает пролиферацию и миграцию клеток при восстановлении поврежденной ткани [39]. Лабораторные экспериментальные исследования показали, что НИЛТ увеличивает пролиферацию фибробластов и синтез коллагена вместе с грануляцией тканей. Эти клеточные события, по-видимому, приводят к ускорению заживления ожоговой раны и реэпителизации. Считается, что длина волны 660 нм НИЛИ эффективна для начальных стадий заживления раны, а длину волны 780 нм эффективна для образования грануляции ткани [92].

1.7 Механизмы влияния низкоинтенсивной лазерной терапии на функциональную активность мезенхимальных стволовых клеток

Предполагается, что терапевтический эффект НИЛИ во многих клинических ситуациях, в том числе в заживлении ран, обусловлен повышением репаративно-регенераторного потенциала клеток. Хотя в настоящее время нет единого мнения о молекулярном механизме действия НИЛИ [23], считается, что энергия лазера поглощается внутриклеточными хромофорами и преобразуется в метаболическую энергию, которая затем используется митохондриальной дыхательной цепью для производства АТФ и повышения активности ДНК и синтеза РНК и белков [67, 161]. Таким образом, способность ускорять ранозаживление, связана с тем, что НИЛИ стимулирует пролиферацию различных типов клеток, включая фибробласты, эндотелиальные клетки, скелетные клетки, кератиноциты, миобласты и стволовые клетки. В частности, установлено, что НИЛИ может способствовать увеличению пролиферации мезенхимальных стволовых клеток крови, пуповины, костного мозга и зубной пульпы [32, 41, 77, 107].

В многочисленных экспериментах продемонстрировано стимулирующее влияние НИЛИ с длиной волны красного спектра (600 – 700 нм) на функциональную активность МСК, выделенных из жировой ткани. В работе [55]

показано, что НИЛИ повышает устойчивость жировых мезенхимальных стволовых клеток к токсическому действию доксорубина. В культуре клеток, обработанных лазером, остается больше жизнеспособных и меньше апоптических клеток, а также снижается окислительный стресс. Кроме того, под действием лазера восстанавливается клеточная морфология, модифицированная доксорубином, и регистрируется более высокий уровень интерлейкина 6 (Ил-6). В серии работ [116-118] Парк с соавторами показали, что НИЛИ увеличивает количество ангиогенных и снижает количество апоптических факторов, экспрессируемых МСК. При трансплантации кожного лоскута выявлена дифференцировка стволовых клеток в клетки эндотелия. Усиление пролиферации, дифференцировки и секреции факторов роста МСК выявлены в модели фотостарения кожи у мышей [86]. В исследовании [158] НИЛИ с длиной волны 660 нм стимулировало пролиферацию и жизнеспособность МСК, а также усиливал клеточную миграцию, стимулируя ERK1/2 киназы и продукцию тромбоцитарных факторов роста HGF и PDGF. Показано снижение регуляции Notch1 и TGF- β 1 в МСК при действии НИЛИ, что обеспечивает эффект облучения на фибробласты фиброзного рубца через паракринную регуляцию [72]. Необходимо отметить, что направленность эффекта лазера зависит от энергии излучения. При сравнении эффектов 660-нм лазера с мощностью 40 мВт и энергией 0,56, 1,96 и 5,04 Дж установлено, что пролиферация и жизнеспособность МСК увеличиваются после облучения с энергией 0,56 и 1,96 Дж, а более высокая энергия излучения, такая как 5,04 Дж, напротив, ингибирует клетки [54].

В ряде работ выявлено усиление противовоспалительного потенциала МСК под действием НИЛИ с длиной волны 660 нм. Так, Ву и соавторы [153] определяли экспрессию Toll-подобных рецепторов (TLR 1, TLR2, TLR3, TLR4 и TLR6), продукцию провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1 β , интерлейкина-6 и интерлейкина-8) в МСК, стимулированных липополисахаридом грамотрицательных бактерий (ЛПС). Установлено, что лазерное облучение ингибирует, продукцию провоспалительных цитокинов. По мнению авторов противовоспалительный эффект, вызванный НИЛИ, может быть обусловлен

увеличением внутриклеточного уровня цАМФ, который снижает уровень транскрипции ядерного фактора каппа В (NF-κB). Позднее данные результаты были подтверждены в работе [157], в которой НИЛИ снизило секрецию Ил-1β, Ил-6, Ил-8, активных форм кислорода и оксида азота (NO) в МСК, обработанных ЛПС. Иммунофлуоресцентный анализ также продемонстрировал снижение ядерной транслокации NF-κB, а вестерн-блот-анализ указал на то, что лазерное облучение подавило активацию NF-κB через регулирование фосфорилирования факторов p65 и IκBα.

НИЛИ с длиной волны 630 нм оказывает следующие эффекты на МСК: увеличение жизнеспособности [160], увеличение жизнеспособности и пролиферации [57, 107], увеличение жизнеспособности, пролиферации и экспрессии интегрин-1β [108], стимуляция формирования костной ткани в бесклеточном дермальном матриксе [50], стимуляция дифференцировки в клетки гладких мышц при совместном с ними культивировании [106].

Проведено сравнение влияния НИЛИ с длиной волны 420, 540, 660 и 810 нм в одинаковой дозе (3 Дж/см²) на способность МСК дифференцироваться в остеобласты [150]. На основании экспрессии фактора транскрипции RUNX2, экспрессии остеобластного белка и остеокальцина авторы обнаружили, что облучение с длинами волн 420 и 540 нм является более эффективным в стимуляции дифференциации остеобластов по сравнению эффектами облучения с длиной волны 660 нм и 810 нм. В тоже время было показано, что при культивировании в среде пролиферации наблюдается четкая разница между эффектом синего/зеленого лазера (420/540 нм), который подавляет пролиферацию, и эффектом красного/инфракрасного (660 и 810 нм) лазера, который стимулирует пролиферацию [151]. Синий/зеленый лазер снижает уровень внутриклеточного АТФ, в то время как красный/инфракрасный лазер увеличивает его двухфазным образом. Синий/зеленый лазер вызывает большее увеличение внутриклеточного кальция и активных форм кислорода, снижает митохондриальный мембранный потенциал и внутриклеточный рН, в то время как красный/инфракрасный лазер оказывает противоположный

эффект. При этом ингибирование пролиферации, вызванное синим/зеленым лазером, отменяется синтетическим аналогом капсаицина, капсазепином и антиоксидантом N-ацетилцистеином.

В работе [150] показано, что НИЛИ с длиной волны 540 нм может эффективно способствовать остеогенной дифференцировке МСК. Обнаружено, действие НИЛИ с длиной волны 532 нм (зеленый цвет) меняется со временем. МТТ тест показал, что НИЛИ стимулирует пролиферацию МСК на 5 день по сравнению с 3 днем после облучения. Однако, пролиферативная активность клеток далее снижалась на 7 день по сравнению с 5 днем после облучения. Одновременно с этим выявлено снижение экспрессии генов воспалительного процесса, таких как CSF2, CXCL2, 3, 5, 6, 8, and CCL2 [142].

НИЛИ с длиной волны в области ближнего инфракрасного излучения (830 нм) увеличивал жизнеспособность МСК, трансплантированных крысам подкожно [102].

Следовательно, согласно мнению авторов обзора [143], текущее представление заключается в том, что НИЛИ проявляет различные эффекты в зависимости от параметров и длин волн. Красные и инфракрасные лазеры особенно эффективны для стимуляции пролиферации клеток, дифференциации, уменьшения воспаления и улучшения заживления ран. Синие лазеры, как правило, подавляют пролиферацию клеток, в то время как зеленые лазеры эффективны для уменьшения воспаления. Эти эффекты связаны с изменениями в экспрессии генов и сигнальных путях, индуцированных лазером, что подчеркивает важность выбора подходящего типа лазерного излучения для стимуляции конкретных терапевтических целей.

Таким образом анализ литературы показывает, что комбинированная терапия с использованием аутологичных клеточных продуктов жировой ткани и НИЛИ является перспективным направлением в регенеративной медицине. Однако остаются нерешённым ряд вопросов и научных задач, как в отношении изучения способов получения, усиления регенераторных свойств СВФ и МСК, так и в отношении разработки конкретной методики лазерной стимуляции регенераторных свойств стволовых клеток жировой ткани [16,17].

В первую очередь, для применения клеточных продуктов в клинической практике большое значение имеет разработка и внедрение устройств автоматизации и стандартизации процедуры выделения клеточных фракций из жировой ткани. При этом помимо получения клеточных продуктов с использованием ферментов, также нашли применение технологии, основанные на механической обработке жировой ткани. Поэтому, целесообразным является сравнение эффективности разных способов выделения клеточного продукта из жировой ткани, основанных на применении ферментативного и механического методов.

Во-вторых, важно установление оптимальных параметров лазерного излучения, влияющих на эффективность применения НИЛИ, так как низкий выход стволовых клеток и пониженная скорость их пролиферации в условиях *in vitro* значительно снижают результативность клеточной терапии. Остается неизвестной эффективность НИЛИ при применении к стволовым клеткам в условиях разной кислотности клеточной среды. Это важно, для расширения областей клинического применения клеточной терапии, так как каждая стадия воспалительно-репаративного процесса характеризуется своим значением кислотности раневого ложа. Так, например, стадия острого воспаления сопровождается снижением кислотности раневого ложа до pH 5,5-6, на стадии репаративной регенерации кислотность составляет порядка pH 7,0, хроническое воспаление характеризуется щелочной (pH 8,0) реакцией.

И, наконец, для успешной трансляции полученных знаний в медицинскую практику восстановительной медицины требуется научное обоснование в виде тестирования технологии усиления регенераторного потенциала СВФ в эксперименте на животной модели. При этом, особый интерес вызывает выявление и доказательства степени восстановительного и регенераторного эффекта при комбинированном воздействии аутологичной СВФ жировой ткани и НИЛИ в модели термического ожога *in vivo*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн и объект исследования

Диссертационная работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках НИР государственного задания «Разработка инновационной технологии и научное обоснование применения низкоинтенсивных физических факторов для усиления регенераторного потенциала стромально-васкулярной фракции жировой ткани в эксперименте на животной модели термического ожога», № НИОКР 121040100051-7.

В соответствии с поставленными задачами, дизайн исследования включал в себя 2 основных направления исследований:

1. Комплекс исследований расписать *in vitro*;
2. Исследование расписать *in vivo*.

Исследования в рамках 1-го направления исследований (*in vitro*) проводились в рамках 4-х последовательно выполненных экспериментальных блоков:

1.1. Определение эффективности выделения СВФ жировой ткани с помощью ферментативного и механического способа. Общее количество образцов - 40, по 20 на каждый метод.

1.2. Определение энергии НИЛИ, эффективной для стимуляции регенераторного потенциала МСК жировой ткани *in vitro*, состоящее из 64 серии экспериментов по 30 образцов клеточной культуры.

1.3. Определение пролиферативного потенциала МСК жировой ткани при воздействии кислой (рН 5.0) и щелочной среды (рН 8.0), как экспериментальной

модели клеточного поведения в условиях острого и хронического воспаления *in vitro*, состоящее из 30 серий эксперимента по 20 образцов клеточной культуры.

1.4. Определение влияния НИЛИ ультрафиолетового и красного спектра на пролиферативную активность и жизнеспособность МСК жировой ткани в экспериментальной модели острого и хронического воспаления *in vitro*, состоящее из 80 серий эксперимента по 9 образцов.

Объектом исследования для 1 экспериментального блока служила жировая ткань, забранная путем липосакции от условно здоровых лиц, поступивших на плановую операцию по липосакции в клинику пластической хирургии. Работа проводилась в рамках научно-технического сотрудничества с клиникой пластической хирургии по договору №150-4 от 15.01.2020. В работе использовали биоматериал от пациентов, которые подходили по критериям включения, с отрицательными результатами на ВИЧ, гепатит и инфекционные заболевания (см. раздел 2.2). Перед исследованием все доноры подписывали добровольное информированное согласие на участие в научно-исследовательской работе. Жировая ткань забиралась преимущественно из брюшной или бедренной области тела, после чего в течение 4 часов после операции доставлялась в лабораторию клеточных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Объектом исследования для 2-4 экспериментальных блоков служили культуры клеток МСК жировой ткани, полученные в ходе выполнения блока 1. Для подтверждения принадлежности выделенной культуры клеток к МСК, проводили иммунофенотипирование каждого образца клеток по основным поверхностным маркерам, характерным для МСК. Дизайн исследования приведен в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Дизайн исследования *in vitro*.

1.1. Определение эффективности выделения СВФ жировой ткани с помощью ферментативного и механического способа.			
Биоматериал		Метод выделения	
Жировая ткань (n=40)		Ферментативный (n=20)	Механический (n=20)
1.2. Определение энергии НИЛИ, эффективной для стимуляции регенераторного потенциала МСК жировой ткани <i>in vitro</i> .			
Объект исследования - клеточная линия МСК жировой ткани. Серия экспериментов n=64 по 30 образцов.			
Лазерное излучение УФ спектра (365 нм). Серия экспериментов n=32 по 30 образцов.		Лазерное излучение красного спектра (635 нм). Серия экспериментов n=32 по 30 образцов.	
1.3. Определение пролиферативного потенциала МСК жировой ткани при воздействии кислой (pH 5.0) и щелочной среды (pH 8.0), как экспериментальной модели клеточного поведения в условиях острого и хронического воспаления <i>in vitro</i> .			
Объект исследования - клеточная линия МСК жировой ткани. Серия экспериментов n=30 по 20 образцов.			
Ростовая среда, имитирующая острое воспаление – pH=5,0. Серия экспериментов n=15 по 20 образцов.		Ростовая среда, имитирующая хроническое воспаление – pH=8,0. Серия экспериментов n=15 по 20 образцов.	
1.4. Определение влияния НИЛИ ультрафиолетового и красного спектра на пролиферативную активность и жизнеспособность МСК жировой ткани в экспериментальной модели острого и хронического воспаления <i>in vitro</i> .			
Объект исследования – клеточная линия МСК жировой ткани. Серия экспериментов n=80 по 9 образцов.			
Ростовая среда, имитирующая острое воспаление – pH=5,0. Серия экспериментов n=40 по 9 образцов.		Ростовая среда, имитирующая хроническое воспаление – pH=8,0. Серия экспериментов n=40 по 9 образцов.	
Лазерное излучение УФ спектра (365 нм). Серия экспериментов n=20 по 9 образцов.	Лазерное излучение красного спектра (635 нм). Серия экспериментов n=20 по 9 образцов.	Лазерное излучение УФ спектра (365 нм). Серия экспериментов n=20 по 9 образцов.	Лазерное излучение красного спектра (635 нм). Серия экспериментов n=20 по 9 образцов.

Второе направление исследования было направлено на определение эффективности НИЛИ для усиления регенераторного потенциала СВФ на животной модели тяжелого термического ожога, с общим количеством 40

лабораторных животных. Объектом исследования на животной модели термического ожога служили 40 половозрелых самцов крыс породы Wistar массой 200-220 грамм. Дизайн исследования *in vivo* приведен в таблице 2.2.

Таблица 2.2 -Дизайн эксперимента *in vivo*

Группа 1 (Контроль)	Группа 2 (положительный контроль)	Группа 3 (лечение СВФ)	Группа 4 (Лечение СВФ, облученной НИЛИ)
Исследование динамики развития повреждения кожи и подлежащих тканей при моделировании тяжелого термического ожога, группа без лечения	Консервативное лечение тяжелого термического ожога (Диоксометил-тетрагидропиримидин + Хлорамфеникол)	Лечение тяжелого термического ожога с помощью СВФ жировой ткани	Лечение тяжелого термического ожога СВФ жировой ткани при помощи лазера с длиной волны 635нм
Количество животных (n) – 10 шт.	Количество животных (n) – 10 шт.	Количество животных (n) – 10 шт.	Количество животных (n) – 10 шт.

Протоколы и дизайн исследования был утвержден Локальным этическим комитетом при ФГБУ «НМИЦ РК» Минздрава России.

2.2 Определение эффективности выделения мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани с помощью ферментативного и механического способа

Были использованы стандартные для процедуры липосакции критерии включения и исключения пациентов.

К критериям включения относилось наличие локальных жировых отложений в области живота, боковых участков талии, спины и коленей с толщиной жировой складки в исследуемых областях не менее 2,5 и не более 6 см.

Критерии исключения включали в себя ожирение (ИМТ>30), преобладание внутреннего жира в области живота, слишком плотная текстура жировой ткани (невозможность поместить в аппликатор), грыжи в области воздействия (пупочная, в области белой линии живота), нарушение целостности кожных покровов в зоне воздействия, серьезные хронические заболевания, обострения хронических заболеваний, пороки сердца, другие патологии со стороны сердечно-сосудистой системы, нарушения свертываемости крови, сахарный диабет, злокачественные новообразования, активная форма герпеса, острые инфекционные заболевания (в т. ч. ОРВИ), психические заболевания, эндокринные патологии, снижение иммунитета на фоне гормональной терапии, беременность и период грудного вскармливания.

При выполнении работы были использованы следующие реактивы и расходные материалы: водный раствор хлоргексидина биглюконата 0,05% (Косметик Ленд, Россия); культуральная среда DMEM (Gibco, США); антибиотик пенициллин (25000 Ед.) (ПанЭко, Россия); L-глутамин (StemCell Technologies, США); 0,25% раствор трипсина-ЭДТА (StemCell, США); 0,02% раствор Версена (ПанЭко, Россия); фосфатно-солевой буфер 1xD-ФБР (StemCell, США); ЭТС, эмбриональная телячья сыворотка (Gibco, США); культуральный пластик (Corning, США); фильтрационная система 500 мл (Corning, США); пипетки серологические (5,10,25 мл) (Corning, США);

При выполнении работы было использовано следующее оборудование: ламинарный шкаф СЛШ-1,8 ЗП (Lamsystems, Россия); весы аналитические Pioneer New PX224 (Ohaus, США); CO₂-инкубатор Мод. 3427 (Thermo Scientific, США); холодильник лабораторный 151R-AEV-TS (Thermo Scientific, США); автоматический счетчик клеток Vi-Cell XR (Beckman Coulter, США); центрифуга SorvallBIOS 16 (Thermo Scientific, США); водяная баня BMH150 (Beckers, Италия); электронный микроскоп Olympus BX 41 (Olympus, Германия); автоматический

дозатор для серологических пипеток (Gilson Macroman, США); конфокальный микроскоп ZEISS LSM 900 (Carl Zeiss, Германия); инвертированный флуоресцентный микроскоп Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия); сканирующий блок для конфокального микроскопа LSM-510 META (Carl Zeiss, Германия).

Выделение СВФ ферментативным способом проводили по стандартной методике выделения [8] с помощью набора для выделения клеточной фракции из жировой ткани ферментативным способом «Система ЭСВИФ» («ESVIEF System») (номер регистрации РЗН 2020/12789). Внешний вид набора представлен на рисунке 2.1. Сепаратор устройства представляет собой прозрачную пластиковую цилиндрическую емкость с неразъемной крышкой. Сепаратор состоит из двух камер, расположенных одна над другой и разделенных нейлоновым фильтром с размером пор 100 мкм. Верхняя камера объемом 400 мл предназначена для обработки жировой ткани, имеет параболическое дно без острых углов. Нижняя камера объемом 5 мл служит накопителем клеток.

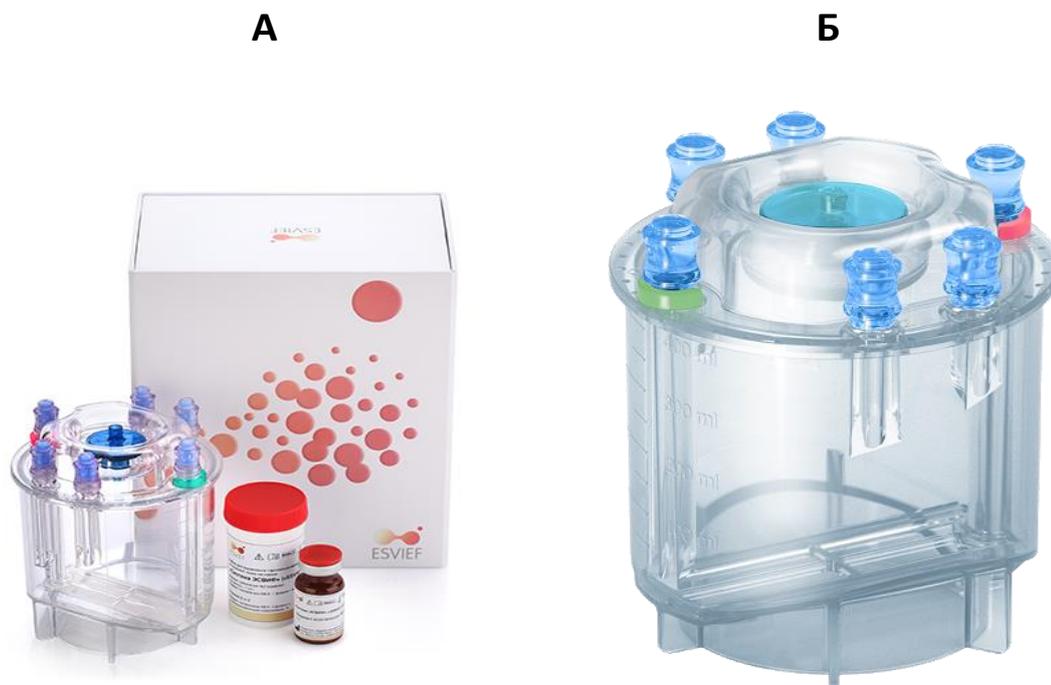


Рисунок 2.1 - Внешний вид набора (А) и сепаратора (Б) «Системы ЭСВИФ».

Липоаспират промывали 3-4 раза с помощью фосфатно-солевым буфером после чего подвергали ферментативной обработке при 37° С коллагеназой NB 6, 100 единиц активности, входящей в комплект устройства. Фермент инактивировали средой DMEM с низким содержанием глюкозы (Пан Эко, Россия) и 5% ЭТС (Biological Industries, Израиль). в течение 30 минут при 37°С. Полученную суспензию пропускали через мембранный фильтр 100 мкм и дважды отмывали раствором Хартмана.

Выделение СВФ механическим способом проводили с помощью системы Arthrex ACP SVF – изделие медицинского назначения, зарегистрированное на территории РФ (номер регистрации ФСЗ 2012/12123). Выделение проводилось в соответствии с рекомендацией производителя. Внешний вид системы представлен на рисунке 2.2.

