

Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения

А.И. Зорина¹, И.Я. Бозо², В.Л. Зорин¹, В.Р. Черкасов¹, Р.В. Деев¹

¹ Институт стволовых клеток человека, Москва

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Derma fibroblasts: peculiarities of cytogenesis, histophysiology and possible clinical use

A.I. Zorina¹, I.Ya. Bozo², V.L. Zorin¹, V.R. Cherkasov¹, R.V. Deev¹

¹ Human Stem Cells Institute, Moscow

² S.M. Kirov Military Medical academy, Saint Petersburg

В свете получения современных экспериментальных данных общая концепция о фибробластах — основных клетках рыхлых и плотных волокнистых соединительных тканей — претерпевает существенные изменения, все более отдаляясь от классических представлений. В нашем обзоре, продолжая идею определения фибробластов как сугубо фенотипической категории, мы затронули наиболее проблемные вопросы, касающиеся определения дифферона фибробластов, клеточных источников их цитогенеза, особенностей цитофизиологии, их возрастных изменений в аспекте влияния на возможности клинического применения.

Ключевые слова: концепция о фибробластах, дифферон фибробластов, цитогенез, цитофизиология, возрастные изменения, клиническое применение.

До настоящего времени фибробласты — клетки функционально ведущего гистогенетического ряда рыхлой и плотной волокнистых соединительных тканей — представляют собой объект многочисленных научных исследований. Активный интерес к ним связан как со значительным количеством дискуссионных вопросов, касающихся их цитогенеза и биологии, так и с доступностью получения, культивирования и использования в различных экспериментальных моделях, а также неразрешенностью проблем восполнения глубоких и (или) значительных по площади дефектов кожи стандартными хирургическими методами. Единого мнения о клеточных предшественниках фибробластов в постнатальном периоде не сформировано, не существует достоверных критериев отнесения клеточных типов к конкретному звену фибробластического дифферона, равно как нет и представлений о возрастных изменениях и их потенциальном значении в экспериментальном и клиническом применении. Получение ответов на «проблемные» вопросы имеет принципиальное как общетеоретическое, так и прикладное значение.

Научный подход в решении любой задачи предполагает этап адекватного, объективного анализа и синтеза полученной информации. В этой связи и с учетом накопления огромного объема экспериментальных сведений о функциональных и фенотипических характеристиках фибробластов, «поведении» *in vitro* и *in vivo*, в сочетании с активным обсуждением их происхождения, возрастных аспектов изменения морфофункциональных особенностей, возникает

Gaining current experimental data a major concept on fibroblasts, the main cells of loose and dense connective tissue, undergoes significant changes moving away off classical concepts. Considering fibroblasts as a true phenotypic category we tried to address most challenging issues relating to definition of a fibroblast differon, cellular sources of their cytogenesis, histophysiology, their ageing changes in terms of influence on possible clinical use.

Key words: fibroblast concept, fibroblast differon, cytogenesis, histophysiology, ageing changes, clinical use.

необходимость объединения данных в единую систему, способную разрешить теоретические дискуссионные вопросы, актуальные для потенциального клинического применения фибробластов.

Цель обзора — внесение недостающих данных в современную концепцию о фибробластах в части, касающейся их цитофизиологии, изменений в возрастном аспекте и вариантов терапевтического использования на основе анализа последних экспериментальных материалов в сопоставлении с классическими представлениями.

Особенности цитогенеза и цитофизиологии фибробластов дермы

В соответствии с современными взглядами и классическими представлениями о клеточных дифферонах, процесс реализации клетками генетической информации носит непрерывный характер, в течение которого существенно изменяются их морфофункциональные характеристики. Несмотря на непрерывность цитогенеза в рамках отдельных клеточных популяций, значимым является выделение ряда его этапов — клеток одной цитогенетической линии, характеризующихся разной степенью дифференцировки, то есть обладающих специфическими, отличными от предыдущего и последующего этапов, свойствами [1].

Представления о фибробластическом диффероне, впервые сформулированные классиками отечественной гистологической школы (А.А. Максимо-

e-mail: doc_zorin@pisem.net

вым, А.А. Заварзиным, Н.Г. Хлопиным), изменялись с начала XX в. до настоящего времени в направлении обогащения гистогенетического ряда, представленного изначально тремя составляющими, дополнительными звеньями, что связано с получением все новых данных о цитофизиологии и иммунофенотипе фибробластов [2].

По аналогии с периодическим законом Д.И. Менделеева — единственным в своем роде, но имеющим множество вариантов иллюстрирующих его таблиц — существует целый ряд моделей фибробластического дифферона, которые полностью укладываются в общепринятую концепцию дифферонной организации цитогенеза. Такое разнообразие вариантов связано с отсутствием унифицированных надежных маркеров клеток, входящих в состав отдельных звеньев дифферона.

Наиболее распространенной в отечественной литературе является модель дифферона, основанная на классических представлениях и современных данных о совокупности морфофункциональных характеристик и пролиферативном потенциале фибробластов [1–3]:

- полипотентные клетки-предшественницы;
- префибробласты — коммитированные клетки-предшественницы;
- юные фибробласты;

• дифференцированные фибробласты — центральное звено фибробластического дифферона.

• конечный тип клеток фибробластического дифферона:

- фиброциты;
- миофибробласты;
- фиброкласты.

Ряд зарубежных авторов, положивших в основу более детальные сведения о пролиферативном потенциале фибробластов дермы, описали две большие составляющие дифферона [4, 5, 6–8]: митотически активные фибробласты (МФ) и постмитотические фибробласты (ПМФ). МФ, согласно результатам исследования их цитоморфологии, потенциала к делению и способности синтезировать специфические цитокины и факторы роста (TGF- β , KGF), разделяют на три последовательных этапа: МФ I, МФ II и МФ III [5]. При этом клеточный пул МФ I обладает самым высоким пролиферативным потенциалом и проходит около 25–30 клеточных делений перед дифференцировкой в клеточную популяцию МФ II. МФ II, в свою очередь, до перехода в МФ III совершают около 15–20 делений, а МФ III перед дифференцировкой в ПМФ осуществляют всего около 5–8 делений. В сопоставлении с более распространенной схемой, популяции МФ представляют собой цитогенетический ряд от префибробласта до юного

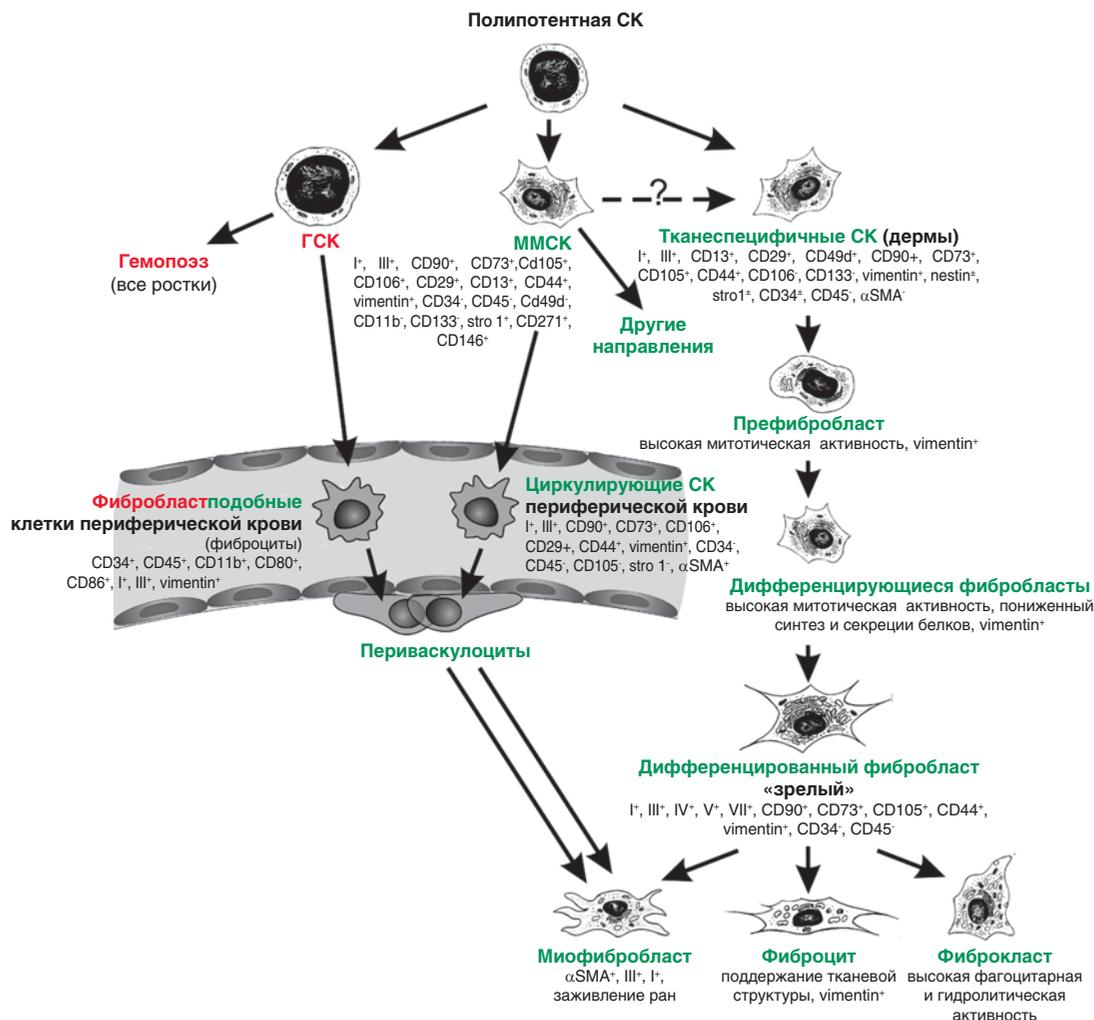


Схема фибробластического дифферона [из 2, с изм.]

фибробласта. Клеточный пул, характеризующийся отсутствием пролиферативной активности, согласно полученным биохимическим характеристикам, отражает клеточную систему «дифференцированный фибробласт-фиброцит». В пересчете на клетку, эта система, по сравнению с клеточными популяциями МФ, продуцирует в 5–8 раз больше общего коллагена и, тем самым, обеспечивает необходимое для поддержания морфофункциональной организации дермы корректное соотношение коллагена I, III и V типов [5, 7]. Выяснилось, что в коже человека соотношение клеточных популяций МФ/ПМФ постоянно и составляет 2:1 независимо от возраста человека [5]. В условиях *in vitro* клеточные популяции МФ и ПМФ разделяют на основании специфической экспрессии фермента β -галактозидазы, характерного для ПМФ и не наблюдающейся у МФ [8]. Продукция этого фермента применяется для идентификации процессов клеточного старения в культурах фибробластов [9].

В соответствии с существующей парадигмой в отношении этапности фибробластического дифферона, а также с учетом современных данных об их цитогенетической неоднородности и тенденций к обозначению фибробластов как сугубо фенотипической категории [2], нами предложена к обсуждению следующая обновленная схема фибробластического дифферона (рис. 1).

Определение структуры фибробластического дифферона не является сугубо теоретической задачей, а имеет принципиальное значение для понимания морфофункциональных процессов, происходящих на клеточном и тканевом уровнях в норме и при патологии, что, в свою очередь, открывает перспективы клинического применения фибробластов.

Источники цитогенеза фибробластов

Описывая структуру фибробластического дифферона и раскрывая морфофункциональную организацию кожи через призму характеристик отдельных его этапов, необходимо акцентировать внимание на первом звене цитогенетического ряда фибробластов — полипотентной клетке-предшественнице — и вынести его в отдельную рубрику ввиду активной обсуждаемости вопроса происхождения фибробластов в постнатальном периоде, постоянном увеличении числа «претендентов» на роль первого этапа дифферона, а также принципиальной значимости вопроса для потенциального клинического применения.

В настоящее время в качестве источников развития фибробластов рассматриваются несколько возможных вариантов: местные тканевые недифференцированные предшественники, мезенхимные мультипотентные стромальные (ММСК) или гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) красного костного мозга, — а также участие всех вышеперечисленных источников [2].

Еще А.А. Максимов (1918) отметил, что часть клеток мезенхимы дерматомеров сомитов, являющихся предшественниками фибробластов в пренатальном периоде, располагаясь в окружности капилляров, остается в малодифференцированном состоянии и обеспечивает в постнатальном периоде онтогенеза пополнение убывающей в результате дифференцировки популяции фибробластов [2]. В настоящее время большинство исследователей определяет эти камбиальные клетки как периваскулоциты

(адвентициальные клетки) [10]. Важно отметить, что в зарубежной литературе, зачастую, под термином «периваскулоциты» понимают не только адвентициальные клетки, сопровождающие сосуды и расположенные в контакте с их наружной стенкой, но и «перициты» [11–14], которые, по представлениям отечественной гистологической школы, представляют собой принципиально иную популяцию клеток, локализирующуюся между пластинками базальной мембраны сосудов [1]. Именно адвентициальные клетки способны к дифференцировке в фибробластическом направлении, наряду с остео- и хондробластическим, а также адипоцитарным, хотя в ряде работ аналогичный дифференцировочный потенциал показан и для перицитов [11–14]. Поскольку дерма кожи обладает хорошо развитым микроциркуляторным руслом, то вполне вероятно, что периваскулярные клетки принимают активное участие в цитогенезе фибробластов как в физиологических условиях, так и при заживлении ран.