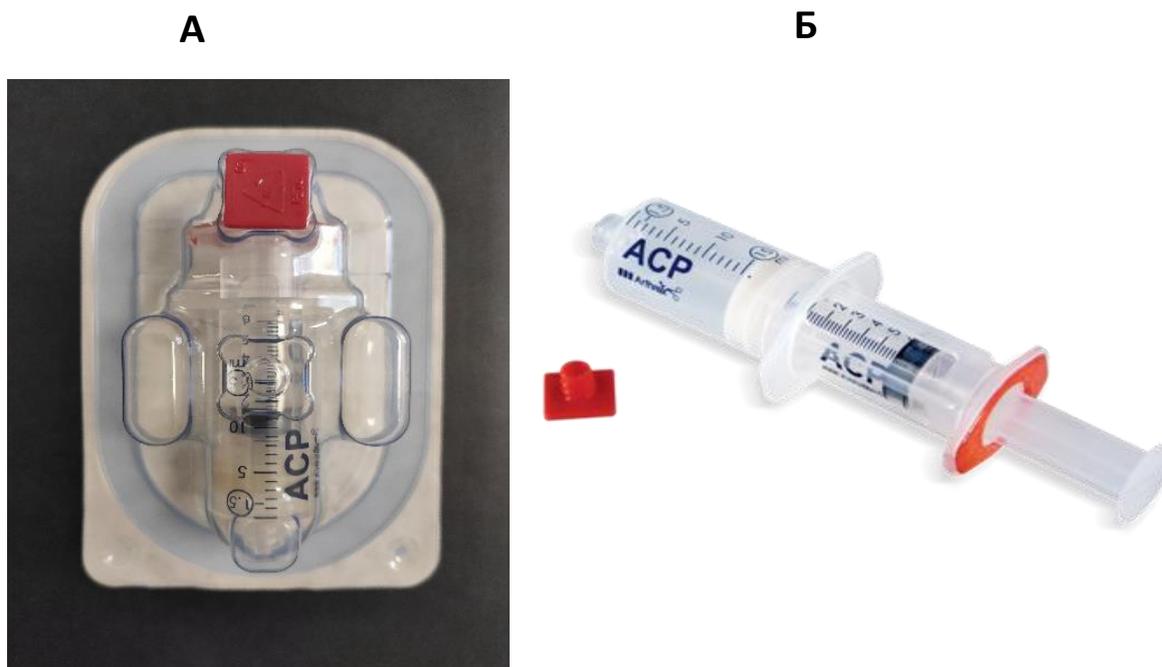


Рисунок 2.2 - Внешний вид набора (А) и двухкомпонентного шприца (Б) «Системы Arthrex ACP SVF»

Жировую ткань диспергировали с помощью адаптера с сеткой, имеющей диаметр пор 2,4 мкм. Затем, липоаспират переносился в двухкомпонентный шприц Arthrex ACP SVF. Общий объем липоаспирата составлял 15 мл. Далее проводилось

центрифугирование липоасpirата в шприце в течение 4 минут при 2500 об/мин. В результате центрифугирования материал разделялся на водную фракцию (нижний слой), жировую ткань (средний слой) и масло (верхний слой). При помощи внутреннего шприца производили отбор верхнего слоя (масло), а водная фракция удалялась через входное отверстие шприца.

Оставшаяся в шприце жировая ткань подвергалась механической обработке при помощи адаптера и шприца на 10 мл с креплением типа Luer Lock путем перекачивания из одного шприца в другой через металлическую сетку адаптера. Вначале через адаптер с сеткой с диаметром пор 2,4 мкм пятикратно, затем 30 раз через адаптер с сеткой с диаметром пор 1,4 мкм. После механической обработки гомогенизированная жировая ткань в шприце центрифугировалась в течение 4 минут при 2500 об/мин. При помощи внутреннего шприца отбиралась верхняя фракция (остаточное масло), во внешнем же шприце концентрировалась СВФ в количестве 2 мл.

Весь объем полученной СВФ (исключая клетки, необходимые для подсчета и исследования пролиферативной активности МСК жировой ткани) вносился в стеклянную виалу с транспортной средой Thinprep (Hologic). Далее, виала маркировалась в соответствии с маркировкой на бланке-направлении, несущем основную информацию об экспериментальном образце. Клеточный продукт, полученный при помощи системы Arthrex, дополнительно отмывался в р-ре Хартмана для избавления от остатков масла. Для клеточного продукта, полученного при помощи системы ЭСВИФ, данной манипуляции не требовалось.

Подсчет количества жизнеспособных клеток осуществляли общепринятым способом с использованием и 0,1% раствора трипанового синего. Клеточный состав полученных окрашенных препаратов изучали с помощью световой микроскопии на микроскопе Leica DM1000 при увеличении в 40 и 100 раз. Просматривали все клетки в поле зрения препарата и производили подсчет по формуле подсчета клеток в гемоцитометре.

Для приготовления тонкослойных цитологических препаратов из фиксированного клеточного материала для микроскопического анализа образцы

проходили пробоподготовку по «жидкостной» методике, рекомендованной производителем, на цитоцентрифуге Cyto-Tek и Thinprep (Hologic). Для цитологического исследования изготавливали мазки суспензии на покровном стекле, которые окрашивали по Романовскому-Гимза и по Папаниколау.

Для окраски по Романовскому-Гимза высохшие фиксированные мазки вместе с контейнером помещались в кювету с рабочим раствором краски на строго определенное время, подобранное для каждой партии красителя (от 20 до 45 мин). Контейнер вынимали со стеклами из кюветы с красителем и помещали его в кювету с водопроводной водой после чего высушивали на воздухе.

Для окраски по Папаниколау последовательно применяли краски: гематоксилин для окраски ядер, краски OG6 и EA для окраски цитоплазмы. При окраске в комбинированной цитоплазматической краске EA происходит сначала быстрая окраска цитоплазмы эозином в розовый цвет, затем часть клеток перекрашивается в зелёный цвет в результате действия красителя светло-зелёный SF и фосфорно-вольфрамовой кислоты. Окраска цитоплазмы клеток эозином в розовый цвет происходит в течение нескольких десятков секунд. Процесс окраски в зелёный цвет и её «выравнивания» происходит довольно медленно и требовал около 8 минут. После окраски в EA, с поверхности стекол смывали краску (жидкость) и производили дегидратацию препаратов с последующим просветлением и заключением под покровное стекло. Жидкости для заключительных промывок и дегидратации после окраски в EA выбирали так, чтобы не происходило вымывания цитоплазматических красителей. Для заключительной промывки использовали этанол. Препараты исследовали с помощью микроскопа Leica DM1000

Количество жизнеспособных клеток в полученной суспензии клеток СВФ жировой ткани определяли с помощью красителя трипанового синего и подсчета клеток в гемоцитометре (Hausser Scientific, Horshman, USA). Расчет осуществляли по формуле: X (количество клеток в 1 мл) = среднее число клеток в большом квадрате (1mm^2) \times фактор разведения $\times 10^4$. Для этого в пробирку типа Эппендорф вносили 10 мкл суспензии клеток и 10 мкл 0,1% раствора трипановой сини. Через

30-60 секунд 5 мкл суспензии помещали в лунку гемоцитометра под покрывное стекло. Количество погибших клеток (окрашенных синим) подсчитывали с помощью светового микроскопа (увеличение $\times 400$) и выражали в процентах.

Для получения первичной культуры МСК жировой ткани клеточную суспензию переносили на культуральный пластик T25 (Corning, США) из расчета 10^5 кл/см² и культивировали по стандартной методике в среде DMEM с низким содержанием глюкозы с добавлением 10% ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все StemCellTechnology, США).

Исследование регенераторного потенциала проводили на 3 пассаже культуры МСК. Культуру клеток пассировали в 35 мм чашки Петри из расчета 10^4 кл/см² и культивировали каждую линию в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в течение 1, 3 и 5 суток для верификации результатов. Рост клеток визуализировали каждые 24 часа при помощи инвертированного микроскопа Zeiss Axio Observer A1 с цифровой камерой AxioCam MRC5, на программном обеспечении Axiovision. По истечению времени культивирования клетки снимали раствором трипсина с 0,25% ЭДТА (StemCellTechnology, США) с поверхности пластика, производили подсчет с оценкой жизнеспособности на автоматизированном счетчике Bio-Rad TC-20 (Bio-Rad, США) по методике производителя и рассчитывали время удвоения клеточной популяции (DT) по формуле: $DT = (\log_2 2) \times t / [\log_2(N/N_0)]$, где t — время прироста популяции, N — число клеток через время t, N₀ — исходной число клеток.

2.3 Методы определения энергии низкоинтенсивного лазерного излучения, эффективной для стимуляции регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани *in vitro*

Для облучения культуры МСК жировой ткани использовали аппарат для внутривенного лазерного облучения крови «ЛАЗМИК-ВЛОК» (Россия) с лазерными головками с длиной волн 635 (красный лазер) и 365 нм (УФ лазер),

мощностью 2 мВ. Накопленная доза достигалась за счет времени экспозиции и составляла от 0,02 до 4 Дж/см².

МСК культивировали в 96-луночном культуральном планшете при стандартных условиях. После достижения плотности монослоя >90% клетки подвергали воздействию лазера. Сразу после завершения сеанса облучения клеточный монослой повреждали механическим способом, используя для этого стерильный пластиковый наконечник для дозатора 2-10 мкл. Затем, с использованием светового микроскопа (Leica Microsystems, Switzerland) и прилагающегося программного обеспечения (Leica Application Suite) оценивали площадь повреждения монослоя. Повторную микроскопию проводили через 24 и 48 ч.

2.4 Определение пролиферативного потенциала мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при воздействии кислой (pH 5.0) и щелочной среды (pH 8.0), как экспериментальной модели клеточного поведения в условиях острого и хронического воспаления *in vitro*

В качестве объекта исследования была использована культура МСК, полученная и охарактеризованная на предыдущем этапе исследования. Культуру клеток пассировали на культуральный пластик из расчета 10×10^4 кл/см² в питательных средах с кислотностью pH 6,0, pH 7,4 и pH 8,0 и облучали красным и УФ лазером в течение 110 и 2 с, соответственно. Плотность энергии составляла 0,7 и 0,035 Дж/см² для красного и УФ лазера, соответственно.

Для морфологической оценки клеток проводили визуальное наблюдение через 24 ч, 48 ч и 72 ч с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 4000B.

Для оценки влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на количество апоптических и некротических клеток адгезированные клетки снимали с поверхности планшета с использованием раствора трипсин-ЭДТА через 24 ч, 48 ч и 72 ч. Оценку количества апоптических и некротических клеток проводили

методом проточной цитометрии с использованием коммерческого набора (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen).

Оценку клеточного цикла МСК после воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения проводили с помощью проточной цитофлуорометрии с использованием коммерческого набора (CellCycleFlowEx®Kit (BD Pharmingen).

2.5 Определение влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на регенераторную способность стромально-васкулярной фракции жировой ткани в экспериментальной модели тяжелого термического ожога *in vivo*

В эксперименте использовали 40 половозрелых самцов линии Wistar массой 200-220 грамм. Воспроизведение ожога III степени площадью 10% от поверхности тела проводили по заранее отработанному способу [8].

Для нанесения термического ожога в области спины использовали устройство, состоящее из цилиндрического плоскодонного стеклянного стакана, воду в котором доводили до кипения с помощью кипятильника. Температуру воды контролировали при помощи термометра. Для этого, при помощи триммера выбривали зону на спине размером 5x5 см.

При работе с животными соблюдали положения по Европейской конвенции по защите животных, используемых в экспериментальных и научных целях. Условия содержания и процедура эксперимента соответствовали стандартам GLP. Температура воздуха в помещении составляла +24°C, влажность 55-60%, длина светового дня - 12 часов. Проведение эксперимента одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ РК» Минздрава России

Сформировано 4 группы животных, а именно: контрольная группа (группа без лечения), 2 группы сравнения: группа сравнения – стандартная терапия противомикробным комбинированным средством Диоксометилтетрагидропиримидин + Хлорамфеникол, и группа сравнения – терапия клеточным продуктом без воздействия НИЛИ. И опытная группа – терапия

клеточным продуктом после воздействия НИЛИ. Дизайн эксперимента *in vivo* см. в таблице 2.2.

В качестве источника получения СВФ использовали аутологичную жировую ткань животных. Забор жировой ткани осуществляли методом шприцевой липосакции по отработанной ранее методике [17]. Непосредственно перед процедурой, животных наркотизировали с помощью внутривенного введения 3% раствора препарата «Золетил» (Virabac, Франция).

После аспирации, жировую ткань объемом 2-3 мл помещали в стерильную пробирку со средой с повышенным содержанием антибиотика (400 ед/мл пенициллин + стрептомицин (ПанЭко, Россия)). Выделение СВФ проводили по стандартной методике, посредством ферментативной обработки жировой ткани как описано ранее [8]. Ткань инкубировали 30 минут в 0,015% растворе коллагеназы II типа (Sigma, США) при 37° С. Фермент инактивировали средой DMEM с низким содержанием глюкозы (ПанЭко, Россия) и 5% ЭТС (Biological Industries, Израиль). Подсчет и оценку жизнеспособности клеток проводили на автоматическом счетчике клеток TC20 (BioRad, США).

Непосредственно перед получением СВФ в группе 4, образцы жировой ткани подвергали воздействию лазера с длиной волны 635 нм, в течение 110 с до получения плотности энергии в 1 Дж/см².

Лечение тяжелого термического ожога проводили путем введения СВФ жировой ткани туннельным способом в область ожога в 5 точках в течение 3 часов после моделирования ожоговой травмы. За каждый прокол вводили по 0,2 мл СВФ. В группе положительного контроля (группа 2) лечение заключалось в наложении марлевой повязки, пропитанной противомикробным комбинированным средством Диоксометилтетрагидропиримидин + Хлорамфеникол, с последующей фиксацией при помощи пластыря. Регулярную смену повязки проводили через каждые 2 суток.

Осуществляли планиметрический анализ данных для чего ежедневно проводили фотофиксацию повреждений контрольных и опытных групп при помощи фотоаппарата Canon. При помощи программного обеспечения Altami Studio 4.0 рассчитывали площадь

повреждения. Характеризовали как саму область повреждения, так и прилегающие участки кожи.

2.6 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием статистического пакета IBM SPSS Statistics 19. Для проверки нормальности распределения использовали тест Колмогорова-Смирнова. Количественные данные в случае нормального распределения представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее значение, σ – стандартное отклонение. При отсутствии нормального распределения количественные данные представлены в виде $Me [Q_1, Q_3]$, где Me – медиана, Q_1 , Q_3 – первый и третий квартили, соответственно. Сравнение количественных показателей между группами при нормальном распределении исходно и в динамике проводилось с помощью критерия Стьюдента. Для сравнения показателей отличного от нормального распределения использовали критерий Манна-Уитни для сравнения различий между двумя независимыми выборками. Все различия считались значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Сравнительный анализ эффективности выделения мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани с помощью ферментативного и механического способа

Общее количество и жизнеспособность ядродержащих клеток определены в клеточных фракциях, полученных из 14 образцов жировой ткани человека с помощью ферментативного и механического метода выделения.

Установлено, что содержание ядродержащих клеток составляет $0,934 [0,586; 1,17] \times 10^6$ кл/мл жира при выделении клеточной фракции с помощью ферментативного метода. Выход ядродержащих клеток ниже более чем в 5 раз при механической, чем при ферментативной обработке липоасpirата и составляет $0,1 [0,058; 0,28]$. Отдельно следует отметить, что из-за специфики метода выделения механическим способом образуются агрегаты и комки клеток, которые влияют на конечное количество клеток в продукте (рисунок 3.1).

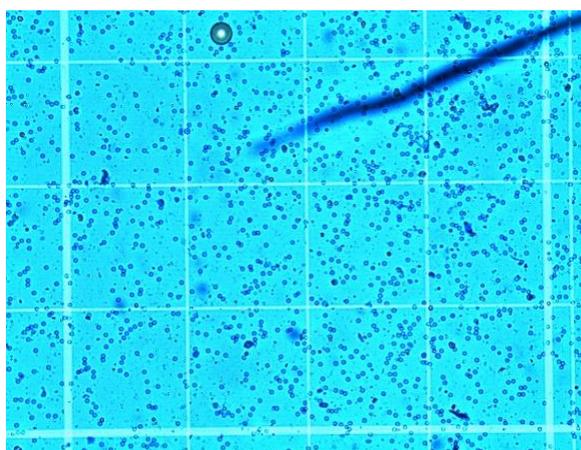
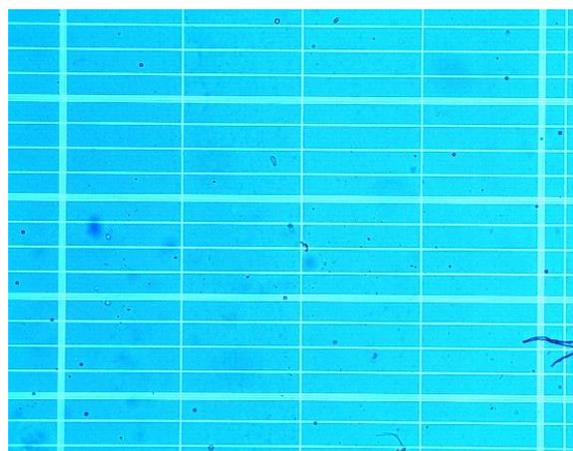
**А****Б**

Рисунок 3.1 - Внешний вид выделенных клеток в гемоцитометре, полученных из жировой ткани при помощи ферментативного метода (А) и механического метода (Б). Световая микроскопия, увеличение $\times 100$ (А), $\times 400$ (Б).

При этом, при использовании ферментативного метода, количество жизнеспособных клеток в 2,5 раза больше, чем при механическом методе и составляет 87% [82,75; 89] и 30% [22; 34] соответственно (рисунок 3.2).

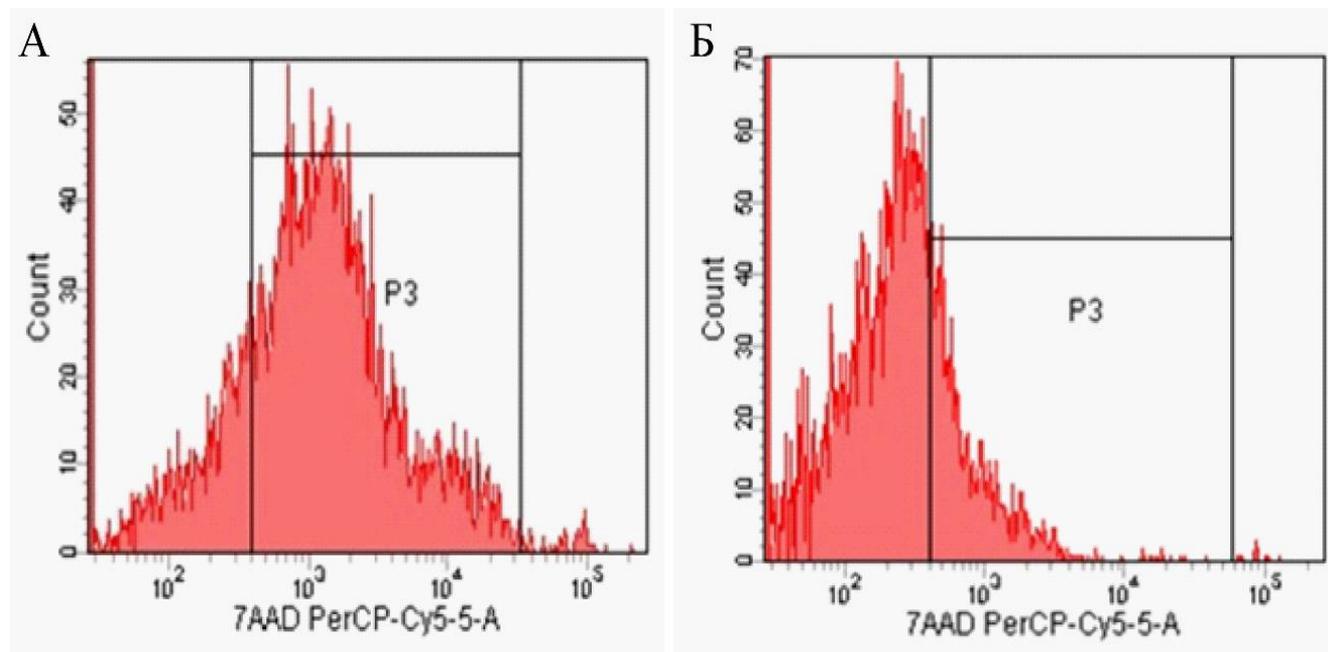


Рисунок 3.2 – Оценка жизнеспособности клеточных продуктов жировой ткани, полученных из жировой ткани при помощи ферментативного метода (А) и механического метода (Б). Проточная цитометрия.

Цитоморфологический анализ, проведенный с помощью световой микроскопии, выявил, что клеточный состав всех выделенных СВФ включает в себя клетки фибробластического ряда разной степени дифференцировки, клетки эндотелия, единичные липофаги и жировые клетки. В образцах СВФ, полученной с помощью механического метода, были также обнаружены разрушенные клетки и частицы соединительной ткани (рисунок 3.3).

Недостаточное количество ядродержащих клеток в СВФ, полученной при механической обработке жировой ткани, исключило возможность идентификации клеток и определения их пролиферативной способности с помощью проточной цитометрии. Поэтому, далее был установлен клеточный состав СВФ и оценена

пролиферативная способность мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани с помощью ферментативного метода.

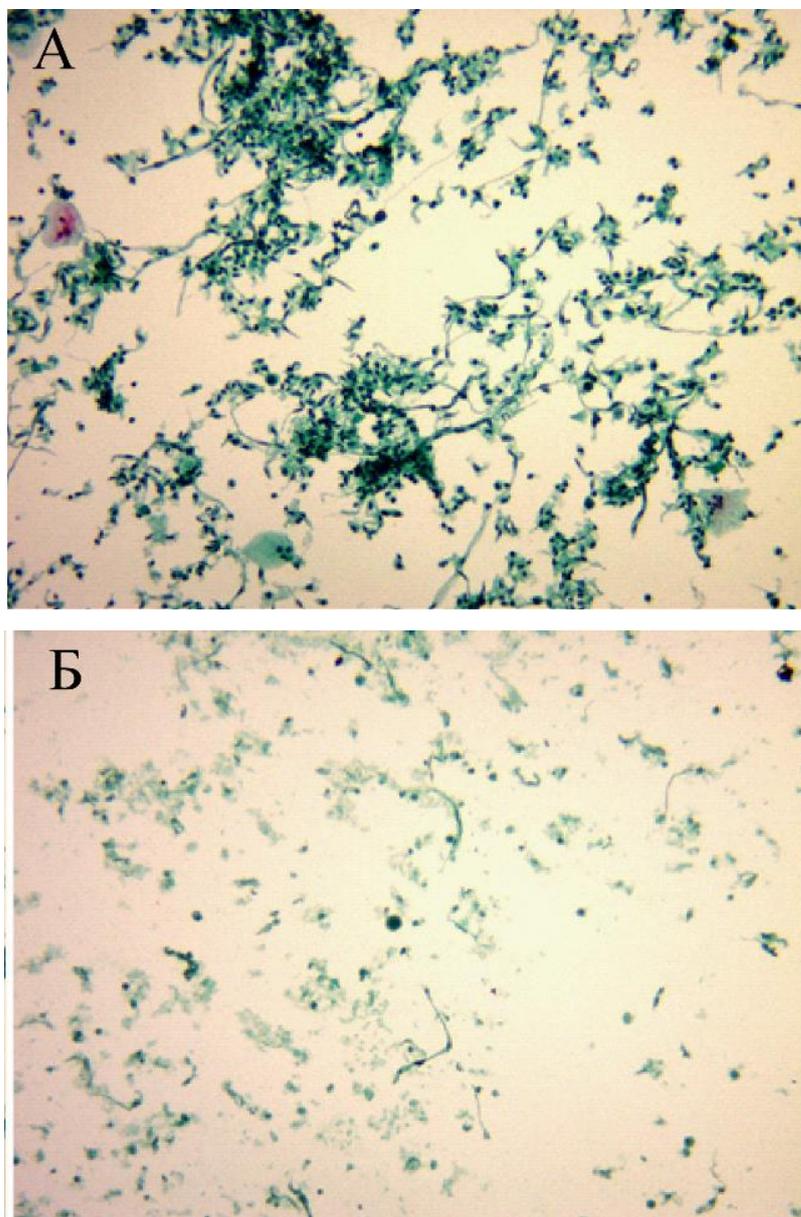


Рисунок 3.3 – Репрезентативные фотографии клеточного состава СВФ жировой ткани, полученные с помощью ферментативного метода (А) и механического метода (Б). Окраска по Папаниколау. Увеличение $\times 100$.

Согласно данным проточной цитометрии, содержание МСК, идентифицированных по маркерам $CD146^-$, $CD31^-$, $CD90^+$, $CD73^+$ и $CD105^+$, составляет в среднем $33,6 \pm 6,5\%$ в СВФ, полученной с помощью ферментативного

метода. Кроме того, в СВФ, выделенной из жировой ткани с использованием ферментативного метода, присутствуют клетки зрелого эндотелия, идентифицированные по маркерам CD146⁺, CD31⁺, CD73^{low}, CD90⁺, CD105⁻, эндотелиальные клетки-предшественницы, идентифицированные по маркерам CD146⁺, CD90⁺, CD73^{low}, CD105⁺, CD31⁺ и перициты, идентифицированные по маркерам CD90^{-/+}, CD146⁺, CD31⁻, CD105⁻.

Морфология выделенных МСК соответствует таковой у клеток коммерческой культуры МСК на 3 пассаже культивирования (рисунок 3.4). В обоих случаях клетки имеют правильную веретеновидную форму с четкими границами, 2-4 длинных отростка, гомогенную цитоплазма без каких-либо включений. Клеточное ядро, имеющее равномерное распределение хроматина, расположено эксцентрично, то есть ближе к периферии цитоплазмы.

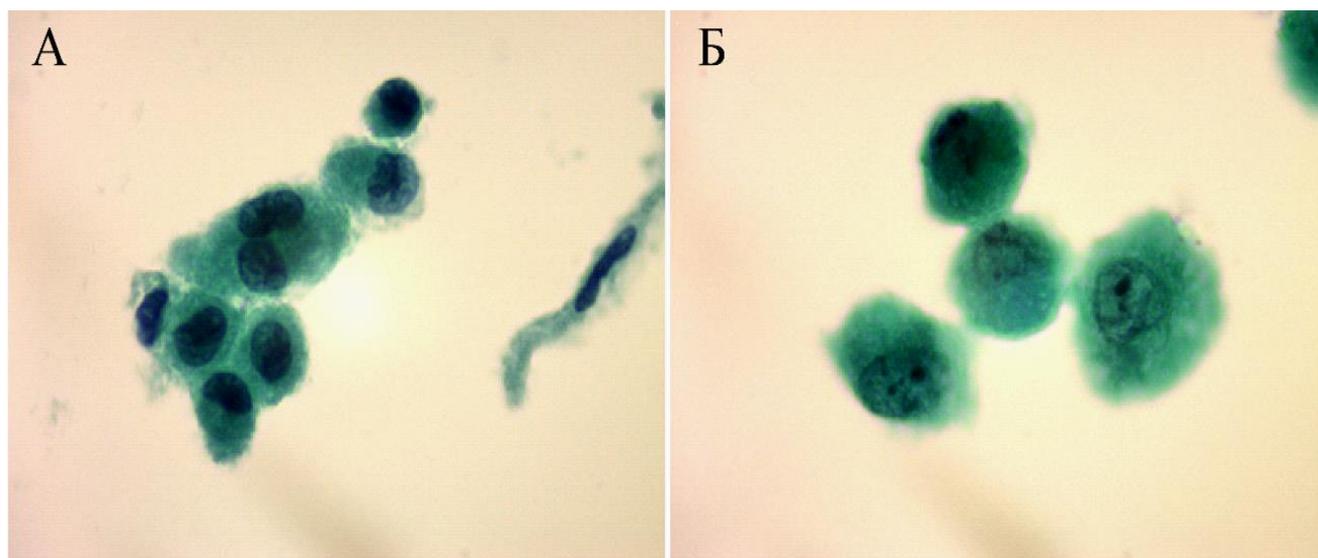


Рисунок 3.4 – Морфология МСК: А – в составе клеточного продукта, полученного при помощи ферментативного метода; Б – культивируемые клетки коммерческой линии МСК жировой ткани 3-его пассажа культивирования. Окраска по Папаниколау. Увеличение $\times 1000$.

Показано, что клеточная культура МСК жировой ткани, полученных с помощью ферментативного метода, характеризуется высоким пролиферативным потенциалом. Установлено, что среднее время удвоения популяции МСК

составляет $22,15 \pm 1,83$ ч. Эффективность формирования плотных, смешанных и диффузных колоний составляет $55,5 \pm 3,5$, $29,2 \pm 3,8$ и $15,3 \pm 2,7$ %, соответственно.

Сравнительная характеристика клеточных продуктов, полученных из жировой ткани доноров при помощи ферментативного и механического методов показала, что при ферментативном методе обработки выделяется статистически равнозначное количество остаточного масла ($p=0,063$), но при этом выявляется в 9,34 раза больше общего количества ЯСК/мл жира ($\times 10^6$) ($p=0,0071$), в 2,83 раза большая жизнеспособность ЯСК ($p=0,00099$) и в 9,93 раза больше общего количества ЯСК/мл липоаспирата ($\times 10^6$) ($p=0,0057$).

Таким образом, установлено, что ферментативный метод позволяет выделить из жировой ткани популяцию жизнеспособных МСК с высоким пролиферативным потенциалом. В тоже время механический способ выделения СВФ характеризуется низкой эффективностью (таблица 3.1).

Таблица 3.1 - Сравнительная характеристика клеточных продуктов, полученных из жировой ткани доноров при помощи ферментативного и механического методов

Наименование показателя	Ферментативный метод	Механический метод	p
Общее количество остаточного масла, %	18,0 [11,0; 21,0]	20,0 [13,0; 33,0]	>0,05
Общее количество ЯСК/мл жира ($\times 10^6$)	0,934 [0,586; 1,17]	0,1 [0,058; 0,28]*	<0,01
Жизнеспособность ЯСК, %	85,07 [82,75; 89,0]	30,0 [22,0; 34,0]*	<0,001
Общее количество ЯСК/мл липоаспирата ($\times 10^6$)	0,695 [0,462; 0,867]	0,07 [0,048; 0,173]*	<0,01

Примечания: 1. ЯСК – ядродержащие клетки. 2. Данные представлены в виде Ме [Q1;Q3]; * - различия достоверны по сравнению с ферментативным методом выделения ($p<0,05$). Критерий Манна-Уитни

Кроме того, выявлены ограничения механического способа выделения клеток. В частности, обнаружено, что конгломераты жировой ткани, образующиеся после липосакции, а также жировые конгломераты, образующиеся при механической обработке жировой ткани, препятствуют фильтрации препарата через адаптер с диаметром сетки 2,4 мкм. Следует отметить, что рекомендуемая производителем процедура разъединения шприца с адаптером и удаление конгломерата при помощи пинцета нарушает стерильность образца, так как система перестает быть закрытой.

Следовательно, можно сделать вывод, что способ обработки жировой ткани (механический или ферментативный) оказывает значительное влияние на характеристики выделяемой СВФ. При выделении ферментативным методом СВФ характеризуется большим выходом ядродержащих клеток, аналогичным выходу клеток при ручном ферментативном способе, и высоким пролиферативным потенциалом МСК. При выделении механическим способом клеточный продукт характеризуется низким выходом ядродержащих клеток, наличием большого количества остаточного масла и примесью разрушенной соединительной ткани.

На основании полученных данных ферментативный способ выделения был выбран для получения МСК на последующих этапах исследования.

3.2 Влияние энергии низкоинтенсивного лазерного излучения красного и ультрафиолетового спектра на регенераторный потенциал мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

Для оценки регенераторного потенциала МСК жировой ткани определяли скорость восстановления клеточного монослоя после механического повреждения. Данная модель отражает как скорость пролиферации клеток, так и интенсивность их миграции в область повреждения. Репрезентативное изображение типичного механического повреждения клеточного монослоя представлено на рисунке 3.5.

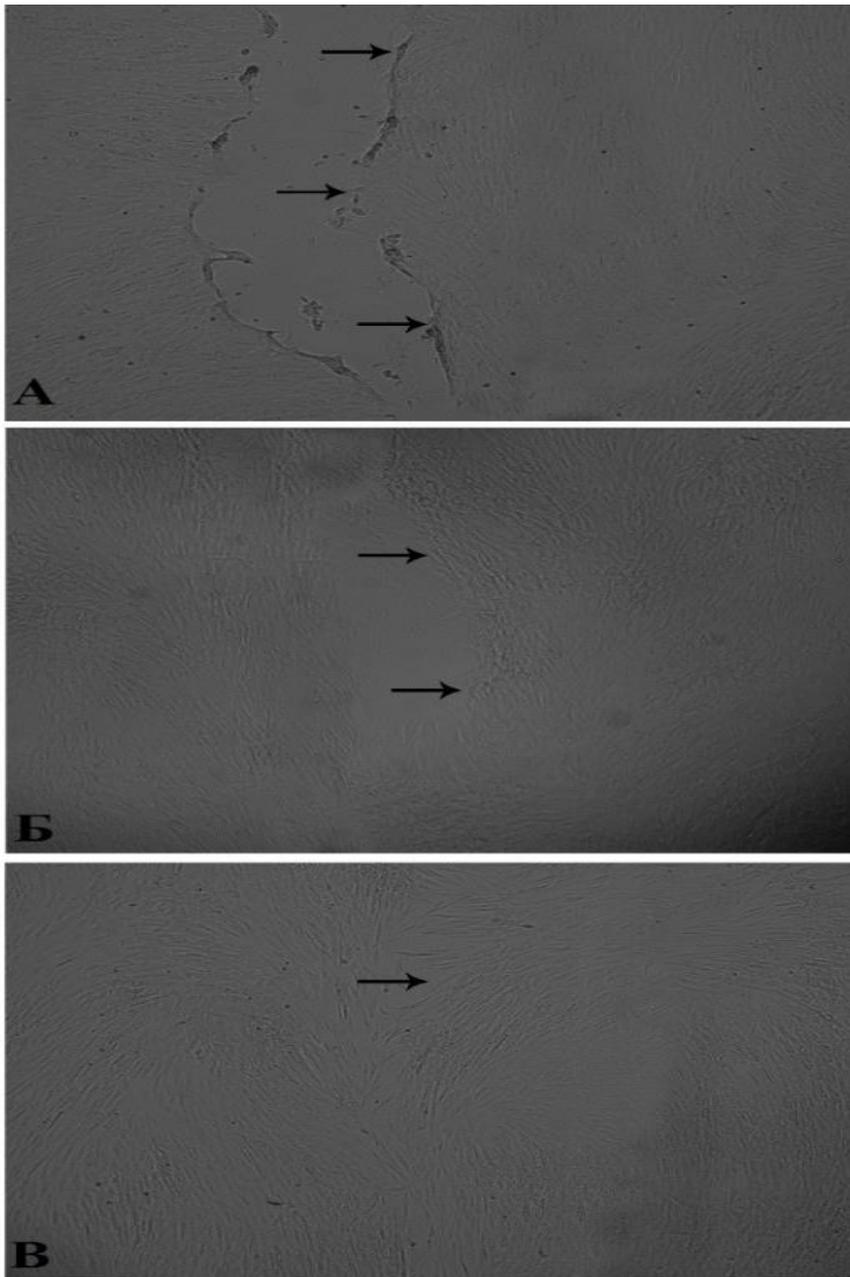


Рисунок 3.5 - Фото монослоя МСК сразу после нанесения повреждения (А), через 24 (Б) и 48 ч (В) восстановления. Световая микроскопия, увеличение 50×. Стрелками показаны границы монослоя.

Площадь разрыва между двумя частями монослоя адгезированных МСК составляет $1,2 \pm 0,2 \text{ мм}^2$ сразу после повреждения. Установлено, что пролиферация и миграция необлученных (контрольных) МСК в область повреждения уменьшает площадь повреждения монослоя до $68 \pm 13\%$ от начальной площади повреждения, принятой за 100%, через 24 ч. Площадь повреждения монослоя составляет $24 \pm 8\%$ через 48 ч инкубации контрольных клеток.

Проведено исследование влияния длины волны и энергии НИЛИ на восстановление клеточного монослоя в течение 24 и 48 ч после механического повреждения. Для этого монослой МСК перед повреждением облучали красным (длина волны – 635 нм) или ультрафиолетовым (длина волны - 365 нм) лазером, варьируя энергию излучения от 0,02 до 4 Дж (табл. 3.2).

Таблица 3.2 – Влияние НИЛИ красного спектра с длиной волны 635 нм и энергией излучения от 0,02 до 4 Дж на восстановление монослоя МСК после механического повреждения

Период наблюдения 24 ч		
Энергия излучения, Дж	Остаточная площадь дефекта, % (M±SD)	P
0 (контроль)	68,1±13,2	-
0,02	65,3±21,1	>0,05
0,1	57,8±18,3	>0,05
0,5	52,7±17,5	>0,05
1	53,4±16,1	>0,05
2	52,7±6,2	>0,05
3	69,1±9,8	>0,05
4	100*	<0,01
Период наблюдения 48 ч		
0 (контроль)	24,5±8,1%	
0,02	46,2±9,5%*	<0,05
0,1	45,0±11,8%*	<0,05
0,5	36,1±9,3%	>0,05
1	13,3±3,7%	<0,01
2	16,1±4,4%	<0,01
3	52,9±14,1%*	<0,05
4	100*	<0,01

Примечание - данные представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение; * - различия достоверны при $p < 0,05$ по сравнению с культурой клеток без воздействия НИЛИ в аналогичный период наблюдения (критерий Стьюдента).

Установлено, что облучение МСК лазером красного спектра с энергией до 0,5 Дж не влияет на способность клеток восстанавливать повреждение клеточного

монослоя: площадь повреждения составляет 52-69% через 24 ч инкубации. При воздействии лазера с длиной волны 635 нм и энергией излучения 1 и 2 Дж отмечается стимулирование пролиферации клеток. Далее регенерирующий потенциал МСК, облученных лазером красного спектра, снижается, так как площадь повреждения через 48 ч превышает таковую в контроле. Регенерация монослоя полностью ингибируется при облучении клеток лазером красного спектра с энергией излучения 4 Дж (таблица 3.2).

Установлено, что облучение МСК ультрафиолетовым лазером с энергией излучения 0,02 и 0,1 Дж увеличивает скорость восстановления монослоя после повреждения. В частности, через 24 ч инкубации площадь повреждения монослоя клеток, облученных ультрафиолетовым лазером с энергией излучения 0,02 и 0,1 Дж на 37 и 62% меньше, чем площадь повреждения монослоя клеток, не подвергшихся облучению. Облучение МСК с помощью ультрафиолетового лазера с энергией излучения в диапазоне от 0,5 до 2 Дж не влияет скорость восстановления монослоя после механического повреждения. Обнаружено, что регенерация монослоя полностью ингибируется в результате увеличения энергии ультрафиолетового НИЛИ до 3 и 4 Дж.

Регенерирующий эффект ультрафиолетового лазерного излучения на МСК не выявляется через 48 ч после повреждения клеточного монослоя. В частности, площадь повреждения клеточного монослоя составляет 21-35 % от исходной площади повреждения в том случае, если клетки были облучены ультрафиолетовым лазером с энергией излучения 0,02 – 2 Дж. Регенерация монослоя не наблюдается при облучении клеток ультрафиолетовым лазером с энергией излучения 3 и 4 Дж (таблица 3.3).

Следовательно, выявлена способность НИЛИ увеличивать регенерирующий потенциал МСК в *in vitro* модели механического повреждения клеточного монослоя. Регенерирующий эффект зависит от длины волны и энергии лазерного излучения.

Таблица 3.3 – Влияние ультрафиолетового лазерного излучения с длиной волны 365 нм и энергией излучения от 0,02 до 4 Дж на восстановление монослоя МСК после механического повреждения

Период наблюдения 24 ч		
Энергия излучения, Дж	Остаточная площадь дефекта, % (M±SD)	P
0 (контроль)	68,1±13,2%	-
0,02	43,5±7,2%*	<0,01
0,1	26,6±4,9%*	<0,01
0,5	67,3±13,1%	>0,05
1	58,9±18,3%	>0,05
2	83,1±9,6%	>0,05
3	96,2±1,1%*	<0,01
4	100%*	<0,01
Период наблюдения 48 ч		
0 (контроль)	24,5±8,1%	
0,02	26,2±6,1%	>0,05
0,1	21,4±7,7%	>0,05
0,5	53,1±9,5%*	<0,01
1	35,7±7,9%	>0,05
2	23,9±10,1%	>0,05
3	83,2±6,3%*	<0,01
4	100%*	<0,01

Примечание - * $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению с культурой клеток без воздействия ультрафиолетового лазера в аналогичный период наблюдения (критерий Стьюдента).

Таким образом, можно заключить, что предварительное облучение монослоя МСК с помощью НИЛИ с длиной волны 635 (красный спектр) и 365 нм (ультрафиолетовый спектр) усиливает регенераторную способность МСК при повреждении монослоя в зависимости от спектра и энергии лазерного излучения.

Пролиферация и миграция клеток усиливается при воздействии лазера с длиной волны 635 нм и энергией излучения 1 и 2 Дж. НИЛИ красного спектра с энергией излучения до 0,5 Дж не влияет на способность клеток восстанавливать повреждение клеточного монослоя, а использование НИЛИ как красного, так и ультрафиолетового спектра с энергией излучения 4 Дж полностью ингибирует регенерацию монослоя МСК после механического повреждения.

3.3 Пролиферативный потенциал мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при воздействии кислой (рН 5.0) и щелочной среды (рН 8.0), как экспериментальной модели клеточного поведения в условиях острого и хронического воспаления *in vitro*

Следующий экспериментальный этап исследований *in vitro* был посвящен определению пролиферативного потенциала МСК жировой ткани при воздействии кислой (рН 5.0) и щелочной среды (рН 8.0), как экспериментальной модели клеточного поведения в условиях острого и хронического воспаления.

Рост МСК в культуральной среде с нейтральным рН (рН 7,0) характеризуется увеличением как количества, так и размера клеток. Установлено, что количество адгезированных на пластике МСК жировой ткани увеличивается на 78 и 122% на вторые и третьи сутки культивирования, соответственно, по сравнению с первыми сутками культивирования (рисунок 3.5А). Со временем клетки распластаются, так, что размер клеток увеличивается на 46 и 139% на вторые и третьи сутки культивирования, соответственно, по сравнению с первыми сутками культивирования (рисунок 3.5Б).

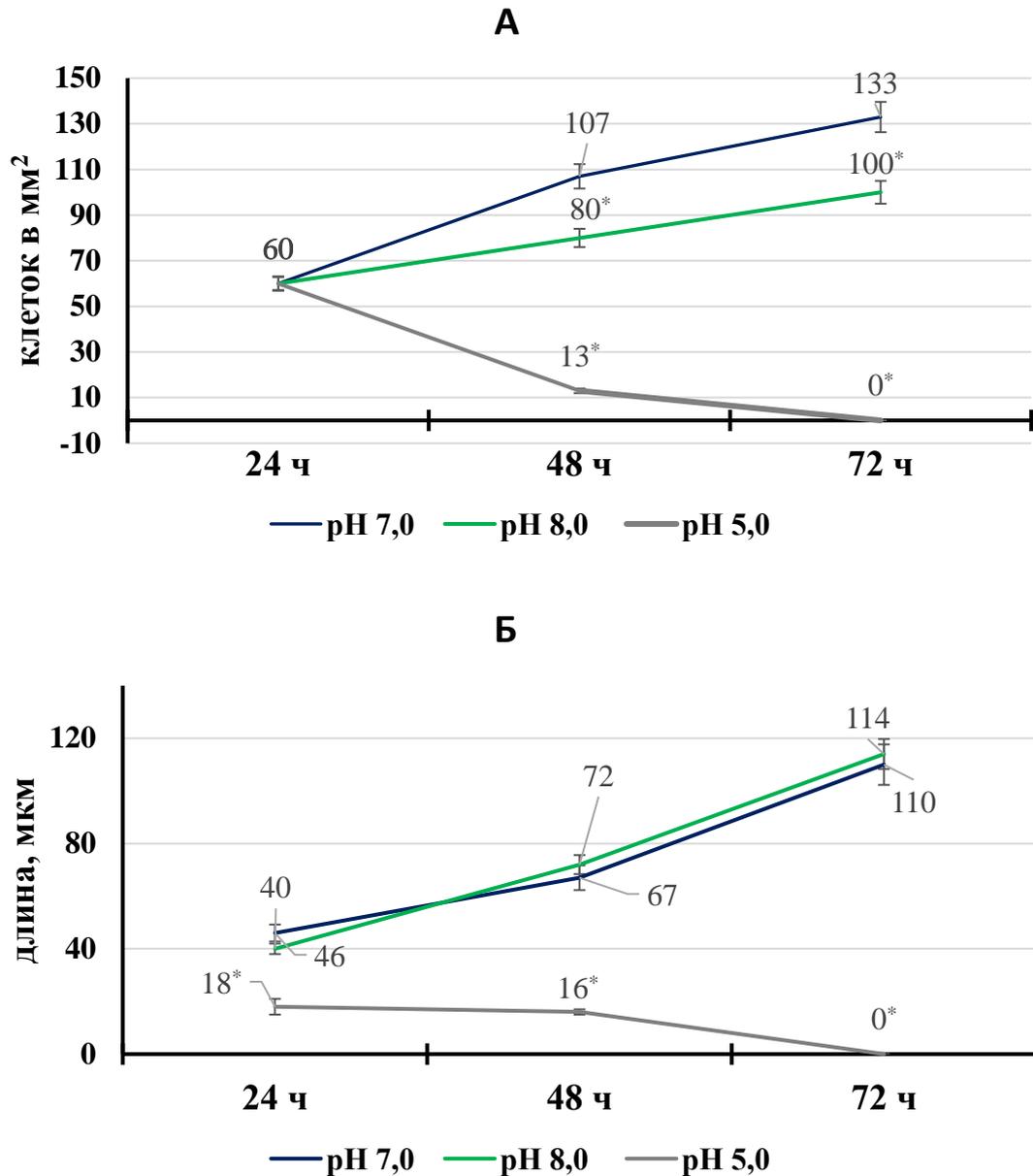


Рисунок 3.5 - Динамика развития культуры МСК в ростовой среде при pH 7,0, 5,0 и 8,0. А и Б – количество и размер адгезированных клеток в течение трех суток культивирования. * - достоверность ($p < 0,05$) согласно критерию Стьюдента при сравнении с pH 7,0.

Согласно данным цитометрического исследования более 90% клеток являются жизнеспособными через 72 часа культивирования при pH 7,0, тогда как количество некротических и апоптических клеток не превышает 10% клеточной популяции (рисунок 3.6А). При этом 95% клеток находится в фазе G0/G1, 4% в S фазе и 1 % в G2 фазе клеточного цикла (рисунок 3.6Б).