Популяция адвентициальных клеток гетерогенна, о чем свидетельствует иммунофенотипическое разделение их на две группы по экспрессии комплекса гемопоэтических маркеров (CD34, Sca-1, CD49e) [15]. Существует мнение о происхождении их из циркулирующих в кровотоке ММСК и ГСК, наряду с наличием резидентных периваскулоцитов — возможных «прямых потомков» мезенхимных клеток [2].

В последние годы появились публикации, описывающие ряд полипотентных клеток, полученных из дермы и соответствующих по своему дифференцировочному и пролиферативному потенциалу ММСК костного мозга (табл. 1) [16–22].

J. Toma с соавт. (2001, 2005) идентифицировали и описали популяцию так называемых «клеток-предшественников из кожи» (SKPs, skin-derived progenitor cells) [17, 18]. SKPs были выделены из ниши дермального сосочка волосяного фолликула молодых и взрослых грызунов и культивировались *in vitro* в среде с факторами роста, часто используемыми для инкубирования нейрональных клеток-предшественниц. SKPs экспрессируют нестин, фибронектин, виментин и соответствуют ММСК по способности дифференцироваться в мезодермальном и нейральном направлениях [23, 24]. Популяция клеток со свойствами SKPs была выделена из неонатальной крайней плоти человека [18, 25], а также из кожи плода, человека среднего и пожилого возраста [20]. Ряд авторов полагают, что SKPs представляют собой новый тип мультипотентных «взрослых» клеток с «разнонаправленной» дифференцировкой [17].

SKPs человека способны в течение длительного времени пролиферировать в культуре *ex vivo* и дифференцироваться в мезенхимальном, нейрональном и гладкомышечном направлениях. Предполагают, что эти клетки, имеющие фенотип мезенхимных стволовых клеток и мультилинейный дифференцировочный потенциал, находятся в состоянии покоя до момента повреждения ткани [17, 18]. Интересно отметить, что субпопуляция SKPs, выделенная из крайней плоти, способна дифференцироваться *in vitro* в нейроне подобные клетки.

Из дермы крайней плоти человека и кожи кролика мультипотентные клетки, подобные SKPs, выделили J. Lavoie с соавт. (2009). Авторы установили, что эти клетки, как *in vitro*, так и *in vivo* способны дифференцироваться в остеобласты и хондроциты,

а часть SKPs — в гладкомышечные клетки и периваскулоциты, ассоциированные с кровеносными сосудами. По мнению исследователей, свойства этих SKPs аналогичны свойствам мультипотентных клеток нейрального гребня и их можно выделить как на стадии эмбриогенеза, так и на стадии взрослого организма [26].

N. Gago с соавт. (2009) выделили мультипотентные клетки, сходные с SKPs, (по протоколу J. Toma с некоторой модификацией) из биоптатов кожи от 102 здоровых доноров (в возрасте от 8 месяцев до 85 лет) из разных анатомических областей. При этом, выделение было произведено из ниш вне дермального сосочка волосяных фолликулов. Кроме того, авторы показали, что с возрастом наблюдается резкое снижение пула SKPs (или) их дифференцировочного потенциала [27].

Предполагается, что SKPs представляют собой эмбриональные эндогенные клетки-предшественницы, мигрирующие в ткани организма во время развития, и сохраняющие свою мультипотентность во взрослом организме [26, 27].

G. Bartsch с соавт. (2005) идентифицировали в дерме крайней плоти еще одну клеточную популяцию, обозначенную ими как дермальные мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (dermal multipotential mesenchymal stem cells, dermal MSCs), способные к дифференцировке в мезенхимальных направлениях (в адипоциты, остециты и миоциты) даже после 100 пассажей без явлений трансформации [22].

F. Chen с соавт. (2007) в дерме ювенильной крайней плоти обнаружили еще одну популяцию клеток, которую назвали мультипотентными дермальными фибробластами (MDFs), отличную от SKPs [16]. С помощью клонального анализа было показано, что MDFs составляют приблизительно 0,3% от общей популяции фибробластов дермы крайней плоти человека. В противоположность SKPs, обнаруженная исследователями популяция клеток продуцировала виментин и не экспрессировала нестин, а также, кроме эктодермальной и мезодермальной, была способна к энтодермальной дифференцировке (в частности, в гепатоциты). В 2010 г. научная группа F. Chen еще раз подтвердила мультипотентность MDFs, показав их способность дифференцироваться в островково-подобные клетки поджелудочной железы, вырабатывающие инсулин, глюкагон и соматостатин после панкреатической индукции. Более того, эти клеточные кластеры способны *in vitro* высвобождать инсулин в ответ на введение глюкозы [28].

Практически одновременно с предыдущими исследователями K. Lorenz с соавт. (2008) выделили из ювенильной крайней плоти человека «фибробластоподобные мезенхимные стволовые клетки» (FMSCs), которые экспрессируют виментин, фибронектин, коллаген I типа и слабо — нестин, α -SMA. Общий антигенный профиль этих клеток сходен с MMCK костного мозга и жировой ткани. FMSCs обладают остеогенным и адипогенным дифференцировочным потенциалом. Авторы предположили, что выделенные ими FMSCs представлены в дерме человека не в виде одиночных клеток, а в виде главной клеточной популяции, которая находится в состоянии покоя до момента повреждения ткани (что подтверждается низким уровнем экспрессии нестина). Клетки этой популяции при повреждении кожи способны дифференцироваться в миофибробласты [25].

Необходимо отметить, что условия культивирования выделенных различными исследователями клеток весьма вариабельны, что могло оказывать существенное влияние на экспрессию ряда маркеров и дифференцировочный потенциал. По мнению P. Robey, возглавляющей ведущую остеологическую лабораторию мира, большинство маркеров способны значительно варьировать в зависимости от добавления специфических ростовых факторов [29]. Так, J. Toma с соавт. культивировали SKPs с FGF2, EGF и B27, которые используются для инкубирования нейрональных клеток-предшественниц. В этих условиях SKPs экспрессировали нестин, виментин и фибронектин. F. Chen с соавт. культивировали выделенные ими MDFs на стандартной культуральной среде без добавления факторов роста. Не исключено, что J. Toma и F. Chen с соавт. выделили одну и ту же популяцию клеток-предшественниц, которые в разных условиях экспрессировали разные маркеры. Более того, в большинстве вышеуказанных работ, описывающих получение различных мультипотентных клеток из дермы, не указывалась их точная локализация. За исключением SKPs, расположенных в области дермального сосочка волосяного фолликула, часть оставшихся клеток, как то FMSCs, MDFs, dermal MSCs вполне могли оказаться уже давно известными периваскулоцитами.