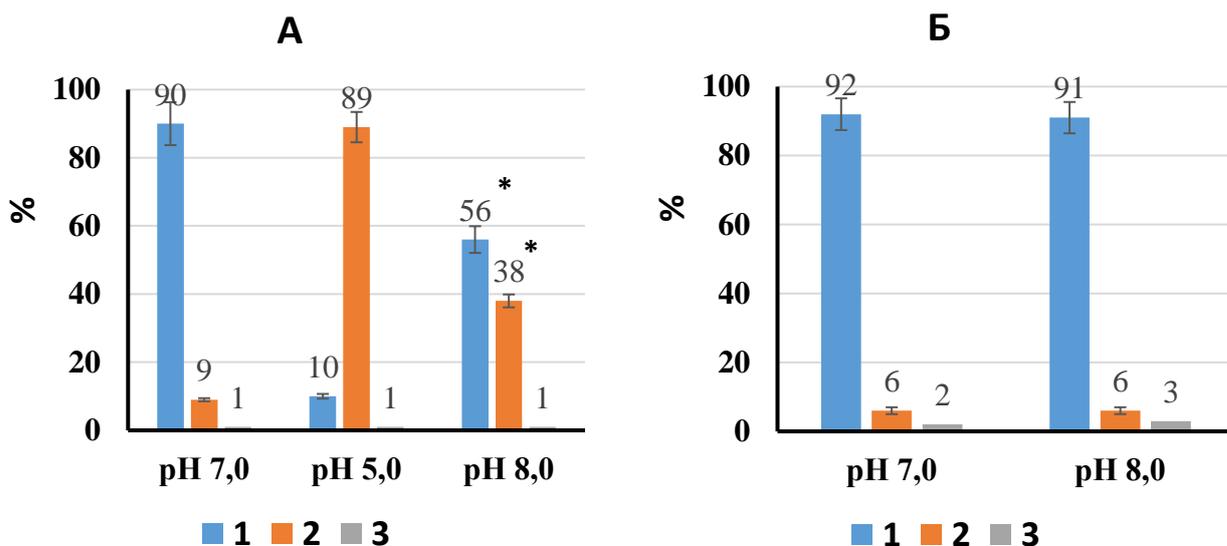


Рисунок 3.6 – Функциональное состояние МСК через 72 ч культивирования в ростовой среде при рН 7,0, 5,0 и 8,0.

Примечание:

А - количество живых (1), некротических (2) и апоптических (3) клеток.

Б - количество клеток в G0/G1 (1), S (2) и G2 (3) фазе клеточного цикла.

* - достоверность ($p < 0,05$) согласно критерию Стьюдента при сравнении с рН 7,0.

Установлено, что пролиферативная способность и жизнеспособность МСК существенно снижаются при закислении культуральной среды до рН 5,0. Начиная с первых часов культивирования клетки приобретают шарообразную форму и открепляются от пластика. В результате количество клеток не увеличивается как при культивировании при рН 7,0, а, напротив, снижается в 4,6 раза через 48 ч по сравнению с количеством клеток через 24 ч культивирования (рисунок 3.5А). При этом размер клеток со временем уменьшается так, что клетки становятся меньше в 2,6 и 4,2 раза, чем при культивировании при рН 7,0 через 24 и 48 ч, соответственно (рисунок 3.5Б). Клеточный монослой практически полностью погибает к третьим суткам культивирования при рН 5,0 - количество жизнеспособных клеток не превышает 10%, тогда как количество некротических клеток составляет 89% (рисунок 3.6А). Предельно малое количество клеток, оставшихся адгезированными

на пластике через 72 ч культивирования при pH 5,0, исключило возможность определения фаз клеточного цикла.

Установлено, что пролиферативная способность и жизнеспособность МСК снижаются при защелачивании культуральной среды до pH 8,0. Количество клеток, культивируемых при pH 8,0, увеличивается в меньшей степени, чем в среде с pH 7,0, так что прирост составляет 33 и 67% на вторые и третьи сутки, соответственно, по сравнению с первыми сутками культивирования (рисунок 3.5А). При этом, размер клеток, свидетельствующий об их распластывании, увеличивается в степени, сходной с таковой при культивировании монослоя при pH 7,0 (рисунок 3.5Б). Цитометрический анализ выявил, что только 56% клеток остаются жизнеспособными через 72 часа культивирования при pH 8,0, тогда как количество некротических и апоптических клеток достигает 38 и 6% клеточной популяции, соответственно (рисунок 3.6А). Различия в фазах клеточного цикла у МСК, культивируемых при pH 7,0 и 8,0, не выявлены (рисунок 3.6Б).

Репрезентативные фотографии монослоя МСК в течение трех суток культивирования при pH 7,0, 5,0 и 8,0 представлены на рисунках 3.7-3.9. Фотографии иллюстрируют отсутствие (рисунок 3.7), наличие единичных (рисунок 3.8) и преобладание погибших клеток (рисунок 3.8) через 72 ч культивирования в среде с pH 7,0, 5,0 и 8,0, соответственно.

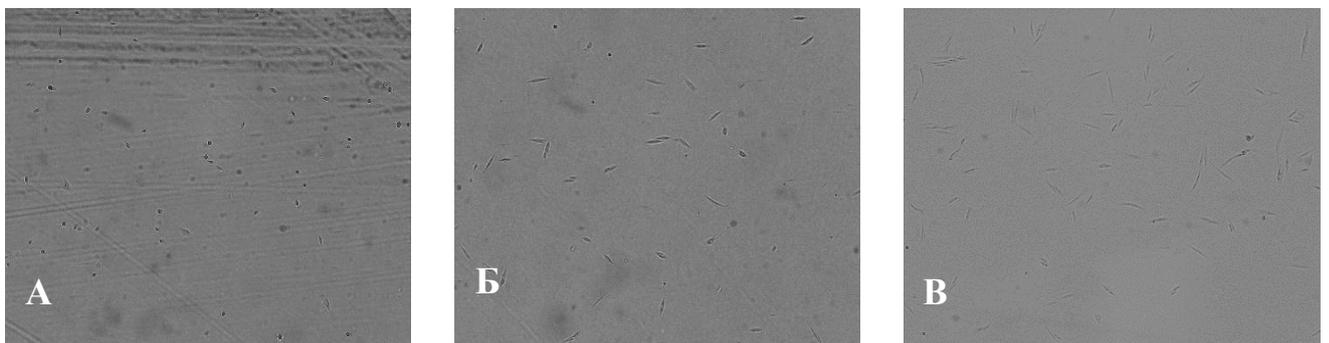


Рисунок 3.7 - Рост МСК в течение 24 (А), 48 (Б) и 72 (В) ч культивирования при pH 7,0. Световая микроскопия. Увеличение $\times 50$.



Рисунок 3.8 - Рост МСК в течение 24 (А), 48 (Б) и 72 (В) ч культивирования при рН 5.0. Световая микроскопия. Увеличение $\times 50$.

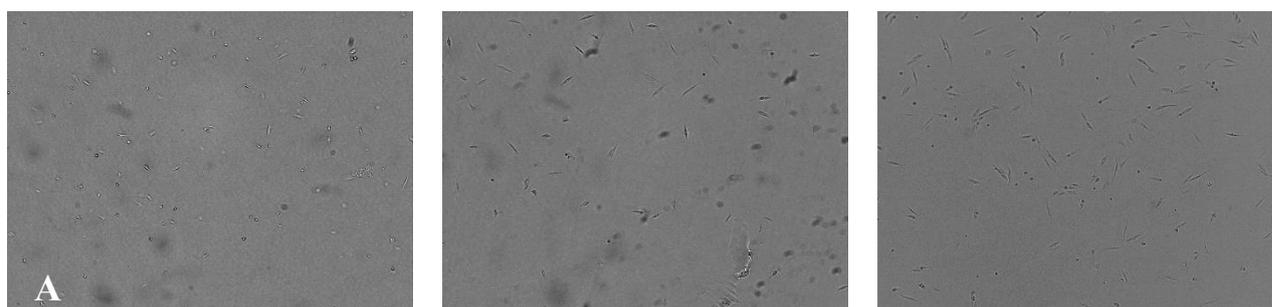


Рисунок 3.9 - Рост МСК в течение 24 (А), 48 (Б) и 72 (В) ч культивирования при рН 8.0. Световая микроскопия. Увеличение $\times 50$.

Таким образом, пролиферация и жизнеспособность МСК снижаются при сдвиге рН культуральной среды в кислую (рН 5,0) или щелочную (рН 8,0) сторону. Агрессивное воздействие закисления или защелачивания среды далее рассматривается как модель повреждения клеточной культуры при остром или хроническом воспалении, соответственно.

3.4 Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения красного и ультрафиолетового спектра на пролиферативную активность и жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в экспериментальной *in vitro* модели острого и хронического воспаления

Исследована способность НИЛИ красного (длина волны 635 нм) и ультрафиолетового (длина волны 365 нм) спектра повышать пролиферативную

активность и жизнеспособность МСК при культивировании в среде с рН 7,0, 5,0 и 8,0, как модели острого и хронического воспаления.

Установлено, что облучение красным лазером стимулирует пролиферативную активность МСК, культивируемых в ростовой среде с нейтральным рН (рН 7,0). Так, количество адгезированных клеток в облученной культуре превышает таковое в необлученной культуре через 72 ч (рисунок 3.10А). Облучение красным лазером не влияет на динамику распластывания клеток, культивируемых при рН 7,0 (рисунок 3.10Б). Обнаружено, что облучение красным лазером не влияет на клеточный цикл - 96, 3 и 1% клеток находилось в G0/G1, S и G2 фазе, что соответствует клеточному циклу необлученных клеток.

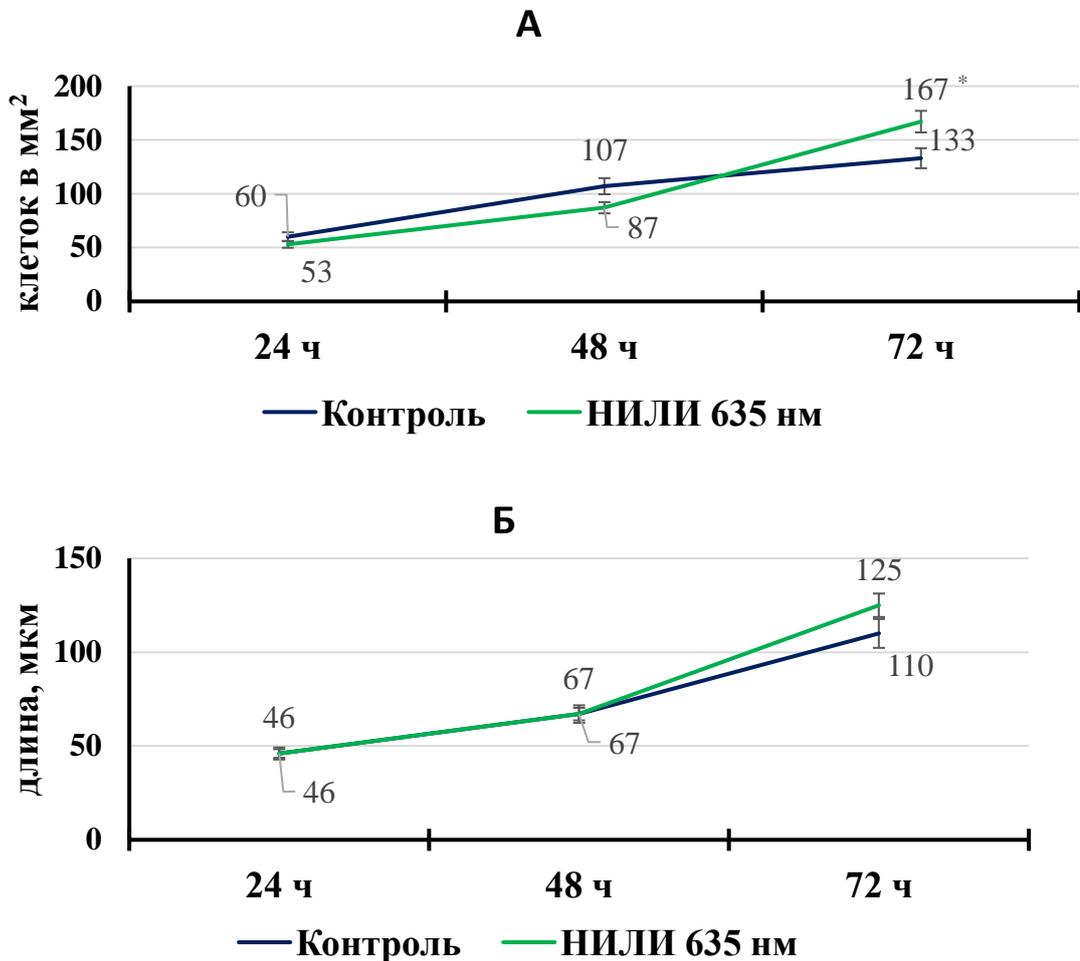


Рисунок 3.10 – Влияние облучения НИЛИ с длиной волны 635 нм (красный лазер) на количество (А) и размеры (Б) МСК при культивировании в среде с рН 7,0. Примечание: * - достоверность ($p < 0,05$) согласно критерию Стьюдента при сравнении с контролем (К).

Обнаружено, что облучение красным лазером защищает МСК, от повреждения, вызванного защелачиванием культуральной среды до рН 8,0. При этом протективный эффект НИЛИ с длиной волны 635 нм начинает проявляться ко вторым суткам, становясь наиболее выраженным через 72 ч культивирования. Показано, что после облучения количество клеток, адгезированных на пластике в течение 72 ч при рН 8,0, увеличивается практически вдвое (на 94% $p=0,021$) по сравнению с необлученной культурой клеток (рисунок 3.11А). Размер клеток, адгезированных на пластике в течение 72 ч при рН 8,0, превышает на 27% размер клеток, не подвергнутых облучению (рисунок 3.11Б).

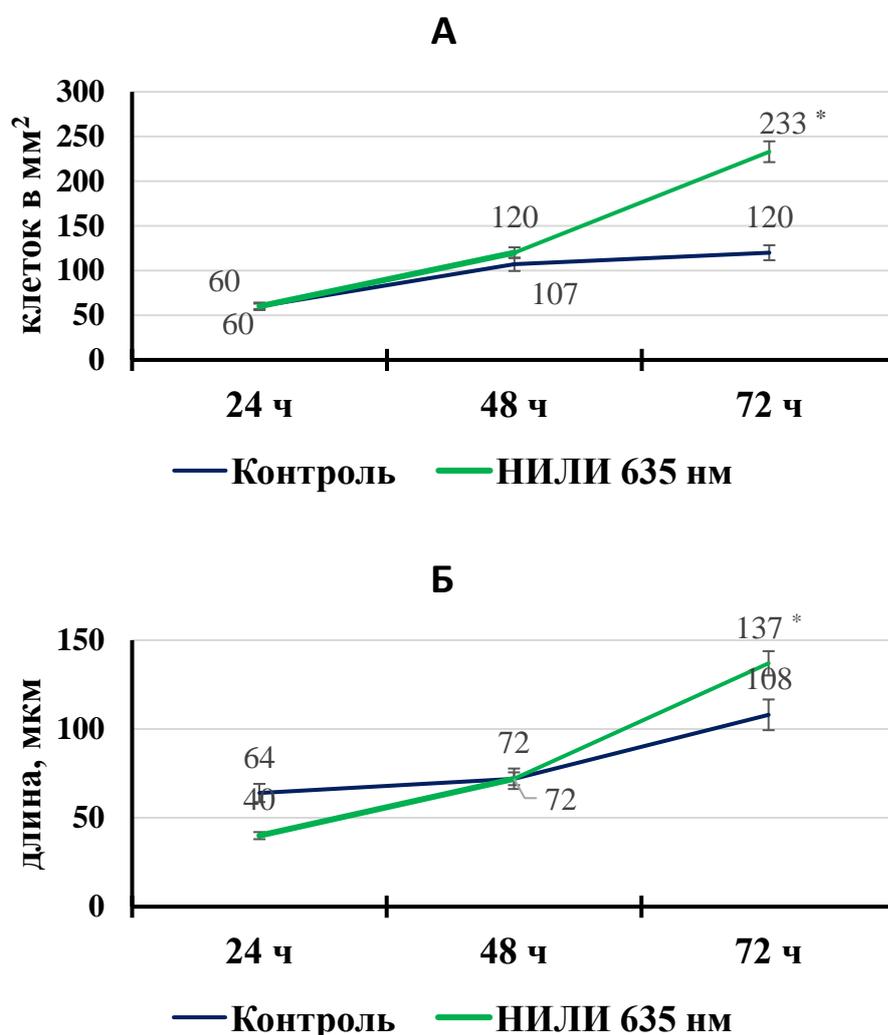


Рисунок 3.11 – Влияние облучения НИЛИ с длиной волны 635 нм (красный лазер) на количество (А) и размеры (Б) МСК при культивировании в среде с рН 8,0. * - достоверность ($p<0,05$) согласно критерию Стьюдента при сравнении с контролем (К).

Таким образом, установлено, что облучение красным лазером не предотвращает гибель МСК, вызванную закислением культуральной среды до pH 5,0. Адгезированные клетки практически отсутствуют уже через 48 ч культивирования при pH 5,0.

Цитометрический анализ выявил, что количество живых клеток через 72 ч культивирования выше на 40% в клеточной культуре, облученной красным лазером, по сравнению с необлученной культурой (рисунок 3.12А). В результате облучения количество некротических клеток в культуре снижается в 2,4 раза, тогда как количество апоптических клеток не изменяется. Клеточный цикл МСК не изменяется после облучения красным лазером (рисунок 3.12Б).

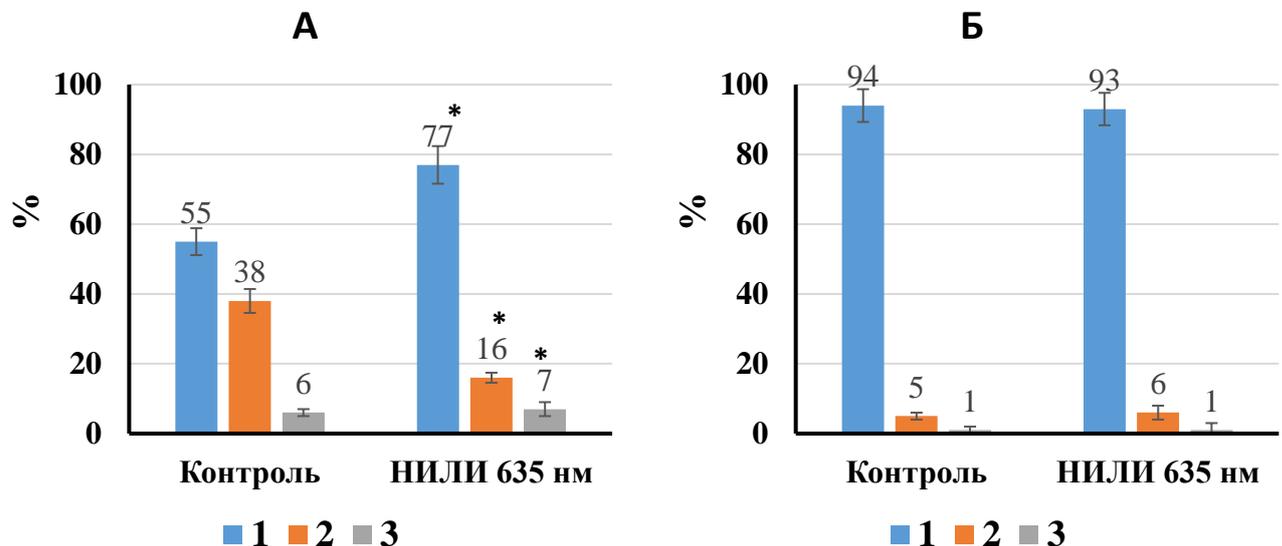


Рисунок 3.12 – Влияние облучения НИЛИ с длиной волны 635 нм (красный лазер) на функциональное состояние МСК через 72 ч культивирования в ростовой среде при pH 8,0.

А - количество живых (1), некротических (2) и апоптических (3) клеток.

Б - количество клеток в G0/G1 (1), S (2) и G2 (3) фазе клеточного цикла.

* - достоверность ($p < 0,05$) согласно критерию Стьюдента при сравнении с контролем (К).

Установлено, что облучение НИЛИ с длиной волны 365 нм (ультрафиолетовый лазер) не влияет значимо на динамику роста числа клеток и их

распластывание в культуральной среде с нейтральным рН (рН 7,0), что указывает на отсутствие негативного влияния лазерного облучения на клеточную культуру. Количество МСК увеличивается на 51 и 89% на вторые и третьи сутки культивирования, соответственно, по сравнению с первыми сутками культивирования (рисунок 3.13А). Размер клеток, облученных ультрафиолетовым лазером, увеличивается на вторые и третьи сутки культивирования по сравнению с первыми сутками культивирования в сходной степени с увеличением размера необлученных клеток (рисунок 3.13Б).

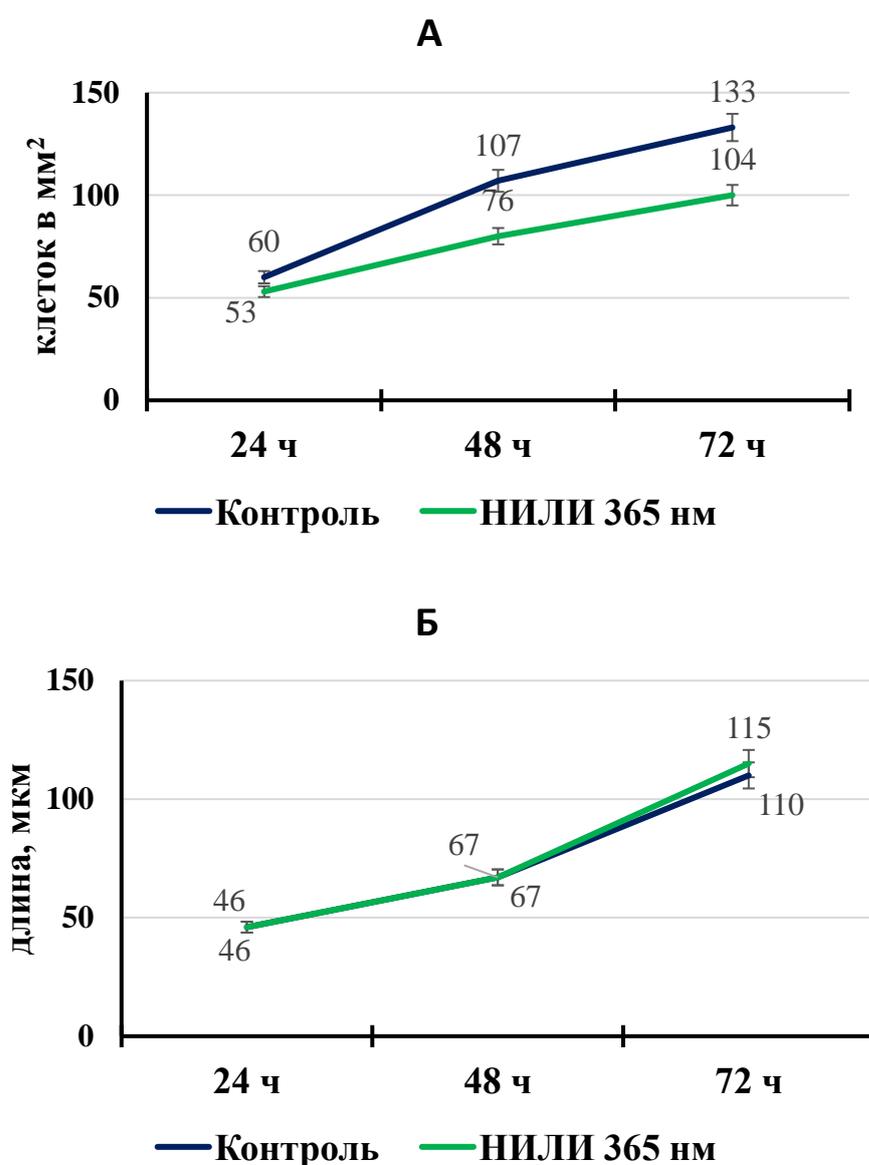


Рисунок 3.13 – Влияние облучения НИЛИ с длиной волны 365 нм (ультрафиолетовый лазер) на количество (А) и размеры (Б) МСК при культивировании в среде с рН 7,0.