В любом случае, вышеуказанные данные свидетельствуют о том, что дерма человека содержит значительный камбиальный резерв, способный генерировать множество клеточных линий, а, следовательно, который может быть рассмотрен в качестве альтернативного костному мозгу источника стволовых клеток [30–33], которые в перспективе могут быть использованы в клинической практике в рамках биотехнологического подхода.

Костномозговое происхождение предшественников фибробластов доказано экспериментально и не вызывает сомнений [34]. Дальнейший научный поиск, связанный с идентификацией конкретного вида стволовой клетки, являющейся первым звеном фибробластического дифферона, привел к установлению факта, что как ГСК [35–37], так и MMCK [38–41] в равной степени являются предшественниками фибробластов в пост-натальном периоде онтогенеза.

Кроме того, в системном кровотоке также обнаружены популяции клеток, способные к дифференцировке в фибробластическом направлении, которые, по всей видимости, являются ближайшими потомками ГСК и MMCK, мигрирующими в ткани [2].

Так, R. Bucala с соавт. (1994) описали популяцию клеток (коллаген +/виментин +/ CD34 +), названных ими «фиброцитами периферической крови» (ФПК), устремляющихся к местам повреждения кожи, где активно участвуют в процессах репаративной регенерации [42]. Экспрессия ими ряда гемопоэтических маркеров в определенной степени свидетельствует о цитогенезе из ГСК [2, 43]. Показано, что хотя доля этих клеток составляет только 0,5% белых клеток периферической крови, в ране они насчитывают 10% от всех инфильтрирующих поврежденную ткань клеток [42]. Более того, ФПК индуцируют ангиогенез, продуцируя ангиогенные факторы [43, 44], синтезируют цитокины для привлечения CD4⁺ лимфоцитов и других клеток воспаления [45], экспрессируют антигены, в частности CCR7, для активации миграции клеток к ране [46].

В то же время из крови получены так называемые «циркулирующие в кровотоке предшественники соединительных тканей», экспрессирующие остеоонектин, α -SMA, CD44, CD106, CD29, в сочетании с отрицательной реакцией на антитела к гемопозитическим маркерам CD45/CD14, способные адгезироваться к поверхности культурального пластика и дифференцироваться не только в фибробластическом, но и в остео-, хондробластическом и адипоцитарном направлениях, что в совокупности соответствует морфофункциональным особенностям ММСК [47, 48].

В связи с наличием выраженных различий в функциональном профиле фибробластов папиллярного и ретикулярного слоев дермы, а также значительным числом принципиально отличающихся клеточных источников их происхождения, трудно не согласиться с мнением M. Sorrel и A. Carlan (2004), что термин «дермальные фибробласты»

сильно упрощен [15]. По всей видимости, слово «фибробласт» следует считать чисто фенотипической категорией, объединяющей целый ряд различных в цитогенетическом аспекте клеточных линий [2].

Таким образом, фибробласты в интересах дальнейшего клинического применения могут быть получены не только непосредственно из дермы уже в определенной степени дифференцировки, но и из клеток-предшественниц, локализующихся в коже, системном кровотоке и красном костном мозге. Однако теоретической основой эффективного клинического применения является не только определение клеточного источника фибробластов дермы, но и установление изменений их морфофункциональных особенностей в возрастном аспекте, а также достоверных критериев, позволяющих отнести клеточную культуру к популяции фибробластов.

Таблица 1. Типы клеток-предшественниц, идентифицированных в дерме

Название клеток-предшественниц	Возможные направления дифференцировки, помимо фибробластического	Дополнительная информация	Литература
Клетки-предшественницы кожи (SKPs)	Остео-, хондро-, адипоцитарное, нейрональное, миогенное направления, перициты	Происходят из ниши дермального сосочка волосяного фолликула, изолированы из дермы крайней плоти и кожи кролика	[17, 18, 20, 26]
Мультипотентные дермальные фибробласты (MDFs)	Остео-, хондро-, адипо-, гепатоцитарное, нейрональное направления, инсулин-продуцирующие клетки	Выделены из ювенильной крайней плоти человека	[16, 28]
Фибробластоподобные мезенхимные стволовые клетки (FMSCs)	Остео-, адипоцитарное направления	Выделены из ювенильной крайней плоти, представляют собой доминантную клеточную популяцию	[19]
Предполагаемые мезенхимные стволовые клетки дермы	Адипо-, хондро-, миогенное направления		[113]
Стволовые клетки дермы	Адипо-, хондро-, остео-, миогенное, эндотелиальное направления	Предположительно активируются при реализации процессов репаративной регенерации дермы	[22, 114]
Стволовые клетки волосяного фолликула	Эритроидное и миелоидное направления	Происходят из структур волосяного фолликула (терминальная луковица, дермальный сосочек, соединительнотканная оболочка)	[115, 116]
Клетки-предшественницы кожи (SKPs)	Мезодермальное и нейрональное направления	Выделены из ниш вне дермального сосочка волосяного фолликула	[27]
Фиброциты из костного мозга	Миофибробластическое направление	Играют роль в процессе воспаления (презентация антигенов, взаимодействие с Т-клетками, продукция провоспалительных и ангиогенных факторов, необходимых для формирования новых кровеносных сосудов)	[40, 43]

Окончание таблицы 1

Название клеток-предшественниц	Возможные направления дифференцировки, помимо фибробластического	Дополнительная информация	Литература
Эндотелиальные клетки-предшественницы из костного мозга	Эндотелиальное направление	Мигрируют в зоны роста новых кровеносных сосудов. Обнаруживаются на ранней стадии процесса заживления ран	[117, 118]
Периваскулярные клетки	Остео-, адипо-, и хондрогенное направления		[11, 14]
Дермальные мезенхимные стволовые клетки (MSCs)	Остео-, адипо- и миогенное направления	Изолированы из крайней плоти	[22]

Функциональная часть фибробластического дифферона

Префибробласты — коммитированные в фибробластическом направлении мелкие округлые клетки, обладают высоким пролиферативным потенциалом, благодаря чему поддерживают необходимую в конкретных условиях численность популяции фибробластов [49, 50]. Учитывая факт локализации префибробластов, главным образом, вблизи сосудов микроциркуляторного русла [49], наибольшая плотность которой наблюдается в области двух капиллярных сетей, разграничивающих папиллярный, ретикулярный слой и гиподерму [1], можно предположить, что именно в данной области сосредоточен основной пул малодифференцированных предшественников фибробластов. При этом папиллярный слой относительно ретикулярного имеет более обильное кровоснабжение из-за необходимости обеспечения трофики эпидермиса и выполнения кожей функции терморегуляции [1]. Возможно, по причине большей плотности сосудов фибробласты наружного слоя дермы продуцируют большее количество коллагена III типа, нежели клетки ретикулярного слоя [51]. S. Mine с соавт. (2008) показали при помощи клонального анализа более высокую скорость удвоения популяций фибробластов папиллярного слоя по сравнению с фибробластами ретикулярного слоя, при условии получения из одного и того же участка кожи. Данная закономерность может быть связана с преобладанием в первом малодифференцированных предшественников [52].

Юные фибробласты характеризуются сохранением пролиферативной активности, но уже участвуют в организации МКМ [49].

Дифференцированные фибробласты — основная клеточная популяция фибробластического дифферона дермы, обеспечивающая ее морфофункциональную организацию и гомеостаз за счет выполнения ключевых функций: структурной, регуляторной, ремоделяционной, репаративной. В этой связи и в свете наиболее выраженных различий в выполнении структурной функции целесообразно охарактеризовать особенности цитофизиологии фибробластов в соответствии с локализацией в слоях кожи.

Так, дифференцированные фибробласты эпителиально-дермального соединения, как и кератиноциты, продуцируют основные компоненты базальной мембраны — коллагены IV типа, гликопротеины и лами-

нины [1, 53–59]. Кроме того, секретируют энтактин/нидоген [55], формирующий плотные нековалентно связанные комплексы с ламинином и в меньшей степени коллагеном IV типа, тем самым выступая в качестве связующего звена между некоторыми компонентами межклеточного матрикса (МКМ), а также тенасцин, модулирующий «эпителиально-мезенхимальные взаимодействия» [60]. Более того, фибробластам принадлежит важная роль в регуляции эпидермального гистогенеза за счет взаимодействия с эпителиальными клетками и секреции ряда биологически активных веществ: фактора роста кератиноцитов (KGF-1), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), интерлейкинов (IL-6, IL-8), индуцирующих пролиферацию эпителиоцитов [61–64], а также трансформирующего фактора роста- β 1 (TGF- β 1), ингибирующего деление эпителиальных клеток, но стимулирующего их дифференцировку и апоптоз [5].

Фибробласты папиллярного слоя дермы формируют основные компоненты МКМ рыхлой волокнистой соединительной ткани — ряд коллагеновых белков (I, III, VI, V, VI, XII, XVII) [65], эластин, гиалуроновые кислоты и протеогликаны (тенасцин-C), а также ферменты, участвующие в посттрансляционном процессинге структурных белков и катаболических реакциях [1, 56]. В связи с тем, что в папиллярном слое локализуются также представители других клеточных дифферонов (макрофаги, тканевые базофилы, лейомиоциты, пигментные клетки и др.) [1, 55], объяснима экспрессия фибробластами таких биологически активных веществ, как TGF- β 1, GM-CSF и др. [5, 60], стимулирующих хоуминг этих клеток. Тонкие коллагеновые и эластические волокна расположены в виде сети, с преобладанием параллельной поверхности тела ориентации [1]. В этой связи, биологическая целесообразность наружного слоя дермы заключается в регуляции и обеспечении трофики эпидермиса, сопротивлению кожи растяжению, акцепции внешних сигналов/воздействий и осуществлении начальных этапов реакции на них, в реализации которых значимая роль принадлежит фибробластам.

Дифференцированные фибробласты ретикулярного слоя дермы характеризуются несколько иными акцентами функционального профиля — продуцируют фибриллярные компоненты МКМ, характерные для плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани: коллагены (I, III, VI, XIV), обладающие

большим диаметром и образующие сложную трехмерную сеть, эластин и аморфное вещество МКМ: гликозаминогликаны, протеогликианы (версикан, декорин (нейтрализует TGF- β), тенасцин-X), ферменты (металлопротеиназы) [1, 49, 51]. При этом ретикулярный слой дермы не отличается разнообразием клеточных типов — в нем преобладают дифференцированные фибробласты и фиброциты [1].

Важно, что стабильность различий функциональных особенностей фибробластов папиллярного и ретикулярного слоев сохраняется и при культивировании их *in vitro*, что, предположительно, может быть связано с влиянием генов семейства AP-1, ДНК-последовательности homeobox, их регуляторов [55].

Несмотря на поддержание специфики функций наружного и внутреннего слоев дермы через различия функционального профиля фибробластов, входящих в их состав, для основных клеток волокнистых соединительных тканей характерна и общая роль в обеспечении морфофункциональной организации и гомеостаза кожи.

Фиброциты — конечное звено фибробластического дифферона, характеризующееся высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, низкой секреторной активностью и участием в регуляции обменных процессов в дерме [1, 49].

Функции фибробластов дермы

Функция формирования и репарации дермы. Фибробласты обеспечивают морфофункциональную организацию кожи не только в физиологических условиях, но и при патологии — активно участвуют в восстановлении ее целостности после повреждений во взаимодействии с другими клетками кожи и мигрирующими в зону дефекта форменными элементами крови, т.е. реализуют как физиологический, так и репаративный гистогенез в дерме [1, 49, 50, 66, 67]. Первыми с током крови в зону повреждения устремляются тромбоциты, моноциты/ макрофаги, дегрануляция которых приводит к высвобождению TGF- β и др., которые, помимо модуляции функциональной активности фибробластов, индуцируют их хемотаксис, а также стимулируют миграцию нейтрофилов [50]. Процесс активации фибробластов сопровождается усилением пролиферативной активности, хоумингом к месту повреждения, дифференцировкой в премиофибробласты, активно продуцирующие коллаген, фибронектин и организующие МКМ, служащий «опорой» для других клеток. В последующем премиофибробласты под влиянием специфических факторов (TGF- β 1, эпидермальный фактор роста (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста фибробластов-2 (FGF-2)) и механического напряжения дифференцируются в *миофибробласты*, обладающие выраженным сократительным аппаратом (α -гладкомышечный актин, миозин), ответственные за контракцию регенерата [68]. Миофибробласты апоптозом элиминируются из места повреждения и замещаются фибробластами, регулируемыми состав и ремоделирование новообразованного МКМ [55, 60].