Следовательно, обнаружено, что облучение ультрафиолетовым лазером не влияет на клеточный цикл - 97, 2 и 1% клеток находилось в G0/G1, S и G2 фазе, что соответствует клеточному циклу необлученных клеток.

Следующий эксперимент показал, что облучение ультрафиолетовым лазером защищает МСК, от повреждения, вызванного защелачиванием культуральной среды до рН 8,0. При этом протективный эффект НИЛИ с длиной волны 365 нм проявляется в первые сутки культивирования. Показано, что после облучения количество клеток, адгезированных на пластике в течение 24 ч при рН 8,0, увеличивается на 55% (рисунок 3.14А). Размер клеток адгезированных на пластике в течение 24 ч при рН 8,0, превышает на 60% размер клеток, не подвергнутых облучению (рисунок 3.14Б). Однако, как количество, так и размер клеток после облучения не отличаются достоверно от таковых необлученных клеток на вторые и третьи сутки культивирования.

Таким образом, установлено, что облучение ультрафиолетовым лазером не предотвращает гибель МСК, вызванную закислением культуральной среды до рН 5,0. Уже в первые часы культивирования облученные клетки, также как необлученные, приобретают шаровидную форму и открепляются от пластика, так что только 6-8 клеток на 1 мм² поверхности остаются адгезированными через 48 ч культивирования. Культура клеток полностью погибает к 72 ч культивирования. В этой связи выявление живых и апоптических клеток, а также определение фаз клеточного цикла не представляется возможным.

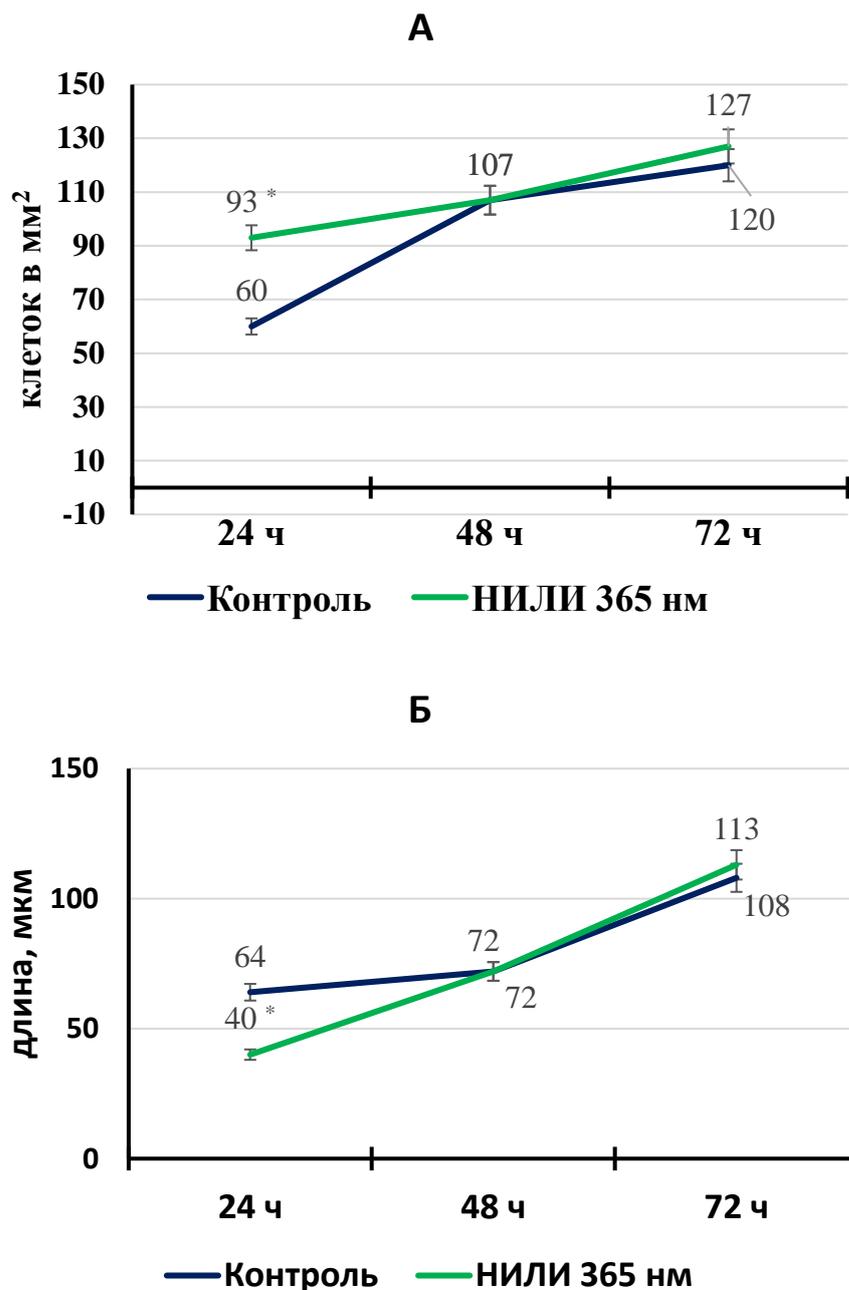


Рисунок 3.14 – Влияние облучения НИЛИ с длиной волны 365 нм (ультрафиолетовый лазер) на количество (А) и размеры (Б) МСК при культивировании в среде с рН 8,0.

Цитометрический анализ выявил, однако, что количество живых клеток выше на 18% в клеточной культуре, облученной ультрафиолетовым лазером, по сравнению с необлученной культурой (рисунок 3.15А). В тоже время, количество апоптических и некротических клеток снижается на 13 и 33%, соответственно, в

результате облучения. Клеточный цикл МСК жировой ткани не изменяется после облучения UV лазером (рисунок 3.15Б).

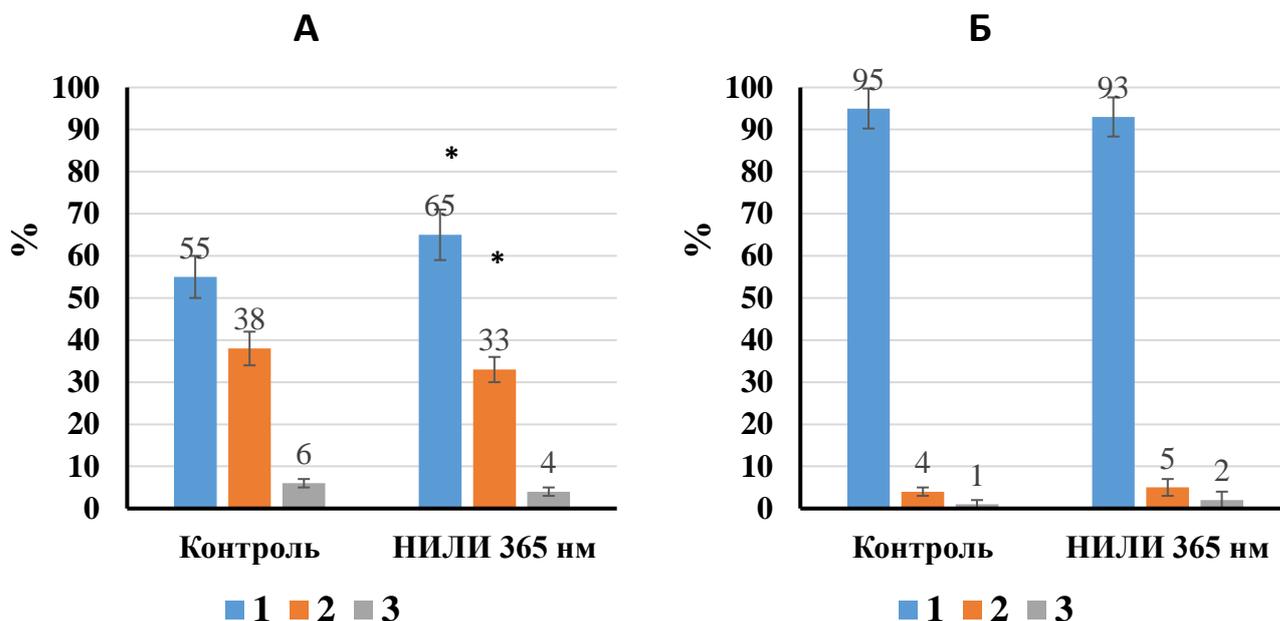


Рисунок 3.15 – Влияние облучения НИЛИ с длиной волны 365 нм (ультрафиолетовый лазер) на функциональное состояние МСК через 72 ч культивирования в ростовой среде при pH 8,0.

А - количество живых (1), некротических (2) и апоптических (3) клеток.

Б - количество клеток в G0/G1 (1), S (2) и G2 (3) фазе клеточного цикла.

* - достоверность ($p < 0,05$) согласно критерию Стьюдента при сравнении с контролем (К).

Таким образом, предварительная обработка клеточной культуры МСК НИЛИ с длиной волны как 635, так и 365 нм, повышает устойчивость клеток к агрессивному воздействию защелачивания культуральной среды, моделирующего тканевую среду при хроническом воспалении. Протективный эффект лазерного облучения с длиной волны 365 нм, по-видимому, имеет временный характер, так как наблюдается только в первые сутки культивирования. Лазерное облучение с длиной волны 635 нм (красный лазер) усиливает пролиферативную активность и жизнеспособность клеток начиная со вторых суток культивирования при pH 8,0. Кроме того, отличием лазерного облучения с длиной волны 635 нм является

способность стимулировать МСК при стандартных условиях культивирования, что не наблюдается после облучения с длиной волны 365 нм. Поэтому, НИЛИ с длиной волны 635 нм (красный лазер) было выбрано для дальнейшего изучения его эффективности в экспериментальной модели термического ожога *in vivo*.

3.5 Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на регенераторную способность стромально-васкулярной фракции в модели тяжелого термического ожога *in vivo*

Для индукции тяжелого термического ожога цилиндрический стакан с кипящей водой прикладывали к депилированному участку кожи крысы в лопаточной области. Через сутки после индукции ожога поверхность ожоговой раны покрывается сухим струпом бурого цвета, округлой формы с ровными краями (рисунок 3.16А). Кровотечение из раны и признаки инфекции отсутствуют, однако по краям повреждения наблюдается локальная гиперемия с отечностью тканей. Данная макроскопическая картина указывает на глубокий ожог 3 степени, при котором происходит поражение всей толщи кожи с частичным некрозом подкожно-жировой клетчатки.



Рисунок 3.16 – Внешний вид области ожоговой раны на спине крысы через одни (А), 10 (Б) и 21 (В) сутки после индукции термического ожога.

Ожоговая рана покрывается струпом с инкапсулированным серозным экссудатом через 10 суток после индукции термического повреждения (рисунок 3.16Б). В прилегающей к ране ткани наблюдается отечность и признаки воспаления. Инкапсуляция серозного экссудата, которая способствует длительному поддержанию воспаления в ране, наблюдается у 70% животных. Геморрагический струп отходит от поверхности раны с незначительным сукровичным отделяемым через 21 день после индукции термического повреждения (рисунок 16В). Отмечается выраженное нарастание грануляционной ткани, происходят процессы краевой эпителизации. В тоже время у 40% животных наблюдается воспаление области раны с гнойным отделяемым, что является признаком начала инфекционного процесса.

Динамика изменения площади повреждения при моделировании тяжелого термического ожога без проведения лечения (далее - группа 1, контроль) представлена на рисунке 3.17.

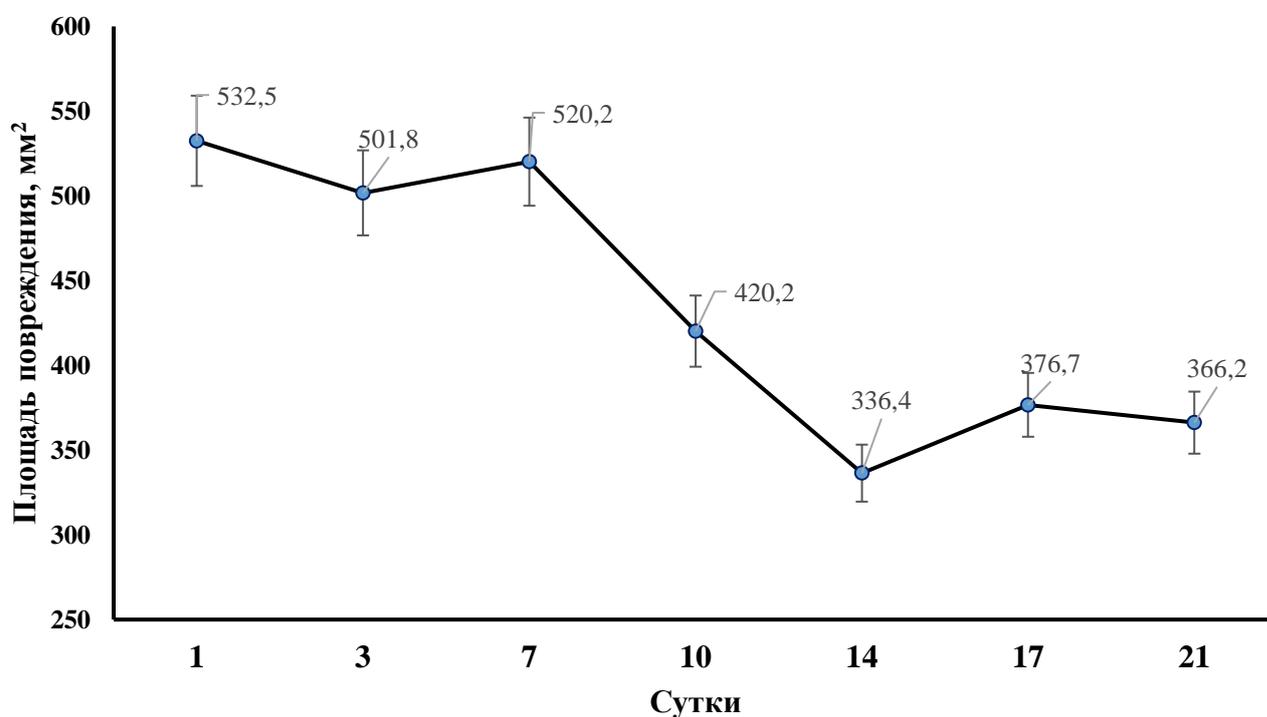


Рисунок 3.17 - Динамика изменения площади повреждения кожного покрова крысы, вызванного тяжелым ожогом. Контрольная группа

Как видно из представленного графика, спонтанное заживление глубокого ожога происходит достаточно медленно. Так, в первую неделю после индукции ожога площадь повреждения практически не изменяется и составляет 520-530 мм². Размер ожоговой раны постепенно снижается в течение следующей недели, так, что площадь повреждения составляет 340 мм² на 14-й день после индукции ожога.

Основным механизмом заживления в данный период, по-видимому, является краевая эпителизация. Далее размер раны не уменьшается вплоть до 21 дня после индукции ожога, предполагая, что хроническое воспаление в глубине раны препятствует заживлению. В группе положительного контроля использовался противомикробное комбинированное средство Диоксометилтетрагидропиримидин + Хлорамфеникол, которым пропитывали марлевую повязку, покрывающую рану (далее – группа 2, положительный контроль). Изучена способность СВФ, полученной из необлученной жировой ткани (далее - группа 3, группа сравнения) и СВФ, полученной из жировой ткани, предварительно облученной НИЛИ с длиной волны 635 нм (далее - группа 4, опыт), ускорять ранозаживление. Образцы СВФ вводили в область повреждения туннельным способом в течение 3 часов после индукции ожоговой травмы.

Внешний вид ожоговой раны не отличается во всех группах через сутки после индукции ожога. В группе положительного контроля, группе сравнения и у опытных животных так же, как у животных в контрольной группе, в месте повреждения образуется геморрагический струп серо-бурого цвета с незначительной отечностью тканей по краям и воспаленной областью вокруг ожоговой раны (рисунок 3.18).

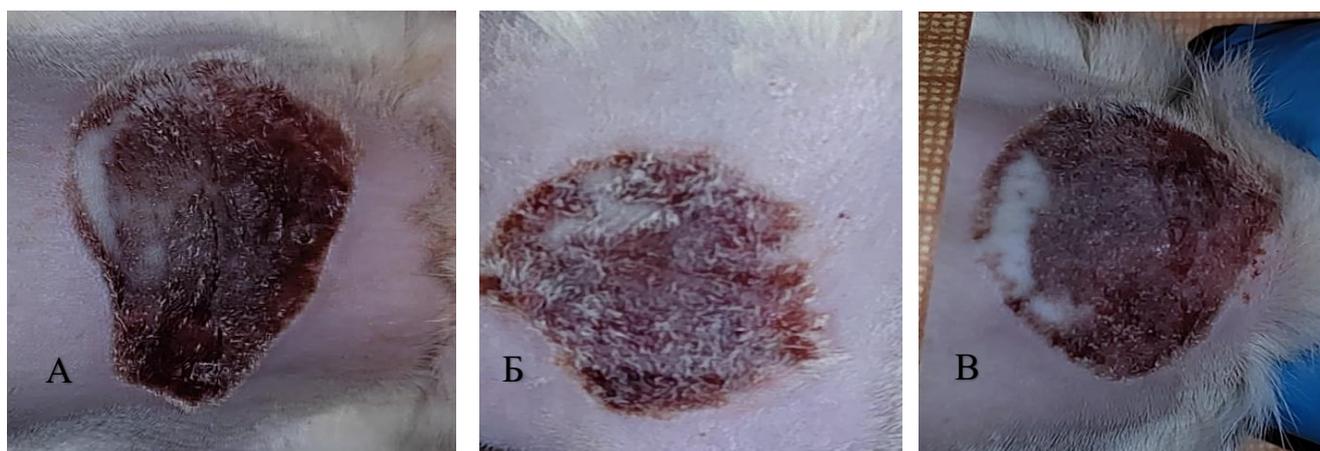


Рисунок 3.18 – Внешний вид ожоговой раны на спине крысы через одни сутки после индукции термического ожога. А, Б и В – группы 2, 3 и 4.

В группе положительного контроля, также как в контрольной группе начальные признаки краевой эпителизации наблюдаются через 10 суток после индукции ожога. Признаки инфекции и некротизированные элементы отсутствуют, однако слабая отечность раны с сукровичным отделяемым наблюдается по центру раневой области (рисунок 3.19А). В группе сравнения и в опытной группе также отсутствуют признаки инфекции, гнойного экссудата и некротизированных элементов (рисунок 3.19Б).

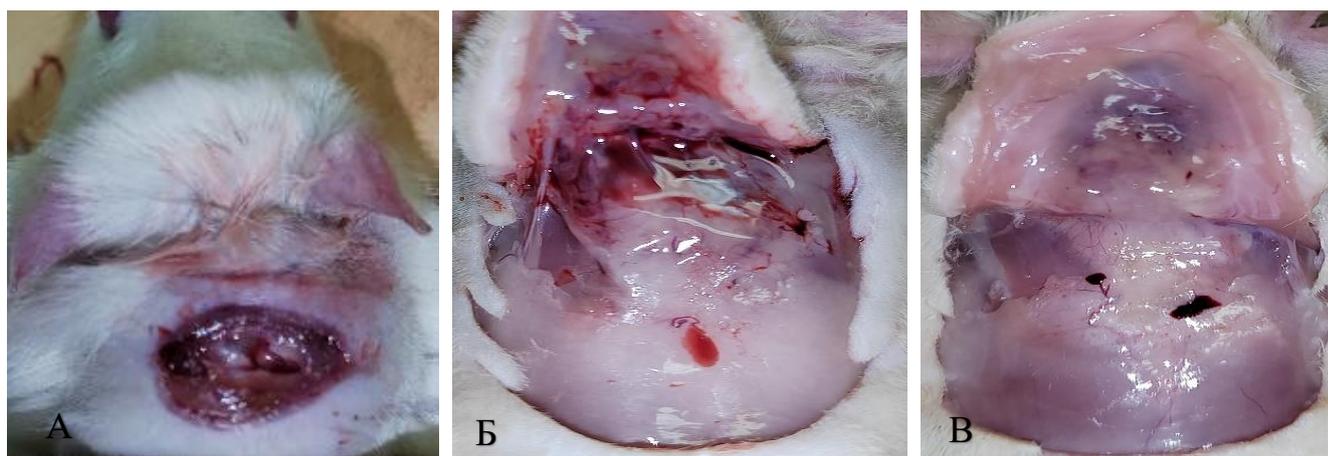


Рисунок 3.19 – Внешний вид ткани под струпом ожоговой раны на спине крысы через 10 суток после индукции термического ожога. А, Б и В – группы 2, 3 и 4.

При этом в группах, получивших лечение стромально-васкулярной фракцией, отмечается восстановление соединительной ткани. Однако если в группе сравнения отмечаются единичные геморрагические элементы и незначительная отечность подлежащей ткани, то в опытной группе отечность тканей минимальна, дно раны представлено грануляционной тканью, визуализируется процесс эпителизации (рисунок 3.19В). Образование волосяных стержней в области ожоговой раны обнаруживается у 40% животных.

Отечность и признаки инфекции отсутствуют у всех животных через 21 сутки после индукции ожога. Несмотря на то, что в группе положительного контроля, по сравнению с контрольной группой отмечается восстановление соединительной ткани в зоне повреждения, процесса полного заживления ожоговой травмы к концу срока наблюдения не происходит (рисунок 3.20А). В группах животных 3 и 4, получивших лечение СВФ, отмечается тенденция к уменьшению площади раны, восстановлению соединительной ткани, отсутствует отечность и признаки инфекции. Внутренние ткани ярко розового цвета с достаточным кровоснабжением для последующего репаративного процесса (рисунок 3.20Б и В). В группе 4 при этом отмечаются визуально здоровые внутренние ткани бело-розового цвета, с восстановленным кровоснабжением (рисунок 3.20В).