Регуляторная функция. Фибробласты дермы продуцируют комплекс проангиогенных факторов: VEGFs, FGFs, TGF- β 1, HGF/SF и ангиопоэтин-1 [26 69], которые вовлечены в регуляцию процессов ангиогенеза — индуцируют миграцию и дифференцировку эндоте-

лиальных клеток, способствуют образованию сосудов [70, 71, 15].

Значимое место фибробласты дермы занимают в системе нейро-эндокринной регуляции кожи. Они способны синтезировать биологически активные пептиды — гормоны, биогенные амины, нейропептиды и нейротрансмиттеры, идентичные таковым в центральной нервной и эндокринных системах [72], пролактин, идентичный гипоталамическому [73], экспрессируют ген гормона роста [74]. Фибробласты дермы характеризуются наличием рецепторов андрогенов и эстрогенов, через которые реагируют на гормональные влияния, опосредуя действие половых гормонов на кожу человека [75].

Немаловажную роль фибробласты дермы играют в регуляции иммунного ответа. По мнению Н.П. Омеляненко (2009), фибробласты можно рассматривать как «сторожевые» клетки, организующие ответы соединительной ткани на инфекцию или повреждение [56]. Так, С.G. Larsen и соавт. (1989) продемонстрировали участие фибробластов дермы в реализации механизмов взаимодействия иммунокомпетентных клеток. В условиях *in vitro* показаны их иммуносупрессорные и иммуномодулирующие свойства [76]. В 1981 г. J.H. Korn показал ингибирующее действие фибробластов на митогенез и пролиферацию Т-клеток [77]. Кроме того, фибробласты синтезируют ряд основных посредников воспаления, одним из которых является фактор транскрипции RelB ядерного фактора kB, активирующий тучные клетки. При совместном культивировании фибробластов дермы и мастоцитов происходит усиление продукции последними гистамина [78]. С другой стороны, фибробласты подвержены регуляторным влияниям других клеток дермы. В частности, цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками, стимулируют (TGF- β , интерлейкин-1) и ингибируют (γ -интерферон) продукцию коллагена и фибронектина, снижают экспрессию протеаз (TGF- β), модулируют пролиферацию фибробластов (тромбоцитарный фактор роста) [79].

Функция ремоделирования матрикса. Ремоделирование МКМ — непрерывный процесс его изменения, приведения структуры в соответствие выполняемым функциям и оптимальному сопротивлению воздействующим механическим нагрузкам. Полная детализация механизмов ремоделирования далека от разрешения, однако накопилось множество противоречивых и разрозненных данных, раскрывающих этот процесс. По современным представлениям, в реализацию процессов ремоделирования на клеточном уровне вовлечено большинство клеточных типов дермы, однако именно представители фибробластического дифферона являются ведущим исполнительным элементом. На субклеточном уровне ремоделирование МКМ осуществляется за счет взаимодействия компонентов МКМ, поверхностных рецепторов клеток, цитоскелета, протеаз и их активаторов (плазмин, катепсины В и L)/ингибиторов (тканевые ингибиторы металлопротеиназ, TIMP) [60]. В ходе ремоделирования под действием ряда цитокинов (интерлейкин-1 β , фактор некроза опухолей- α) фибробласты продуцируют прометаллопротеиназы, активируемые в МКМ плазмином и катепсинами. В результате происходит разрушение компонентов МКМ, продукты деградации которого посредством эндоцитоза поступают в фибробласты,

где по механизму отрицательной обратной связи увеличивают экспрессию TIMP, блокирующих протеолиз [79]. Аналогичную роль – ремоделирование МКМ – выполняют фиброкласты, но не за счет синтеза его компонентов, а посредством их лизиса [49].

Таким образом, фибробласты – основа морфофункциональной организации и гомеостаза кожи, являются ведущим исполнительным элементом регуляторных влияний как общего (нейро-эндокринная система), так и местного (цитокины, межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия) уровней. Специфика функционального профиля фибробластов разных слоев дермы предопределяет функциональные различия папиллярного и ретикулярного слоев. Следует заключить, что именно фибробласты дермы должны быть основной точкой приложения терапевтических вмешательств при патологии кожи, а также являться эффективным инструментом в рамках биотехнологий, позволяющим оптимизировать процессы репаративной регенерации кожи при их нарушении. Однако дальнейшая детализация цитофизиологии фибробластов, особенно в части, касающейся источников их цитогенеза, возрастных изменений и специфики функциональных параметров в зависимости от локализации, крайне необходима для обоснования выбора конкретной популяции фибробластов в случае их клинического применения.

Возрастные изменения цитофизиологии фибробластов

После выяснения особенностей цитофизиологии фибробластов и их значения в морфофункциональной организации и поддержании гомеостаза кожи в физиологических условиях, представляются закономерными следующие вопросы: как меняются цитофизиологические характеристики популяции фибробластов с возрастом (*in vitro* и *in vivo*) и как они отражаются на строении и функциях кожи? Решение этого аспекта общей современной концепции о фибробластах имеет принципиальное значение как для понимания генеза «старения», так и для клинической практики: для обоснования выбора доноров клеток, определения показаний, прогнозирования течения и результатов терапевтического применения фибробластов дермы. В этой связи, исследования возрастных изменений и их морфофункциональной активности проводятся на протяжении последних нескольких десятилетий.

Первые различия между популяциями фибробластов дермы, выделенных от молодых и старых доноров, проявляются еще на стадии получения клеточной культуры: показана статистически значимая более медленная миграция клеток пожилых людей из биоптатов кожи на поверхность культурального пластика [80, 81]. Способность любых клеток к передвижению определяется функционированием системы «цитоскелет – поверхностные рецепторы МКМ – волокнистые компоненты МКМ – специфические ферменты» [82]. *In vitro* показано, что с возрастом наблюдается увеличение размеров фибробластов дермы, повышение содержания и уплотнение компонентов их цитоскелета: даже при световой микроскопии становятся заметными актиновые фибриллы, располагающиеся близко друг к другу, формируя «пласт» на вентральной стороне цитоплазмы, увеличивается удельное содержание микротрубочек и их организационных центров, промежуточных фи-

ламентов, образующих фибриллярные структуры в виде слоев и тяжей [83]. Снижение миграционной способности фибробластов дермы, оптимальный уровень которой необходим для нормального течения репаративных процессов в коже, обусловлено не только дезорганизацией актинового цитоскелета, но и пониженной экспрессией и функцией $\alpha\beta1$ -интегринов, связывающихся с ламинином и коллагеном I типа. При этом продукция и активность металлопротеиназ, также необходимых для передвижения фибробластов в межклеточном веществе соединительной ткани, с возрастом практически не изменяется [83]. Более того, биометрическими методиками показано возрастное увеличение жесткости фибробластов дермы (на 60% при сравнении доноров от 27 до 81 года), основанное на превращении глобулярного G-актина в фибриллярный F-актин, в то время как виментин остается без изменений. Повышение «напряженности» фибробластов дермы в процессе старения организма сопряжено со снижением вязкоэластических свойств организуемого ими коллагенового матрикса [84], а также может служить причиной снижения пролиферативной активности [83].

Другие значимые различия между фибробластами дермы молодых и пожилых людей касаются пролиферативных потенциалов. Так, при инкубировании *in vitro* фибробласты доноров в возрасте 60–80 лет подвергаются более быстрому «старению», один из основных показателей которого – понижение скорости удвоения культуры в виде невозможности достичь конfluenceности монослоя в течение двух недель [81]. Отставание наблюдается не только в скорости пролиферативного процесса, но и в числе клеточных делений: фибробласты молодых доноров характеризуются в два раза большим количеством митозов, благодаря чему одна клетка (таких 60%) способна образовать колонию в 256 и более фибробластов, а в случае пожилых доноров – лишь 2% клеток формируют колонии подобного объема [81, 85]. Обоснованием меньшего количества клеточных делений может служить лимит Хейфлика (Hayflick limit), согласно которому соматические клетки, не экспрессирующие теломеразу, способны в среднем лишь на 50 удвоений популяции [86], а фибробласты пожилых доноров до выделения *in vitro* уже прошли ряд клеточных циклов. С возрастом показано также увеличение частоты апоптозов в популяции фибробластов [87]. Закономерным исходом снижения пролиферативной активности фибробластов дермы и повышения количества апоптозов являются результаты исследования J. Varani с соавт. (2006), которые, анализируя биоптаты кожи людей в возрасте 18–29 и 80 лет и старше, показали, что общее количество фибробластов в группе пожилых доноров снижено приблизительно на 35% по отношению к молодым [88]. Аналогичные данные получены S. Nolte с соавт. (2008), которые предположили, что причиной возрастного уменьшения популяции фибробластов дермы является превалирование в процессе старения клеток с низким пролиферативным потенциалом [5].

Третья группа изменений цитофизиологии фибробластов дермы связана с их синтетической активностью в виде продукции различных веществ как для нужд самой клетки, так и «на экспорт».

В экспериментах 70-х годов XX в., авторы зачастую указывали на отсутствие статистически

значимых различий во внутриклеточном содержании РНК и белков, однако их качественный состав не исследовался [81]. К настоящему же времени накопилось большое количество данных, показывающих значительные изменения качественного состава внутриклеточных структурных элементов фибробластов, коррелирующих с возрастом организма. В частности, обнаружено достоверное снижение синтеза митохондриальных белков фибробластов дермы, полученных от людей старше 40 лет, сопряженное с потерей митохондриального мембранного потенциала, со снижением процессов клеточного дыхания, эффективности окислительного фосфорилирования и пониженным синтезом АТФ [89].

В процессе старения наблюдается также снижение продукции компонентов МКМ соединительных тканей дермы. Так, J. Varani и соавт. (2000) показали, что общая продукция коллагена в коже людей 80 лет и старше снижена примерно на 75% относительно молодых людей (18–29 лет) [90], что, по всей видимости, связано как с понижением синтетической активности фибробластов дермы, так и уменьшением общей численности их популяции. При этом наблюдается параллельное снижение продукции коллагена I и III типов с изменением их соотношения в пользу коллагена I типа [91]. Снижение в дерме уровня коллагена считают одним из главных индикаторов ослабления функционирования фибробластов дермы [88].

Таким образом, процесс возрастных изменений сводится к уменьшению численности популяции фибробластов, снижению их пролиферативной и синтетической активности, что закономерно проявляется изменением количественного и качественного состава МКМ дермы. Следовательно, клетки фибробластического дифферона должны быть определены как основной эффектор и точка приложения терапевтического воздействия при коррекции дефектов кожи для возможного клинического применения в рамках регенерационной медицины.

Возможности клинического применения

Наибольшие успехи достигнуты в экспериментальных и клинических исследованиях, направленных на определение эффективности использования дермальных эквивалентов (ДЭ) для коррекции дефектов кожи. ДЭ представляет собой результат совмещения носителя (различные варианты коллагена, фибринового геля, полилактина и пр.) и культуры аллогенных или аутогенных фибробластов [92]. При этом разрабатываются как двухмерные (клетки адгезируются на поверхность матрикса), так и трехмерные (фибробласты локализованы по всей толщине носителя) графты. Фибробласты используются также для создания комбинированных «аналогов кожи», структура которых предполагает расположение еще и кератиноцитов в один или несколько слоев. К настоящему времени прошел клиническую апробацию и запатентован целый ряд коммерческих препаратов, состоящих из бычьего коллагена I типа, аллогенных фибробластов и кератиноцитов [93].

С учетом того, что возрастные изменения цитофизиологии фибробластов в значительной степени определяют ухудшение морфофункциональной организации дермы в процессе старения, активно разрабатываются подходы, предполагающие использование фибробластов для коррекции возрастных

нарушений структуры кожи. Предполагается, что введение функционально активных «молодых» клеток, не исчерпавших лимит митозов, обладающих выраженным синтетическим потенциалом, приведет к восполнению уменьшенного пула резидентных фибробластов дермы и нормализует состав и строение МКМ дермы в области трансплантации. Впервые специалисты компании Isolagen в 1995 г. применили фибробласты дермы для коррекции морщин и рубцов-постакне, доказав безопасность и клиническую эффективность технологии [94–100]. Впоследствии многие исследовательские группы указали на аналогичные положительные результаты, выраженные в виде увеличения продукции коллагена [97, 101–105], эластина, усиление эпидермально-гистогенеза, стимуляции резидентной популяции фибробластов дермы [102].