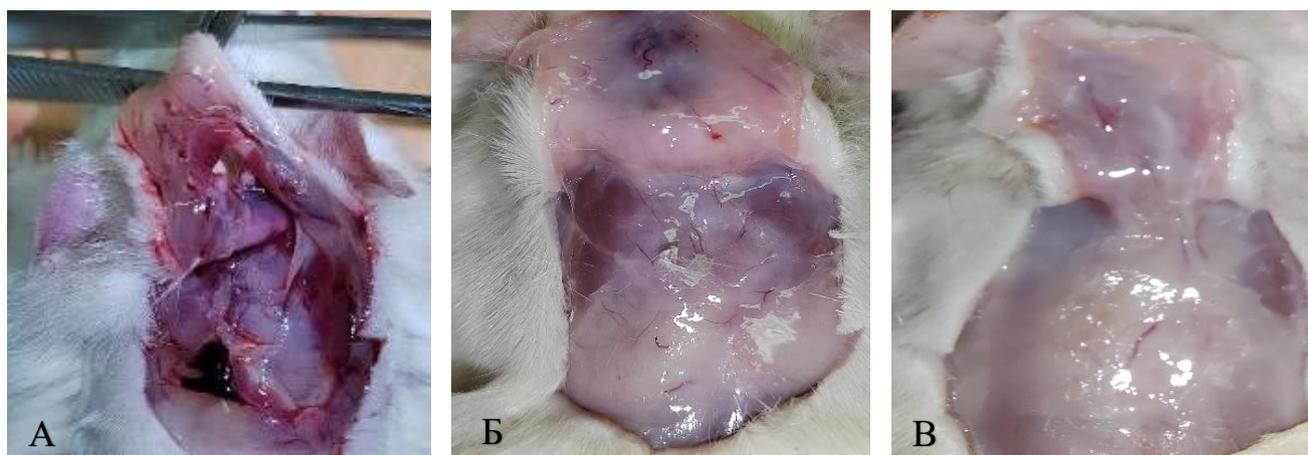


Рисунок 3.20 – Внешний ткани под струпом ожоговой раны на спине крысы через 21 сутки после индукции термического ожога. А, Б и В – группы 2, 3 и 4.

Способность СВФ ускорять заживление ожоговой раны, выявленная при макроскопическом наблюдении подтверждается изменением площади повреждения в течение 21 дня после индукции ожога. Установлено, что начиная с 3-их суток наблюдения уменьшение площади повреждения происходит быстрее в группах, в которых ожог обрабатывался СВФ, чем в контрольной группе или группе положительного контроля (рисунок 3.21).

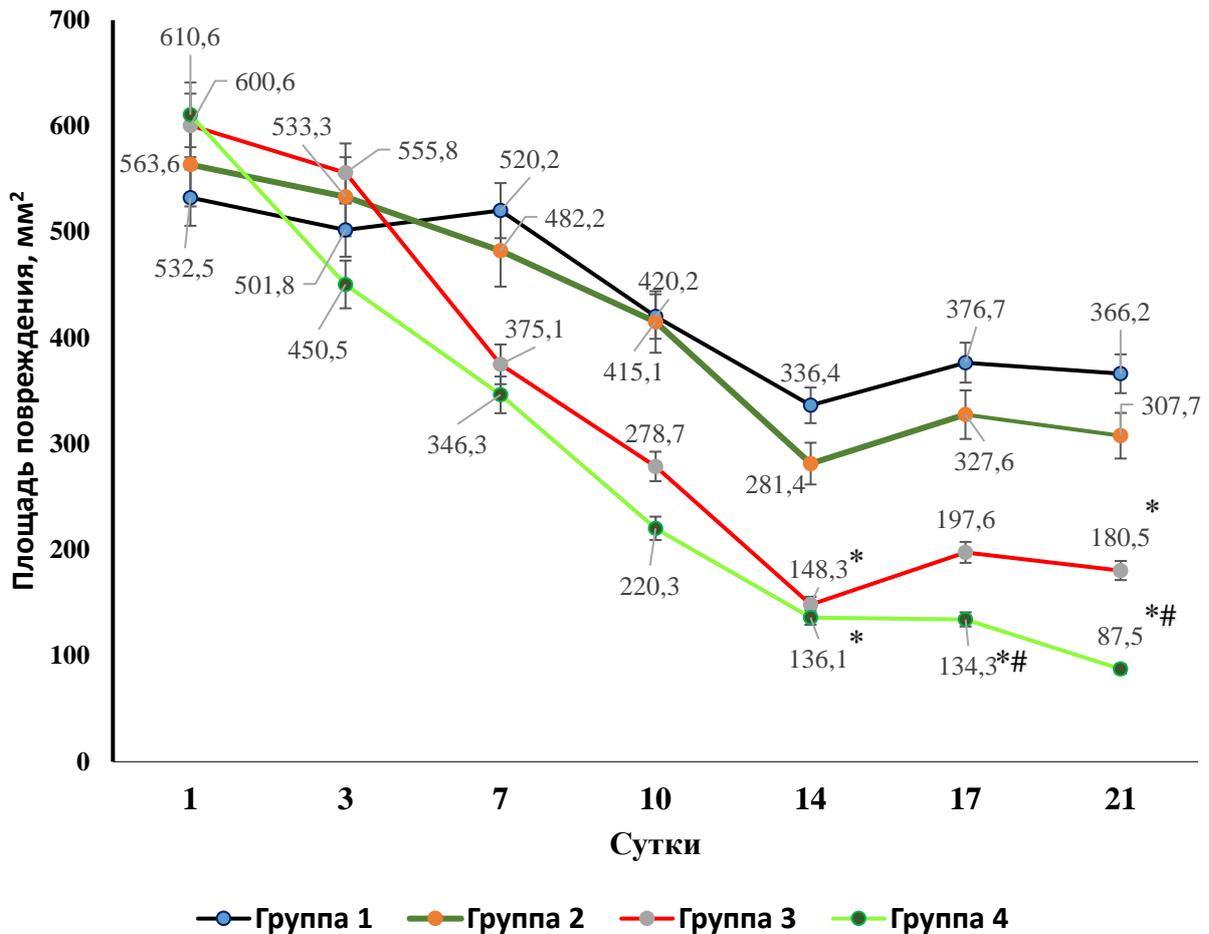


Рисунок 3.21 - Динамика изменения площади повреждения кожного покрова крысы, вызванного тяжелым ожогом группах 1 (контроль), 2 (положительный контроль), 3 (группа сравнения) и 4 (опытная группа).

Примечания: Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение; * - достоверность ($p < 0,05$) согласно критерию Стьюдента при сравнении с контролем и группой сравнения

- достоверность ($p < 0,05$) согласно критерию Стьюдента при сравнении с группой сравнения

Площадь повреждения в группах 3 и 4 была на 23 и 28% меньше, чем в группе 2 через 7 суток после индукции ожога. Через 10 суток наблюдения площадь повреждения в группах 3 и 4 была на 33 и 47% меньше, чем в группе 2. Отличия в эффективности действия облученной НИЛИ и необлученной лазером СВФ проявляются начиная с 17 дня после индукции ожога. Площадь повреждения в группе 4 была на 31% меньше, через 17 суток и на 51% меньше через 21 сутки, чем в группе 3.

Таким образом, результаты исследований *in vitro* показало, что обработка раны в животной модели тяжелого термического ожога с помощью СВФ жировой ткани выявило высокую эффективность НИЛИ с длиной волны 635 нм в усилении регенераторного потенциала СВФ. Применение СВФ, предварительно простимулированной лазерным облучением, уменьшило площадь раневой поверхности к окончанию срока наблюдения (21 сутки) в 2,1 раза ($p=0,039$) и в 3,5 раза ($p=0,017$) при лечении тяжелого ожога у крыс по сравнению с исходной СВФ и противомикробным комбинированным средством Диоксометилтетрагидропиримидин + Хлорамфеникол, соответственно.

Следовательно, обработка ожоговой раны СВФ жировой ткани ускоряет заживление раны, а предварительное облучение НИЛИ с длиной волны 635 нм значительно повышает регенераторный потенциал СВФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы достигнут значительный прогресс в разработке новых подходов к терапии широкого спектра заболеваний с использованием клеточных технологий, благодаря внедрению результатов передовых научных исследований в область молекулярной и клеточной биологии, биотехнологии и генетики в медицинскую практику [47]. При выборе источника клеточного материала, предназначенного для клинического применения, основными критериями являются доступность биоматериала, а также возможность получения достаточного количества клеток для последующей аутологичной трансплантации. До недавнего времени для клеточной терапии использовались, главным образом, МСК, полученные из ткани костного мозга, где они и были впервые идентифицированы [66]. Помимо костного мозга, МСК, а также клетки со свойствами МСК, были также выделены из целого ряда тканей взрослого организма, включая периферическую кровь, скелетные мышцы, синовиальную оболочку, амниотическую жидкость, плаценту, жировую ткань [59, 82, 152, 163]. Однако, несмотря на возможность выделения МСК из множества тканей взрослого человека, достаточное количество аутологичных МСК, пригодных для клинического использования, можно получить, главным образом, из костного мозга и жировой ткани. При этом, процедура получения аспирата костного мозга традиционным способом является достаточно болезненной инвазивной процедурой, требующей применения анестезии. Также было показано, что количество, жизнеспособность и дифференцировочный потенциал стволовых клеток костного мозга существенно снижаются с возрастом человека, в связи с чем задача по поиску альтернативных источников получения аутологичного клеточного материала для трансплантации остается актуальной [138]. Поэтому в качестве одного из таких источников материала для клеточной терапии все более

широко используется жировая ткань человека, благодаря возможности получения достаточного объема биоматериала малоинвазивным способом.

Область применения клеточных продуктов жировой ткани в клинике достаточно обширна. Применение клеточных продуктов жировой ткани направлено на ремоделирование, замещение или восстановление функционирования поврежденных тканей [17,27]. При этом, наиболее перспективным и востребованным источником МСК жировой ткани является СВФ, что обусловлено ее доступностью, достаточным количеством клеток, менее болезненной процедурой забора и продемонстрированной эффективностью в лечении широкого спектра патологий [74]. СВФ представляет собой гетерогенную клеточную популяцию клеток, состоящую из гладкомышечных и иммунных клеток, преадипоцитов, эндотелиальных клеток и стволовых клеток, перицитов и МСК [38]. В многочисленных исследованиях продемонстрированы паракринные противоапоптотические, противовоспалительные, проангиогенные и антисклеротические эффекты СВФ жировой ткани [154].

Несмотря на высокий дифференцировочный потенциал, культивируемые МСК имеют относительно невысокую скорость пролиферации; особенно в случае получения аутологичного клеточного материала от пожилых пациентов, или пациентов с разными видами патологии [74]. Кроме того, процесс накопления клеточной массы с целью последующей аутотрансплантации предполагает продолжительное культивирование МСК и большое число пассажей, результатом которого является ослабление пролиферативного потенциала клеток. В связи с этим разработка методов, способных ускорить процесс клеточной пролиферации, является важным шагом для сохранения жизнеспособности клеток. Одним из таких факторов является низкоинтенсивное лазерное излучения, терапевтический эффект которого связывают со стимулирующим эффектом на пролиферацию клеток и усилением регенерации тканей [24].

Лазеротерапия, основанная на применении НИЛИ, широко применяется в современной клинической практике. Разработано и внедрено множество методик, основанных на применении НИЛИ инфракрасного и красного диапазонов для

лечения целого ряда заболеваний, включая болезни сердечно-сосудистой системы, дыхательной системы, центральной и периферической нервной системы, опорно-двигательного аппарата, а также в хирургии, стоматологии, спортивной медицине и косметологии [51]. Используемое в клинической физиотерапии НИЛИ оказывает воздействие на функциональное состояние органов и тканей организма без нарушения их морфологии. Данные литературы свидетельствуют о том, что НИЛИ модулирует физиологические, биохимические и метаболические процессы в клетке, обеспечивая терапевтический пролиферативный и дифференцировочный эффект [51]. Анализ современного состояния проблемы показывает, что комбинированная терапия с использованием аутологичных клеточных продуктов жировой ткани, таких как СВФ и НИЛИ является перспективным направлением в регенеративной медицине. В тоже время ряд вопросов остаются нерешенными, как в отношении получения и свойств СВФ и МСК, так и в отношении технологии лазерной стимуляции регенераторных свойств МСК жировой ткани [16,17].

На основании вышеуказанного, настоящая работа была посвящена усилению регенераторного потенциала СВФ жировой ткани с помощью НИЛИ для разработки технологии комплексного применения клеточной терапии и низкоинтенсивных физических факторов в стимуляции заживления термических ран.

В задачи исследования входили сравнительный анализ эффективности выделения СВФ жировой ткани с помощью ферментативного и механического способа; определение энергии НИЛИ красного и ультрафиолетового спектра, эффективной для стимуляции регенераторного потенциала МСК *in vitro*; разработке экспериментальной *in vitro* модели для оценки пролиферативного потенциала МСК в условиях острого и хронического воспаления; выявлении способности НИЛИ красного и ультрафиолетового спектра повышать пролиферативную активность и жизнеспособность МСК в экспериментальной *in vitro* модели острого и хронического воспаления; оценке эффективности и безопасности применения НИЛИ для усиления регенераторного потенциала СВФ в эксперименте на животной модели термического ожога.

Диссертационная работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. в рамках НИР государственного задания «Разработка инновационной технологии и научное обоснование применения низкоинтенсивных физических факторов для усиления регенераторного потенциала стромально-васкулярной фракции жировой ткани в эксперименте на животной модели термического ожога», № НИОКР 121040100051-7.

Объектом исследования служила жировая ткань, забранная путем липосакции от условно здоровых лиц, поступивших на плановую операцию по липосакции в клинику пластической хирургии. В ходе выполнения работы получено экспериментальное обоснование ферментативного способа выделения СВФ как более эффективного в сравнении с механическим способом, определены дозы НИЛИ красного и ультрафиолетового спектра, эффективные для стимуляции регенераторного потенциала МСК, получены доказательства стимулирующего эффекта НИЛИ на МСК в условиях экспериментальной модели острого и хронического воспаления, а также продемонстрирована эффективность НИЛИ в усилении регенераторного потенциала аутологичной СВФ жировой ткани при лечении термического ожога в животной модели *in vivo*. В совокупности полученные данные являются научным обоснованием для разработки инновационной технологии комплексного применения клеточной терапии и низкоинтенсивных физических факторов в регенеративной медицине.

Выделение СВФ представляет собой критический шаг в извлечении жизнеспособной популяции стволовых клеток для регенераторных целей [53]. Сравнительный анализ двух методов выделения СВФ из жировой ткани выполнен с использованием двух коммерчески доступных систем «Система ЭСВИФ» (ферментативное выделение) и Arthrex ACP SVF (механическое выделение), представляющих собой медицинские изделия, зарегистрированные в Российской Федерации. Установлено, что ферментативное выделение СВФ является более эффективным, так как обеспечивает получение большего количества

жизнеспособных ядродержащих клеток и меньшего количества клеточного дебриса и частиц соединительной ткани. Выявлено, что в среднем $33,6 \pm 6,5\%$ в СВФ представляют МСК, обладающие высоким пролиферативным потенциалом. Кроме МСК в СВФ, выделенной из жировой ткани с использованием ферментативного метода, идентифицированы клетки зрелого эндотелия, эндотелиальные клетки-предшественницы и перициты. Полученные данные о смешанном характере клеточной популяции в СВФ согласуются с другими исследованиями [53]. Важно отметить, что синергизм функциональной активности клеток различных фенотипов в СВФ является критически важным для ее регенераторного потенциала [63]. Кроме более низкого выхода жизнеспособных клеток, механическим способ обработки жировой ткани выявил ряд технических недостатков данного подхода. В частности, обнаружено, что фильтрация конгломераты жировой ткани через фильтр адаптер при механическом получении затруднена, а рекомендуемая процедура для облегчения фильтрации нарушает стерильность образца. На основании полученных данных на последующих этапах исследования использована СВФ, полученная ферментативным способом. Таким образом, проведенное исследование совпадает с представлением о том, что ферментативное расщепление жировой ткани является «золотым стандартом» при выделении МСК [53].

На следующем этапе исследования способность НИЛИ увеличивать регенерирующий потенциал МСК выявлена в модели механического повреждения клеточного монослоя *in vitro*. Показано, что регенерирующий эффект зависит от длины волны и энергии лазерного излучения. Для этого монослой МСК перед повреждением облучали красным (длина волны – 635 нм) или ультрафиолетовым (длина волны - 365 нм) лазером, варьируя энергию излучения от 0,02 до 4 Дж. Обнаружено, что усиление пролиферации клеток происходит при воздействии лазера с длиной волны 635 нм и энергией излучения 1 и 2 Дж. В тоже время, НИЛИ красного спектра с энергией излучения до 0,5 Дж, не влияет на способность клеток восстанавливать повреждение клеточного монослоя, а использование лазера красного спектра с энергией излучения 4 Дж полностью ингибирует регенерацию

монослоя МСК после механического повреждения. Полученные данные согласуются с работами других авторов, продемонстрировавших стимулирующий эффект НИЛИ красного спектра на стволовые клетки [47]. Снижение регенераторного потенциала с увеличением энергии НИЛИ подтверждает данные работы [34]. Регенерирующий эффект ультрафиолетового лазерного излучения на МСК не выявляется через 48 ч после повреждения клеточного монослоя. Регенерация монослоя ингибируется при облучении клеток ультрафиолетовым лазером с энергией излучения 3 и 4 Дж. Ранее действие НИЛИ с длиной волны ультрафиолетового диапазона не изучалось в отношении пролиферативной способности стволовых клеток. Однако, цитотоксический эффект ультрафиолетового облучения хорошо известен [32]. Следует также отметить, что модель механического повреждения клеточного монослоя («скрэтч-тест») ранее не использовалась для изучения влияния НИЛИ на регенераторный потенциал МСК.

Изучен пролиферативный потенциал МСК при воздействии кислой (рН 5.0) и щелочной среды (рН 8.0), как экспериментальной модели клеточного поведения в условиях острого и хронического воспаления *in vitro*. Установлено, что пролиферация и жизнеспособность МСК снижаются при сдвиге рН культуральной среды в кислую (рН 5,0) или щелочную (рН 8,0) сторону. Агрессивное воздействие закисления или защелачивания среды предложено рассматривать как модель повреждения клеточной культуры при остром или хроническом воспалении, соответственно. Обоснованием данной модели является тот факт, что каждая стадия воспалительно-репаративного процесса характеризуется своим значением кислотности раневого ложа.

С помощью предложенной модели закисления или защелачивания культуральной среды исследована способность НИЛИ красного (длина волны 635 нм) и ультрафиолетового (длина волны 365 нм) спектра повышать пролиферативную активность и жизнеспособность МСК в условиях острого и хронического воспаления. Показано, что облучение НИЛИ как красного, так и ультрафиолетового спектра не предотвращает гибель МСК, вызванную закислением культуральной среды до рН 5,0. Полученные данные указывают на то,

что НИЛИ, по-видимому, не является эффективным способом стимулировать МСК на стадии острого воспаления процесса ранозаживления, которая сопровождается снижением кислотности раневого ложа до рН 5,5-6 [132]. Обнаружено, что облучение красным лазером защищает МСК от повреждения, вызванного защелачиванием культуральной среды до рН 8,0. При этом протективный эффект НИЛИ с длиной волны 635 нм начинает проявляться ко вторым суткам, становясь наиболее выраженным через 72 ч культивирования. Показано, что после облучения количество клеток, адгезированных на пластике в течение 72 ч при рН 8,0, увеличивается практически вдвое (+94%) по сравнению с необлученной культурой клеток. Размер клеток, адгезированных на пластике в течение 72 ч при рН 8,0, превышает на 27% размер клеток, не подвергнутых облучению. Различия в клеточных эффектах НИЛИ с разной длиной волны можно объяснить исходя из общих принципов понимания фотобиологического эффекта лазерного излучения, которые основываются на том, что фотохимические превращения, предшествующие фотобиологическим процессам, происходят под действием излучения той длины волны, которая поглощается фотоакцептором в клетке [23].

Полученные данные указывают на то, что НИЛИ с длиной волны 635 нм, является стимулятором активности МСК на стадии хронического воспаления процесса заживления, которая сопровождается повышением кислотности раневого ложа до рН 8,0 [132]. Кроме того, отличием лазерного облучения с длиной волны 635 нм является способность стимулировать МСК при стандартных условиях культивирования (рН 7,0), что не наблюдается после облучения с длиной волны 365 нм. Поэтому, НИЛИ с длиной волны 635 нм (красный лазер) выбрано для дальнейшего изучения эффективности лазеротерапии в экспериментальной модели термического ожога *in vivo*.

В экспериментах *in vivo* показано, что обработка ожоговой раны СВФ жировой ткани ускоряет заживление ожога, а предварительное облучение НИЛИ с длиной волны 635 нм значительно повышает ранозаживляющий потенциал СВФ. Способность СВФ ускорять заживление, выявляется как при визуальном наблюдении за ожоговой раной, так и подтверждается более быстрым

уменьшением площади повреждения в течение 21 дня после индукции ожога. Так, площадь повреждения в группах крыс, получивших лечение СВФ и СВФ, облученной красным лазером, была на 23 и 28% меньше, чем в группе положительного контроля, в качестве которого использовали левомиколь, через 7 суток после индукции ожога. Через 10 суток наблюдения площадь повреждения в этих группах была на 33 и 47% меньше, чем в группе положительного контроля. Отличия в эффективности действия облученной НИЛИ и необлученной лазером СВФ проявляются начиная с 17 дня после индукции ожога. Данная динамика эффекта НИЛИ на заживляющие свойства СВФ *in vivo* соответствует выявленному усилению пролиферативной активности МСК после воздействия лазером в условиях *in vitro*. Таким образом, совокупность результатов тестирования применения НИЛИ на разных экспериментальных моделях служат научным обоснованием для применения НИЛИ в качестве стимулятора регенераторного потенциала СВФ жировой ткани при лечении ран.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в изучении влияния режимов и длительности НИЛИ на регенераторный потенциал СВФ, а также выяснении молекулярных механизмов стимулирующего действия лазерного облучения на МСК жировой ткани.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительная характеристика клеточных продуктов, полученных из жировой ткани при помощи ферментативного и механического методов, показала, что при ферментативном методе обработки выявляется в 9,34 раза больше количества ядродержащих клеток на 1 мл жировой ткани ($p=0,0071$), в 2,83 раза более высокая жизнеспособность ($p=0,00099$) и в 9,93 раза большее общее количество ядродержащих клеток в 1 мл липоасpirата ($p=0,0057$), следовательно ферментативная обработка жировой ткани является оптимальным способом получения клеточного продукта жировой ткани – стромально-васкулярной фракции с большим выходом ядродержащих клеток и высоким пролиферативным потенциалом регенеративных клеток.

2. При воздействии низкоинтенсивным лазерным излучением красного спектра с длиной волны 635 нм и энергией излучения 1 и 2 Дж отмечается достоверно значимое ($p<0,01$) стимулирование пролиферации клеток к 48 часам эксперимента, в то время как облучение низкоинтенсивным лазерным излучением ультрафиолетового спектра с длиной волны 365 нм с энергией излучения 0,02 и 0,1 Дж достоверно значимо ($p<0,01$) увеличивает скорость восстановления клеточного монослоя после повреждения через 24 часа, однако к 48 часам эксперимента данный эффект нивелируется ($>0,05$).

3. Культивирование регенеративных клеток в условиях хронического воспаления (в среде с $pH=8,0$) приводит к снижению жизнеспособности клеток на 40% по сравнению с контролем через 72 часа эксперимента, в то время как культивирование клеток в условиях острой воспалительной реакции (в среде с $pH=5,0$) вызывает гибель 100% клеток уже через 48 часов эксперимента, следовательно условия, имитирующие модель хронического воспаления, в большей степени подходят для исследований регенераторного потенциала стромально-васкулярной фракции жировой ткани.

4. После облучения низкоинтенсивным лазерным излучением красного спектра с длиной волны 635 нм и энергией излучения 1 Дж существенно повышает количество регенеративных клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани, адгезированных на пластике в течение 72 ч при кислотности среды $\text{pH}=8,0$, увеличивается на 94% по сравнению с необлученной культурой клеток ($p=0,021$), что указывает на то, что использование данных параметров низкоинтенсивного лазерного излучения способствует стимулированию пролиферативного потенциала и жизнеспособности культуры клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани в модели хронического воспаления.

5. Предварительное облучение стромально-васкулярной фракции низкоинтенсивным лазерным излучением с длиной волны 635 нм и плотностью энергии излучения 1 Дж/см^2 приводит к ускорению заживления поврежденной ткани у лабораторных животных, вызванной глубоким термическим ожогом: через 21 сутки эксперимента площадь раневой поверхности уменьшилась в 2,1 раза по сравнению с нативной стромально-васкулярной фракцией ($p=0,039$) и в 3,5 раза по сравнению с противомикробным комбинированным средством, содержащим диоксометилтетрагидропиримидин и хлорамфеникол ($p=0,017$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для стандартизированного протокола получения стромально-васкулярной фракции с высоким выходом жизнеспособных ядросодержащих регенеративных клеток человека рекомендуется использовать ферментативный метод получения клеточного продукта жировой ткани, состоящий из 30 минутной обработки коллагеназой I типа при 37°C , последующей фильтрации через 100μ фильтр-сито и 3-х этапной отмывки в PBS.

2. Для стимулирования регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток человека рекомендуется использовать низкоинтенсивный лазер красного спектра (длина волны 635 нм) с плотностью энергии 1 Дж/см^2 .

3. Для оценки физиологических изменений в тканях, происходящих при заживлении ожоговых ран, рекомендуется использовать клеточную модель хронического воспаления путем изменения pH ростовой среды до 8,0.

4. Для стимулирования репаративных процессов, снижения воспалительной реакции и формирования грануляционной ткани на животной модели термического ожога рекомендуется использовать стромально-васкулярную фракцию жировой ткани с предварительным воздействием низкоинтенсивным лазерным излучением красного спектра (длина волны 635 нм) с плотностью энергии 1 Дж/см^2 .

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

In vitro – исследования на клеточной модели

In vivo – исследования на животной модели

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's medium – среда Игла модифицированная
Дульбекко

DT – doubling time – время удвоения клеточной популяции

Дж – джоуль

Ил – интерлейкин

НИЛИ – низкоинтенсивное лазерное излучение

СВФ – стромально-васкулярная фракция

СКЖТ – стволовые клетки жировой ткани

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, А.А. Оптимизация результатов восстановления кожных покровов у больных с глубокими ожогами / А.А. Алексеев, В.В. Кожемякина, Н.Б. Малютина, А.Э. Бобровников // Лечение и профилактика. -2020.- Т. 10. №1. - С. 73-79
2. Арипова, Т.У., Применение мезенхимальных стромальных/стволовых клеток человека для иммуномодулирующей терапии (обзор) / Т.У. Арипова, А.Ж. Жангаворов, Ж.Ж. Рамзиддинов, З.Ш. Азизова, А.В. Дубровченко // Журнал теоретической и клинической медицины. - 2024.- № 1. - С. 9-11.
3. Бергер, А.Б. Актуальность использования методов аппаратной физиотерапии в комплексе с лечебной физкультурой в реабилитации тяжелобольных пациентов после перенесенного острого нарушения мозгового кровообращения / А.Б. Бергер, А.Д. Фесюн, Т.В. Кончугова, Д.С. Ермаков // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. - 2024. - Т. 101. № 3-2. - С. 46
4. Бехало, В.А. Иммунорегуляторный и иммунотерапевтический потенциал мезенхимальных стволовых/ стромальных клеток: перспективы и проблемы / В.А. Бехало, Ю.Ф. Горская, В.Г. Нестеренко // Иммунология. - 2024. - Т. 45. № 3. - С. 385-395.
5. Бобков, Д. Е. Клеточные и молекулярные характеристики репликативного старения мезенхимных стволовых клеток человека / Д. Е. Бобков, Г. Г. Полянская // Цитология. – 2020. - Т. 62. № 11. - С. 782-792
6. Богданов, С.Б. Особенности раннего хирургического лечения пациентов с глубокими ожогами с применением биологических раневых покрытий. / С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, И.М. Афанасов, М.Л. Муханов, С.Л. Зайцева, В.С. Дутов // Инновационная медицина Кубани. – 2024. – Т.9. №3. –С.54–60
7. Винокуров, И.А. Современные аспекты фото- и лазеротерапии при лечении раневой инфекции в хирургической практике. / И.А. Винокуров, Д.Г. Тагабилев,

Н.Б. Корчажкина, А.А. Михайлова, К.В. Котенко, О.В. Боголепова // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2024. – Т.12. №2. - С.134-138.

8. Гильмутдинова, И.Р. Экспериментально-морфологическое обоснование применения биоматериала на основе нативной гиалуроновой кислоты при глубоких локальных ожогах кожи: дис. ... канд. мед. наук: 03.03.04 / Гильмутдинова Ильмира Ринатовна. – Самара, 2015. – 177 с.

9. Гончаров, А.Г. Оценка продукции ростовых факторов, про- и противовоспалительных цитокинов постнатальными ммск из различных тканевых источников в условиях их *in vitro* сокультивирования с иммуноизолированными β -клетками поджелудочной железы. / А.Г. Гончаров, В.В. Шуплецова, Н.М. Тодосенко, Е.А. Гончарова, Л.С. Литвинова // Российский иммунологический журнал. - 2021. - Т. 24. № 4. - С. 477-482.

10. Гончаров, Е.Н. Лечение остеоартрита коленного сустава аутологичной стромально-васкулярной фракцией жировой ткани: обзор зарубежной литературы. / Е.Н. Гончаров, О.А. Коваль, Э.Н. Безуглов, Н.Г. Гончаров, А.Н. Старостенков, А.Е. Никифорова // Восстановительные биотехнологии, профилактическая, цифровая и предиктивная медицина. – 2024. – Т.1. №4. –С.27-37

11. Деев, Р.В. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития / Р.В. Деев, А.А. Исаев, А.Ю. Кочиш, Р.М. Тихилов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 2. № 4. – С. 18–30.

12. Еремин, И.И. Методы выделения стромально-васкулярной фракции жировой ткани. литературный обзор / И.И. Еремин, В.С. Васильев, М.А. Гурба, А.Н. Брико, К.В. Котенко // Пластическая хирургия и эстетическая медицина. - 2023. - № 4-2. - С. 68-75.

13. Зорина, А.И. Актуальный статус биомедицинских продуктов для генной и клеточной терапии рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза (I часть) / А.И. Зорина, В.Л. Зорин, П.Б. Копнин, А.А. Исаев, Н.Е. Мантурова, Р.Т. Абдуллаев, А.Ю. Устюгов // Клиническая дерматология и венерология. - 2025. - Т. 24. № 2. -С. 123-131.

14. Козлова, М.Н. Оценка эффективности хирургического лечения пациентов с обширными ожогами на основе исследования иммунного статуса / М.Н. Козлова, А.А. Алексеев, В.М. Земсков, А.Э. Бобровников, Н.С. Шишкина, А.Н. Куликова, В.С. Демидова, М.С. Соловьева // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. - 2025. - Т. 18. № 1. - С. 9-18.
15. Колошеин, Н.А. Сравнение эффективности способов получения и введения стромально-васкулярной фракции жировой ткани на экспериментальной модели донорской раны у обожженных / Н.А. Колошеин, М.Г. Рябков, М.Н. Егорихина, Л.Б. Тимофеева, П.В. Перетягин, И.Ю. Арефьев // Уральский медицинский журнал. - 2024. - Т. 23. № 1. - С. 24-36.
16. Кончугова Т.В. Эффективность комбинированной лазерной терапии пациентов с трофическими язвами нижних конечностей на фоне хронической венозной недостаточности / Кончугова Т.В., Асхадулин Е.В., Кульчицкая Д.Б. и др. // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. - 2020. - Т. 97. № 5. - С. 45-51.
17. Лебедев В.Г. Трансплантация аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани при тяжелых местных лучевых поражениях кожи, вызванных действием рентгеновского излучения / В.Г. Лебедев, Т.А. Насонова, Ю.Б. Дешевой и др. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. - 2017. - Т. 62. № 1. - С. 5-11.
18. Малиновская, С. Л. Фотобиомодуляция как альтернативный подход к коррекции физиологически измененных состояний живой ткани / С. Л. Малиновская, О. В. Другова, В. В. Борзиков, А. П. Баврина // Медицинский альманах. – 2021. – Т.69. № 4. –С. 6-17
19. Миронов, В.И. Раневой процесс: современные аспекты патогенеза / В.И. Миронов, И.И. Гилёва // Сибирский медицинский журнал. - 2009.- №6. - С. 20-25
20. Миславский О.В. Перспективы применения низкоинтенсивного лазерного излучения в иммунологии / Миславский О.В., Алексеев Ю.В., Федоскова Т.Г., Смирнов В.В., Иванов А.В., Маштакова С.Р. // Российский медицинский журнал. - 2021- №10. –С.63-68.

21. Морозов, А.М. О возможности применения современных раневых покрытий / А.М. Морозов, А.Н. Сергеев, Н.А. Сергеев, В.Н. Захарова, В.В. Патрошкина // Врач. - 2025.- Т. 36. № 1. - С. 51-56.
22. Москвин, С.В. Влияние импульсного низкоинтенсивного лазерного излучения красного (635 нм) и инфракрасного (904 нм) спектров на мезенхимальные стволовые клетки человека *in vitro* / С.В. Москвин, Д.Ю. Ключников, Е.В. Антипов, С.Е. Волчков, О.Н. Киселева // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. -2014. – Т.91. №6. – С. 40-47
23. Нечипуренко, Н.И. Основные механизмы действия и биологические эффекты низкоинтенсивного лазерного излучения / Н.И. Нечипуренко, Т.А. Прокопенко, И.Д. Пашковская // Новости медико-биологических наук. – 2021. – Т. 21. № 4. – С. 200–207.
24. Поддубная О.А. Низкоинтенсивная лазеротерапия в клинической практике (Часть 1) / О.А. Поддубная // Вестник восстановительной медицины. – 2020. – №. 6 (100). – С. 92–99.
25. Пономаренко, Г.Н. Высокоинтенсивная лазеротерапия в клинической медицине: наукометрический анализ доказательств эффективности / Г.Н. Пономаренко // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. - 2023. - Т. 100. № 1. - С. 18-26.
26. Сайфуллина, И.И. Обзор современных методов регенеративной дерматологии и биоактивной терапии кожи при хронической венозной недостаточности и трофических язвах / И.И. Сайфуллина // Интернаука. - 2024. – Т. 343. № 26-1 - С. 26-30.
27. Смышляев, И.А. Оценка безопасности и эффективности внутрисуставного введения стромально-васкулярной фракции жировой ткани для лечения гонартроза: промежуточные результаты клинического исследования / И.А. Смышляев, С.И. Гильфанов, В.А. Копылов и др. // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23 №3. – С. 17–31.
28. Хаджибаев, А.М. Эффективность применения клеточных технологий в лечении ожоговых ран в эксперименте / А.М. Хаджибаев, Д.Б. Туляганов, А.Д.

Фаязов, Т.А. Вerveкина, Н.А. Циферова, У.Р. Камилов, О.С. Чарышникова // Неотложная хирургия им. И.И. Джанелидзе. - 2024. - Т.15. № 2 - С. 72-79

29. Abesi, F. Efficacy of low-level laser therapy in wound healing and pain reduction after gingivectomy: a systematic review and meta-analysis / F. Abesi, N. Derikvand // J Lasers Med Sci. – 2023. – Vol. 14. – P. e17.

30. Abo-Elkheir, W. Role of cord blood and bone marrow mesenchymal stem cells in recent deep burn: A case-control prospective study / W. Abo-Elkheir, F. Hamza, A.M. Elmofly, A. Emam, M. Abdl-Moktader, S. Elsherefy, H. Gabr // Am. J. Stem Cells. – 2017. – Vol. 6. – P. 23–35.

31. Abouzaid, A.M. Effect of autologous fat transfer in acute burn wound management: a randomized controlled study / A.M. Abouzaid, M.E. El Mokadem, A.K. Aboubakr, M.A. Kassem, A.K. Al Shora, A. Solaiman // Burns. – 2022. – Vol. 48. – P. 1368-1385.

32. Ahrabi, B. The effect of photobiomodulation therapy on the differentiation, proliferation, and migration of the mesenchymal stem cell: a review / B. Ahrabi, M. Rezaei Tavirani, M.S. Khoramgah, M. Noroozian, S. Darabi, S. Khoshsirafat, et al. // J Lasers Med Sci. – 2019. – Vol. 10 (suppl 1). – P. S96–S103.

33. Akita, S. Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury / S. Akita, K. Akino, A. Hirano, A. Ohtsuru, S. Yamashita // Stem Cells Int. – 2010. – Vol. 10. – P. 532704.

34. Alan, H. Evaluation of the effects of the low-level laser therapy on swelling, pain, and trismus after removal of impacted lower third molar / H. Alan, U. Yolcu, M. Koparal, C. Özgür, S.A. Öztürk, S. Malkoç // Head Face Med. – 2016. – Vol. 12. – P. 25.

35. Andrzejewska, A. Concise review: Mesenchymal stem cells: From roots to boost / A. Andrzejewska, B. Lukomska, M. Janowski // Stem Cells. – 2019. – Vol. 37. – P. 855 – 864.

36. Argentati, C. Adipose Stem Cell Translational Applications: From Bench-to-Bedside / C. Argentati, F. Morena, M. Bazzucchi, I. Armentano, C. Emiliani, S. Martino, // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19. – P. 3475.

37. Arkoulis, N. Stem cell enriched dermal substitutes for the treatment of late burn contractures in patients with major burns / N. Arkoulis, S. Watson, E. Weiler-Mithoff // *Burns*. – 2018. – Vol. 44. – 724–726.
38. Atalay, S. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing / S. Atalay, A. Coruh, K. Deniz // *Burns*. – 2014. – Vol. 40. – P. 1375e83.
39. Avci, P. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring / P. Avci, A. Gupta, M. Sadasivam, D. Vecchio, Z. Pam, N. Pam, et al. // *Semin Cutan Med Surg*. – 2013. – Vol. 32. – P. 41–52.
40. Avivar-Valderas, A. Dissecting allo-sensitization after local administration of human allogeneic adipose mesenchymal stem cells in perianal fistulas of crohn's disease patients / A. Avivar-Valderas, C. Martin-Martin, C. Ramirez, et al. // *Front Immunol*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1244.
41. Berni, M The Role of Low-Level Laser Therapy in Bone Healing: Systematic Review / M. Berni, A.M. Brancato, C. Torriani, V. Bina, S. Annunziata, E. Cornella, M. Trucchi, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – P. 7094.
42. Brembilla, N.C. Adipose-Derived Stromal Cells for Chronic Wounds: Scientific Evidence and Roadmap Toward Clinical Practice / N.C. Brembilla, H. Vuagnat, W.H. Boehncke, K.H. Krause, O. Preynat-Seauve // *Stem Cells Transl Med*. – 2023. – Vol. 12. – P. 17–25.
43. Bura, A. Phase I trial: The use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia / A. Bura, V. Planat-Benard, P. Bourin, J.S. Silvestre, F. Gross, J.L. Grolleau, B. Saint-Lebese, J.A. Peyrafitte, et al. // *Cytotherapy*. – 2014. – Vol. 16. – P. 245–257.
44. Camolesi, G.C. Photobiomodulation in dental implant stability and post-surgical healing and inflammation. A randomised double-blind study / G.C. Camolesi, J.M. Somoza-Martín, M.D. Reboiras-López, F. Camacho-Alonso, A. Blanco-Carrión, M. Pérez-Sayáns // *Clin Oral Implants Res*. – 2023. – Vol. 34. – P. 137–47.
45. Cerqueira, M.T. Stem Cells in Skin Wound Healing: Are We There Yet? / M.T. Cerqueira, R.P. Pirraco, A.P. Marques // *Adv. Wound Care*. – 2016. – Vol. 5. – P. 164–175.

46. Cervelli, V. Application of enhanced stromal vascular fraction and fat grafting mixed with PRP in post-traumatic lower extremity ulcers / V. Cervelli, P. Gentile, B. De Angelis, // *Stem Cell Res.* – 2011. – Vol. 6. – P. 103–111.
47. Charitos, I.A. Stem Cells: A Historical Review about Biological, Religious, and Ethical Issues / I.A. Charitos, A. Ballini, S. Cantore, M. Boccellino, M. Di Domenico, E. Borsani, R. Nocini, M. Di Cosola, L. Santacroce, L. Bottalico // *Stem Cells International.* – 2021. – Vol. – P. 9978837.
48. Chen, B. Intervention effects of low-level laser therapy (LLLT) on grade I-II ulcers in diabetic foot patients: A meta-analysis / B. Chen, Z. Lin, S. Zou, C. Huang, Y. Liu, S. Xu // *Wound Repair Regen.* – 2025. – Vol. 33. – P. e70021.
49. Cheng, H-Y, toward transplantation tolerance with adipose tissue-derived therapeutics / H-Y. Cheng, M.R. Anggelia, C-H. Lin, F-C. Wei // *Front. Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1111813.
50. Choi, K. Low-level laser therapy promotes the osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on an acellular dermal matrix / K. Choi, B.J. Kang, H. Kim, S. Lee, S. Bae, O.K. Kweon, et al. // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2013. – Vol. 101. – P. 919–928.
51. Chung, H. The details of low-level laser (light) therapy / H. Chung, T. Dai, S.K. Sharma, Y.-Y. Huang, J.D. Carroll, M.R. Hamblin // *Annals of biomedical engineering.* 2012. – Vol. 40. – P. 516–533.
52. Cios, A. Effect of Different Wavelengths of Laser Irradiation on the Skin Cells / A. Cios, M. Ciepielak, L. Szymański Ł, A. Lewicka, S. Cierniak, W. Stankiewicz, M. Mendrycka, S. Lewicki // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2021. – Vol. 22. – P. 2437.
53. Cremona, M. State of the Art in the Standardization of Stromal Vascular Fraction Processing / M. Cremona, M. Gallazzi, G. Rusconi, L. Mariotta, M. Gola, G. Soldati // *Biomolecules.* – 2025. – Vol. 15. – P. 199.
54. de Andrade, A.L.M. Photobiomodulation effect on the proliferation of adipose tissue mesenchymal stem cells / A.L.M. de Andrade, G.F. Luna, P. Brassolatti, M.N.

Leite, J.R. Parisi, A.M. de Oliveira Leal, M. Frade, F. de Freitas Anibal, N.A. Parizotto // *Lasers Med Sci.* – 2019. – Vol. 34. – P. 677–683.

55. de Lima, R.D.N. Low-level laser therapy alleviates the deleterious effect of doxorubicin on rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells / R.D.N. de Lima, S.S. Vieira, E.L. Antonio, P.T. Camillo de Carvalho, R. de Paula Vieira, B. Mansano, et al. // *J Photochem Photobiol B.* – 2019. – Vol. 196. – P. 111512.

56. de Melo, M.I.A. Selection of DNA aptamers for differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells from fibroblasts / M.I.A. de Melo, P. da Silva Cunha, M.C. de Miranda, et al. // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2021. – Vol. 193. – P. 3704–3718.

57. de Villiers, J.A. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid / J.A. de Villiers, N.N. Houreld, H. Abrahamse // *Stem Cell Rev Rep.* – 2011. – Vol. 7. – P. 869–882.

58. Deng, C. Treatment of human chronic wounds with autologous extracellular matrix/stromal vascular fraction gel / C. Deng, L. Wang, J. Feng, F. Lu // *Medicine.* – 2018. – Vol. 97. – P. e11667.

59. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz // *Cytotherapy.* – 2006. – Vol. 8. – P. 315–317.

60. Ebrahimi, P. Effect of photobiomodulation in secondary intention gingival wound healing-a systematic review and meta-analysis / P. Ebrahimi, M. Hadilou, F. Naserneysari, A. Dolatabadi, R. Tarzemy, N. Vahed, L. Nikniaz, R. Fekrazad, L. Gholami // *BMC Oral Health.* – 2021. – Vol. 21. – P. 258.

61. Eschborn, J. Long-term Results After Autologous Fat Transfer for Treatment of Chronic Lower Extremity Wounds / J. Eschborn, P. Kruppa, I. Georgiou, M. Infanger, M. Ghods // *Int. J. Low. Extrem. Wounds.* – 2023. – Vol. 22. – P. 524–530.

62. Ferreira, M.Y. evaluating the quality of studies reporting on clinical applications of stromal vascular fraction: A systematic review and proposed reporting guidelines

- (CLINIC-STRA-SVF) / M.Y. Ferreira, J.D.C. Carvalho Junior, L.M...Ferreira // *Regen Ther.* – 2023. – Vol. 24. – P. 332–342.
63. François, P. Development and Validation of a Fully GMP-Compliant Process for Manufacturing Stromal Vascular Fraction: A Cost-Effective Alternative to Automated Methods / P. François; L. Giraudo, J. Veran, B. Bertrand, C. Dumoulin, H. Aboudou, et al. // *Cells.* – 2020. – Vol. 9. – P. 2158.
64. Fraser, J.K. Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology / J.K. Fraser, I. Wulur, Z. Alfonso, M.H. Hedrick // *Trends Biotechnol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 150–154.
65. Frazier, T.P. Body mass index affects proliferation and osteogenic differentiation of human subcutaneous adipose tissue-derived stem cells / T.P. Frazier, J.M. Gimble, J.W. Devay, H.A. Tucker, E.S. Chiu, B.G. Rowan // *BMC Cell Biol.* – 2013. – Vol. 14. – P. 34.
66. Friedenstein, A.J. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells / A.J. Friedenstein, S. Piatetzky, K.V. Petrakova // *J Embryol Exp Morphol.* – 1966. – Vol. 16. – P. 381–390.
67. Ginani, F. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review / F. Ginani, D.M.Souares, M.P. Barreto, C.A. Barboza // *Lasers Med Sci.* – 2015. – Vol. 30. – P. 2189–2194.
68. Gomez-Gutierrez, J.G. The neutral red assay can be used to evaluate cell viability during autophagy or in an acidic microenvironment in vitro / J.G. Gomez-Gutierrez, N. Bhutiani, M.W. McNally, et al. // *Biotech Histochem.* – 2021. – Vol. 96. – P. 302–310.
69. Gopal, L. The Efficacy of Low-Level Laser Therapy on the Healing of Oral Wounds: A Systematic Review / L. Gopal, P. Palwankar, N. Dhalla // *Cureus.* – 2024. – Vol. 16. – P. e70832.
70. Gui, C. Harnessing adipose stem cell diversity in regenerative medicine / C. Gui, J. Parson, G.A. Meyer // *APL Bioeng.* – 2021. – Vol. 5. – P. 021501. [39 0918]
71. Hamblin, M. R. and Y.-Y. Huang (2013). *Handbook Of photomedicine*, CRC Press.
72. Han, B. Adipose-derived mesenchymal stem cells treatments for fibroblasts of fibrotic scar via downregulating TGF- β 1 and Notch-1 expression enhanced by

- photobiomodulation therapy / B. Han, J. Fan, L. Liu, J. Tian, C. Gan, Z. Yang, H. Jiao, T. Zhang, Z. Liu, H. Zhang // *Lasers Med Sci.* – 2019. – Vol. 34. – P. 1–10.
73. Han, S.K. The treatment of diabetic foot ulcers with uncultured, processed lipoaspirate cells: a pilot study / S.K. Han, H.R. Kim, W.K. Kim // *Wound Repair Regen.* – 2010. – Vol. 18. – P. 342–348.
74. Heeschen, C. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease / C. Heeschen, R. Lehmann, J. Honold, B. Assmus, A. Aicher, D.H. Walter, H. Martin, A.M. Zeiher, S. Dimmeler // *Circulation.* – 2004. – Vol. 109. – P. 1615–22.
75. Hocking, A.M. Gibran Mesenchymal stem cells: Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair / A.M. Hocking, N.S. // *Exp. Cell Res.* – 2010. – Vol. 316. – P. 2213–2219.
76. Iddins, C.J. Case Report: Industrial X-Ray Injury Treated With Non- Cultured Autologous Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction (SVF) / C.J. Iddins, S.R. Cohen, R.E. Goans, R. Wanat, M. Jenkins, D.M. Christensen, N. Dainiak // *Health Phys.* – 2016. – Vol. 111. – P. 112–116.
77. Karkehabadi, H. Effect of low-level laser therapy on differentiation and proliferation of human dental pulp stem cells: a systematic review / H. Karkehabadi, J. Zafari, E. Khoshbin, R. Abbasi, S. Esmailnasab, A. Doosti-Irani // *J Lasers Med Sci.* – 2023. – Vol. 14. – P. e47.
78. Kenny, E.M. Fat Grafting in Radiation-Induced Soft-Tissue Injury: A Narrative Review of the Clinical Evidence and Implications for Future Studies / E.M. Kenny, F.M. Egro, A. Ejaz, S.R. Coleman, J.S. Greenberger, J.P. Rubin // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2021. – Vol. 147. – P. 819–838.
79. Khalighi, H.R. Low level laser therapy versus pharmacotherapy in improving myofascial pain disorder syndrome / H.R. Khalighi, H. Mortazavi, S.M. Mojahedi, S. Azari-Marhabi, F. Moradi Abbasabadi // *J Lasers Med Sci.* – 2016. – Vol. 7. – P. 45–50.
80. Kim, J. Keratinocyte like cells trans-differentiated from human adipose-derived stem cells, facilitate skin wound healing in mice / J. Kim, T. Hasegawa, A. Wada, Y. Maeda, S. Ikeda // *Ann Dermatol.* – 2021. – Vol. 33. – P. 324–332.

81. Kim, W.S. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts / W.S. Kim, B.S. Park, J.H. Sung, et al. // *J. Dermatol. Sci.* – 2007. – Vol. 48. – P. 15e24.
82. Kuznetsov, S.A. Circulating skeletal stem cells / S.A. Kuznetsov, M.H. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco, P.G. Robey // *J Cell Biol.* – 2001. – Vol. 153. – P. 1133–1140.
83. Larson, D. Local Treatment of Wound Infections: A Review of Clinical Trials from 2013 to 2024/ D. Larson, J. Neelon, S.L.R. Karna, K. Nuutila K. // *Adv Wound Care (New Rochelle).* – 2025. – Vol. 1. – P. 14–32.
84. Lee, M.H. A systematic review of autologous adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) for the treatment of acute cutaneous wounds / M.H. Lee, B.Y. Kang, C.C. Wong, A.W. Li, et al. // *Arch Dermatol Res.* – 2022. – Vol. 314. – P. 417–425.
85. Li, M.H. Effect of combined use of autologous adipose-derived stem cells and sterile biological films on chronic wound / M.H. Li, Y. Liu, C. Chen, et al. // *Med J Chin Peoples Lib Army.* – 2016. – Vol. 41. – P. 1025–1030.
86. Liao, X. Preconditioning with Low-Level Laser Irradiation Enhances the Therapeutic Potential of Human Adiposederived Stem Cells in a Mouse Model of Photoaged Skin / X. Liao, S.H. Li, G.H. Xie, S. Xie, L.L. Xiao, J.X. Song, et al. // *Photochem Photobiol.* – 2018. – Vol. 94. – P. 780–790.
87. Liu J. Engineered stromal vascular fraction for tissue regeneration / J. Liu, Y. Li, Y. Zhang, Z. Zhao, B. Liu // *Front. Pharmacol.* – 2025. – Vol. 16. – P. 1510508.
88. Lonardi, R. Autologous micro-fragmented adipose tissue for the treatment of diabetic foot minor amputations: a randomized controlled single-center clinical trial (MiFrAADiF) / R. Lonardi, N. Leone, S. Gennai, G. Trevisi Borsari, T. Covic, R. Silingardi. // *Stem Cell Res Ther.* – 2019. – Vol. 10. – P. 223.
89. Maghfour, J. Photobiomodulation CME part I: Overview and mechanism of action / J. Maghfour, D.M. Ozog J. Mineroff, J. Jagdeo, I. Kohli, H.W. Lim // *J Am Acad Dermatol.* – 2024. – Vol. 91. – P. 793–802.

90. Malekzadeh, H. Application of Adipose-Tissue Derived Products for Burn Wound Healing / H. Malekzadeh, Z. Tirmizi, J.A. Arellano, F.M. Egro, A. Ejaz // *Pharmaceuticals*. – 2023. – Vol. 16. – P. 1302.
91. Mansilla, E. Cadaveric bone marrow mesenchymal stem cells: First experience treating a patient with large severe burns / E. Mansilla, G.H. Marín, M. Berges, S. Scafatti, J. Rivas, A. Núñez, et al. // *Burn. Trauma*. – 2015. – Vol. 3. – P. 17.
92. Mansouri, V. Evaluation of efficacy of low-level laser therapy / V. Mansouri, B. Arjmand, M. Rezaei Tavirani, M. Razzaghi, M. Rostami-Nejad, M. Hamdiah // *J Lasers Med Sci*. – 2020. – Vol. 11. – P. 369-380.
93. Marino, G. Therapy with autologous adipose-derived regenerative cells for the care of chronic ulcer of lower limbs in patients with peripheral arterial disease / G. Marino, M. Moraci, E. Armenia, C. Orabona, R. Sergio, G. De Sena, V. Capuozzo, M. Barbarisi, F. Rosso, G. Giordano et al. // *J. Surg. Res.* – 2013. – Vol. 185. – P. 36–44.
94. Markiewicz-Gospodarek, A. Burn Wound Healing: Clinical Complications, Medical Care, Treatment, and Dressing Types: The Current State of Knowledge for Clinical Practice / A. Markiewicz-Gospodarek, M. Koziół, M. Tobiasz, J. Baj, E. Radzikowska-Büchner, A. Przekora // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2022. – Vol. 19. – P. 1338.
95. Matsuki, T. Epithelial cell proliferation arrest induced by lactate and acetate from *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve* / T. Matsuki, T. Pédrón, B. Regnault, et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – P. e63053.
96. Mazini, L. Hopes and limits of adipose-derived stem cells (ADSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in wound healing / L. Mazini, L. Rochette, B. Admou, S. Amal, G. Malka // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21. – P. 1306.
97. Mazini, L. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs) / L. Mazini, L. Rochette, M. Amine, G. Malka // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20. – P. 2523.
98. McIntosh, K.R. Immunogenicity of allogeneic adipose-derived stem cells in a rat spinal fusion model / K.R. McIntosh, M.J. Lopez, J.N. Borneman et al. // *Tissue Eng Part A*. – 2009. – Vol. 15. – P. 2677–2686.

99. Mester, E. Effect of laser-beam on the bacterial phagocytosis of leukocytes / E. Mester, G. Ludány, G. Vajda, J. Tota, G. Karika, M. Hejjas // *Acta Biol Med Ger.* – 1970. – Vol. 25. – P. 927-931.
100. Mester, E. Laser stimulation of wound healing / E. Mester, S. Nagylucskay, A. Döklen, S. Tisza // *Acta Chir Acad Sci Hung.* – 1976. – Vol. 17. – P. 49-55.
101. Mester, E. Laser stimulation of wound healing. Enzyme-histochemical studies / E. Mester, E. Bácsy, T. Spiry, S. Tisza // *Acta Chir Acad Sci Hung.* – 1974. – Vol. 15. – P. 203–208.
102. Min, K.H. Effect of Low-Level Laser Therapy on Human Adipose-Derived Stem Cells: In Vitro and In Vivo Studies / K.H. Min, J.H. Byun, C.Y. Heo, E.H. Kim, H.Y. Choi, C.S. Pak // *Aesthetic Plast Surg.* – 2015. – Vol. 39. – P. 778–782.
103. Miranda, M.B. Effects and parameterization of low-level laser therapy in diabetic ulcers: an umbrella review of systematic reviews and meta-umbrella / M.B. Miranda, R.F. Alves, R.B. da Rocha, V.S. Cardoso // *Lasers Med Sci.* – 2025. – Vol. 40. – P. 109.
104. Misra, P. Effect of low-level laser therapy on early wound healing and levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid following open flap debridement / P. Misra, R. Kalsi, S. Anand Arora, K.S. Singh, S. Athar, A. Saini // *Cureus.* – 2023. – Vol. 15. – P. e34755.
105. Moon, K-C. Potential of allogeneic adipose-derived stem cell-hydrogel complex for treating diabetic foot ulcers / K-S. Moon, H-S. Suh, K-B. Kim, et al. // *Diabetes.* – 2019. – Vol. 68. – P. 837–846.
106. Mvula, B. Differentiation potential of adipose-derived stem cells when cocultured with smooth muscle cells, and the role of low-intensity laser irradiation / B. Mvula, H. Abrahamse // *Photomed Laser Surg.* – 2016. – Vol. 34. – P. 509–515.
107. Mvula, B. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells / B. Mvula, T.J. Moore, H. Abrahamse // *Lasers Med Sci.* – 2009. – Vol. 25. – P. 33–39.
108. Mvula, B. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells / B. Mvula, T. Mathope, T. Moore, H. Abrahamse // *Lasers Med Sci.* – 2008. – Vol. 23. – P. 277–282.

109. Nakagami, H. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells / H. Nakagami, K. Maeda, R. Morishita, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 2542e7.
110. Namgoong, S. A pilot study comparing a micronized adipose tissue niche versus standard wound care for treatment of neuropathic diabetic foot ulcers / S. Namgoong, I.J. Yoon, S.K. Han, J.W. Son, J. Kim. // *J Clin Med.* – 2022. – Vol. 11. – P. 5887.
111. Nilforoushzadeh, M.A. Engineered skin graft with stromal vascular fraction cells encapsulated in fibrin–collagen hydrogel: a clinical study for diabetic wound healing / M.A. Nilforoushzadeh, M.M. Sisakht, M.A. Amirkhani, et al. // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2020. – Vol. 14. – P. 424–440.
112. O'Reilly, S. Aging, senescence, and cutaneous wound healing—a complex relationship / S. O'Reilly, E. Markiewicz, O.C. Idowu // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1429716.
113. Oberbauer, E. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: Current state of the art / E. Oberbauer, C. Steffenhagen, C. Wurzer, C. Gabriel, H. Redl, S. Wolbank // *Cell Regen.* – 2015. – Vol. 4. – P. 7.
114. Ong, W.K. Adipose Tissue: Understanding the Heterogeneity of Stem Cells for Regenerative Medicine / W.K. Ong, S. Chakraborty, S. Sugii // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11. – P. 918.
115. Ong, W.K. Adipose-derived stem cells: Fatty potentials for therapy / W.K. Ong, S. Sugii // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 45. – P. 1083–1086.
116. Park, I.S. Angiogenic synergistic effect of adipose-derived stromal cell spheroids with low-level light therapy in a model of acute skin flap ischemia / I.S. Park, P.S. Chung, J.C. Ahn // *Cells Tissues Organs.* – 2016. – Vol. 202. – P. 307–318.
117. Park, I.S. Enhancement of ischemic wound healing by spheroid grafting of human adiposederived stem cells treated with low-level light irradiation / I.S. Park, P.S. Chung, J.C. Ahn // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – P. e0122776.
118. Park, I.S. Human adiposederived stem cell spheroid treated with photobiomodulation irradiation accelerates tissue regeneration in mouse model of skin

- flap ischemia / I.S. Park, P.S. Chung, J.C. Ahn, A. Leproux // *Lasers Med Sci.* – 2017. Vol. 32. – P. 1737–1746.
119. Pathak, R. The Effectiveness of Photobiomodulation Using 940-nm Diode Laser for Reducing Pain, Swelling and Trismus After Third Molar Surgery: A Single-Blinded Randomized Control Trial / R. Pathak, T.P. Kale, V. Pattar, et al. // *J. Maxillofac. Oral Surg.* – 2024. – <https://doi.org/10.1007/s12663-023-02104-1>.
120. Peña, O.A. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing / O.A. Peña, P. Martin. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2024. – Vol. 25. – P. 599–616.
121. Piccolo, N.S. Fat grafting for treatment of burns, burn scars, and other difficult wounds / N.S. Piccolo, M.S. Piccolo, M.T. Piccolo // *Clin. Plast.Surg.* – 2015. – Vol. 42. – P. 263–283.
122. Pinto, H. The Effect of Photobiomodulation on Human Mesenchymal Cells: A Literature Review / H. Pinto, P. Goñi Oliver, E. Sánchez-Vizcaíno Mengual // *Aesthetic Plast Surg.* – 2021. – Vol. 45. – P. 1826-1842.
123. Quinn, W.J. Lactate Limits T Cell Proliferation via the NAD(H) Redox State / W.J. Quinn, J. Jiao, T. TeSlaa, et al. // *Cell Rep.* – 2020. – Vol. 33. – P. 108500.
124. Radzikowska-Büchner, E. An Overview of Recent Developments in the Management of Burn Injuries / E. Radzikowska-Büchner, I. Łopuszyńska, W. Flieger, M. Tobiasz, R. Maciejewski, J. Flieger J. // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – Vol. 24. – P. 16357.
125. Raposio, E. Adipose-derived stem cells added to platelet-rich plasma for chronic skin ulcer therapy / E. Raposio, N. Bertozzi, S. Bonomini S, et al. // *Wounds.* – 2016. – Vol. 28. – P. 126–131.
126. Rasulov, M.F. First experience in the use of bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns / M.F. Rasulov, A.V. Vasil'chenkov, N.A. Onishchenko, M.E. Krashennnikov, V.I. Kravchenko, et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 139. – P. 141–144.
127. Rautiainen, S. Angiogenic effects and crosstalk of adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells and their extracellular vesicles with endothelial cells / S. Rautiainen, T. Laaksonen, R. Koivuniemi // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 10890.

128. Rehman, J. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells / J. Rehman, D. Traktuev, J. et al. // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 1292e.
129. Rigotti, G. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: A healing process mediated by adipose-derived adult stem cells / G. Rigotti, A. Marchi, M. Galiè, G. Baroni, D. Benati, M. Krampera, A. Pasini, A. Sbarbati // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2007. – Vol. 119. – P. 1409–1422.
130. Santos, C.M.D. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effects of Low-Level Laser Therapy in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers / C.M.D. Santos, R.B.D. Rocha, F.A. Hazime, V.S. Cardoso // *Int J Low Extrem Wounds*. – 2021. – Vol. 20. – P. 198–207.
131. Schipper, J.A.M. Mechanical Fractionation of Adipose Tissue—A Scoping Review of Procedures to Obtain Stromal Vascular Fraction / C.J.H.C.M. van Laarhoven, R.H. Schepers, A.J. Tuin, M.C. Harmsen, F.K.L. Spijkervet, et al. // *Bioengineering*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1175.
132. Schneider, L.A. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy / L.A. Schneider, A. Korber, S. Grabbe S., et al. // *Arch Dermatol Res*. – 2007. – Vol. 298. – P. 413–420.
133. Shah, D. Evaluation of effect of low level laser therapy with intracanal medicament on periapical healing: a randomised control trial / D. Shah, M.C. Ponappa, K.C. Ponnappa // *Indian J Dent Res*. – 2021. – Vol. 32. – P. 299–304.
134. Shan, T. M2 TAM subsets altered by lactic acid promote T cell apoptosis through the PD L1/PD 1 pathway / T. Shan, S. Chen, X. Chen, et al. // *Oncol Rep*. – 2020. – Vol. 44. – P. 1885–1894.
135. Shi, Y. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses / Y. Shi, J. Su, A.I. Roberts, P. Shou, A.B. Rabson, G. Ren // *Trends Immunol*. – 2012. – Vol. 33. – P. 136–143.
136. Shingyochi, Y. Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration / Y. Shingyochi, H. Orbay, H. Mizuno. *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2015. – Vol. 15. – P. 1285–1292.

137. Shukla, L. Fat Therapeutics: The Clinical Capacity of Adipose-Derived Stem Cells and Exosomes for Human Disease and Tissue Regeneration / L. Shukla, Y. Yuan, R. Shayan, D.W. Greening, T. Karnezis // *Front. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 158.
138. Stolzing, A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies / A. Stolzing, E. Jones, D. McGonagle, A. Scutt // *Mech Ageing Dev.* – 2008. – Vol. 129. – P. 163–173.
139. Sugii, S. Feeder-dependent and feeder-independent iPS cell derivation from human and mouse adipose stem cells / S. Sugii, Y. Kida, W.T. Berggren, R.M. Evans // *Nat. Protoc.* – 2011. – Vol. 6. – P. 346–358.
140. Sutton, E. Photobiomodulation and diabetic foot and lower leg ulcer healing: A narrative synthesis / E. Sutton, S. Ganie, C. Chan, A. Kaur, E. Nussbaum // *Foot (Edinb).* – 2021. – Vol. 48. – P. 101847.
141. Taha, N. The Effects of Low-Level Laser Therapy on Wound Healing and Pain Management in Skin Wounds: A Systematic Review and Meta-Analysis / N. Taha, H. Daoud, T. Malik, et al. // *Cureus.* – 2024. – Vol. 16. – P. e72542.
142. Tamimi, R. Anti-inflammatory effect of green photobiomodulation in human adipose-derived mesenchymal stem cells / R. Tamimi, N.M. Mahmoodi H.R. Samadikhah, S.H. Tackallou, S.Z. Benisi, M.E. Boroujeni // *Lasers Med Sci.* – 2022. – Vol. 37. – P. 3693–3703.
143. Tamimi, R. Review on the molecular mechanisms of low-level laser therapy: gene expression and signaling pathways / R. Tamini, S.Z. Benisi, M.E. Boroujeni, M.J. Torkamani // *Lasers Med Sci.* – 2025. – Vol. 40. – P. 160.
144. Tanios, E. Efficacy of adiposederived stromal vascular fraction cells in the management of chronic ulcers: a randomized clinical trial / E. Tanios, T.M. Ahmed, E.A. Shafik, et al. // *Regen Med.* – 2021. – Vol. 16. – P. 975–988.
145. Tarallo, M. Liposuction aspirate fluid adipose-derived stem cell injection and secondary healing in fingertip injury: a pilot study / M. Tarallo, P. Fino, D. Ribuffo et al. // *Plast Reconstr Surg.* – 2018. – Vol. 142. – P. 136–147.

146. Uzun, E. Intralesional allogeneic adipose-derived stem cells application in chronic diabetic foot ulcer: phase I/2 safety study / E. Uzun, A. Güney, Z.B. Gönen, et al. // *Foot Ankle Surg.* – 2021. – Vol. 27. – P. 636–642.
147. Vaghardoost, R. Effect of low-level laser therapy on the healing process of donor site in patients with grade 3 burn ulcer after skin graft surgery (a randomized clinical trial) / R. Vaghardoost, M. Momeni, N. Kazemikhoo, et al. // *Lasers Med Sci.* – 2018. – Vol. 33. – P. 603–607.
148. Vicenti, G. Autologous lipotransfer versus stromal vascular fraction enriched lipoinjection for diabetic foot wounds healing: a pilot study / G. Vicenti, G. Solarino, V. Pesce, et al. // *J Biol Regul Homeost Agents.* – 2017. – Vol. 31. – P. 141–146.
149. Wang, K. Adipose-Derived Stem Cell Exosomes Facilitate Diabetic Wound Healing: Mechanisms and Potential Applications / K. Wang, Z. Yang, B. Zhang, S. Gong, Y. Wu // *Int J Nanomedicine.* – 2024. – Vol. 19. – P. 6015–6033.
150. Wang, Y. Photobiomodulation (blue and green light) encourages osteoblastic-differentiation of human adipose-derived stem cells: role of intracellular calcium and light-gated ion channels / Y. Wang, Y.Y. Huang, Y. Wang, P. Lyu, M.R. Hamblin // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 33719.
151. Wang, Y. Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cells / Y. Wang, Y.Y. Huang, Y. Wang, P. Lyu, M.R. Hamblin // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 7781.
152. Williams, J.T. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes / J.T. Williams, S.S. Southerland, J. Souza, A.F. Calcutt, R.G. Cartledge // *Am Surg.* – 1999. – Vol. 65. – P. 22–26.
153. Wu, J-Y. Low-Power Laser Irradiation Suppresses Inflammatory Response of Human Adipose-Derived Stem Cells by Modulating Intracellular Cyclic AMP Level and NF-kB Activity / J-Y. Wu, C-H. Chen, C-Z. Wang, M-L. Ho, M-L. Yeh, et al. // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8. – P. e54067.
154. Wynn, T.A. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis / T.A. Wynn, K.M. Vannella // *Immunity.* – 2016. – Vol. 44. – P. 450–462.

155. Xiao, Y. The efficiency of human fat products in wound healing: A systematic review and meta-analysis / Y. Xiao, M. Nie, W. Xu, J. Zhang, S. Lei, D. Wu // *Int Wound J.* – 2024. – Vol. 21. – P. e70016.
156. Xu, Y. Autologous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: A promising therapeutic strategy for prevention of skin-graft contraction / Y. Xu, S. Huang, X. Fu. // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2012. – Vol. 37. – P. 497–500.
157. Yin, K. Low level laser (LLL) attenuate LPS-induced inflammatory responses in mesenchymal stem cells via the suppression of NF- κ B signaling pathway in vitro / K. Yin, R. Zhu, S. Wang, R.C. Zhao // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12. – P. e0179175.
158. Yin, K. Low-level laser effect on proliferation, migration, and antiapoptosis of mesenchymal stem cells / K. Yin, R. Zhu, S. Wang, R.C. Zhao // *Stem Cells Dev.* – 2017. – Vol. 26. – P. 762–775.
159. Yoshikawa, T. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation / T. Yoshikawa, H. Mitsuno, I. Nonaka, Y. Sen, K. Kawanishi, Y. Inada, Y. Takakura, K. Okuchi, A. Nonomura // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2008. – Vol. 121. – P. 860–877.
160. Zare, F. Photobiomodulation with 630 plus 810 nm wavelengths induce more in vitro cell viability of human adipose stem cells than human bone marrow-derived stem cells / F. Zare, A. Moradi, S. Fallahnezhad, S.K. Ghoreishi, A. Amini, S. Chien, et al. // *J Photochem Photobiol B Biol.* – 2019. – Vol. 201. – P. 111658.
161. Zhang, F. A study of the biological effects of low-level light / F. Zhang, Q. Li, W. Qin, W. Ren, P. Zhu, Q. Jin, M. Li // *Lasers Med Sci.* – 2024. – Vol. 39. – P. 74.
162. Zhou, Z.Q. Adipose extracellular matrix promotes skin wound healing by inducing the differentiation of adiposederived stem cells into fibroblasts / Z.Q. Zhou, Y. Chen, M. Chai et al. // *Int J Mol Med.* – 2019. – Vol. 43. – P. 890-900.
163. Zuk, P.A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim, M.H. Hedrick // *Mol Biol Cell.* – 2002. – Vol. 13. – P. 4279–4295.
164. Zuk, P.A. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies / P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, et al. // *Tissue Eng.* – 2001. – Vol. 7. – P. 211–228.