Менее многочисленны работы, исследующие применение фибробластов в других областях медицины, как то урология, сердечно-сосудистая, челюстно-лицевая, нейрохирургия, стоматология и др. Принципиальные технологические аспекты, в основном, соответствуют таковым в части создания ДЭ: фибробластами заселяют носитель из органического материала с возможным включением других клеточных типов (эндотелиоциты, эпителиальные клетки слизистой мочевого пузыря, уретры), получая графт, пригодный для трансплантации [106]. Специфические технологические этапы связаны с конкретной областью применения и необходимыми характеристиками создаваемых графтов. В частности, T.N. McAllister с соавт. (2009) в клиническом исследовании показали приемлемые результаты применения биоинженерного прототипа сосуда в качестве артериовенозного доступа для выполнения гемодиализа. При этом для создания графта сосуда авторы в процессе культивирования фибробластов дермы на желатине получали «клеточные листья», которые оборачивали вокруг стальных мандренов (диаметром 4,8 мм) до сопоставления противоположных сторон и инкубировали 10 нед., после чего мандрены извлекали, внутренний слой полученных «трубок» девитализировали высушиванием на воздухе и заселяли эндотелиальными клетками [107].

В экспериментальных исследованиях в области нейрохирургии положительный эффект получен при эмболизации артериальных аневризм хитозан-глицерофосфатным гидрогелем, содержащим фибробласты дермы [108]. Кроме того, в виду доступности получения и культивирования они используются в большом количестве исследований по репрограммированию в качестве исходной клеточной популяции [109–111].

Таким образом, возможности клинического применения фибробластов чрезвычайно широки, а результаты экспериментальных и клинических исследований в значительной степени успешны. Однако для продвижения медицинских технологий, предполагающих использование фибробластов, по аналогии с ММСК, необходимо принятие унифицированных достоверных критериев отнесения клеток к популяции фибробластов. Задача осложняется тем фактом, что, несмотря на экспрессию большого числа клеточных антигенов (табл. 2), ни один из них не является эксклюзивным маркером фибробластов [61]. Так, фибробласты дермы характеризуются экспрессией мезенхимных (CD44, CD73, CD90, CD105,

виментин) и отсутствием эпителиальных, гемопозитических и эндотелиальных маркеров (CD31, CD34, CD45) [2, 15]. При этом, например, поверхностный клеточный антиген Thy-1/CD90 продуцирует все их популяции (предполагается, что он регулирует адгезию фибробластов, организацию цитоскелета и миграцию клеток) [70], но, в то же время, Thy-1/CD90 является одним из трех обязательных поверхностных антигенов дифференцировки ММСК [2]. Другие маркеры, характерные для фибробластов кожи, такие как структурные белки промежуточных филаментов цитоскелета виментин и десмин, по-

мимо всех фибробластоподобных, экспрессируются и другими клетками (см. табл. 2).

На сегодняшний день два маркера — белки FSP1 (член семейства внутриклеточных белков S100) и FAP α (белок активации фибробластов) считаются наиболее специфичными для идентификации фибробластов [10, 15, 61, 112], хотя они также не являются эксклюзивными. В этой связи, идентификация фибробластов основывается на комплексе функциональных и иммунофенотипических параметров, конкретный перечень которых требует уточнения и унификации.

Таблица 2. Основные маркеры фибробластов ([61] с изм.)

Маркёр	Характеристика	В каких клетках, помимо фибробластов, обнаружен
Виментин	Белок, связанный с промежуточными филаментами	Эндотелиальные клетки, миоэпителиальные клетки и нейроны
α -гладкомышечный актин (α -smooth muscle actin, α -SMA)	Белок, связанный с промежуточными филаментами	Гладкомышечные клетки сосудов, перициты и миоэпителиальные клетки
Специфический белок фибробластов (<i>Fibroblast-specific protein-1</i> , FSP1)	Белок, связанный с промежуточными филаментами	Клетки некоторых карцином
Рецептор 2, содержащий дискоидиновый домен	Рецептор к коллагену	Эндотелиальные клетки
Белок активации фибробластов (<i>Fibroblast activation protein-α</i> , FAP α)	Сериновая протеаза	Активированные меланоциты
$\alpha_1\beta_1$ -интегрин	Рецептор к коллагену	Моноциты и эндотелиальные клетки
Пролил-4-гидроксилаза	Биосинтез коллагена	Эндотелиальные, эпителиальные
Проколлаген I α 2	Биосинтез коллагена I типа	Остеобласты и хондробласты

Заключение

Несмотря на колоссальное количество исследований, касающихся фибробластов в целом и фибробластов дермы в частности, современная концепция об их цитогенезе, цитофизиологии, специфике функционального профиля в зависимости от источников происхождения, топической локализации, сопутствующей соматической патологии организма и прочих факторов все еще содержит множество нераскрытых дискуссионных вопросов.

Очевидно, что фибробласты дермы — ведущий элемент в системе обеспечения морфофункцио-

нальной организации кожи и поддержании ее гомеостаза, оказывающий непосредственное влияние на течение структурных, ремоделяционных, регуляторных, репаративных и других процессов, происходящих в коже в норме, в процессе старения и при патологии. В этой связи, клетки фибробластического дифферона должны рассматриваться и как индикатор развития патологии в коже, и как ключевой эффектор и точка приложения терапевтических вмешательств в регенерационной медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данилов Р.К. Общие принципы клеточной организации, развития и классификации тканей. Руководство по гистологии. Т.1. Санкт-Петербург: СпецЛит; 2001.
2. Бозо И.Я., Деев Р.В., Пинаев Г.П. «Фибробласт» — специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? Цитология 2010; 52(2): 99–109.
3. Stephens P., Genever P. Non-epithelial oral mucosal progenitor cell populations. Oral Diseases 2007; 13: 1–10.
4. Байрейтер К., Франц П., Родеман Х. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старе-

нии, апоптозе и трансформации. Онтогенез 1995; 26(1): 22–37.

5. Nolte S.V., Xu W., Rennekampff H.O. et al. Diversity of fibroblasts — a review on implications for skin tissue engineering cells tissues organs. Cells Tissues Organs 2008; 187: 165–76.

6. Herskind C., Bentzen S., Overgaard J. et al. Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. Radiother. Oncol. 1998; 47: 263–9.

7. Rodemann H., Bayreuther K., Francz P. et al. Selective enrichment and biochemical characterisation of seven fibroblast cell types of human skin fibroblast populations in vitro. Exp. Cell Res. 1989; 180: 84–93.

8. Hakenjos L., Bamberg H., Rodemann H. et al. TGF- β 1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic response. *Int. J. Radiat. Biol.* 2000; 76: 503–9.
9. Dimri G., Lee X., Basile G. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *PNAS USA* 1995; 92: 9363–7.
10. Covas D., Panepuccia R., Fontes A. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146⁺ perivascular cells and fibroblasts. *Exp. Hematol.* 2008; 36: 642–54.
11. Doherty M., Ashton B., Walsh S. et al. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 1998; 13: 828–38.
12. Doherty M.J., Canfield A.E. Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 1999; 9: 1–17.
13. Diaz-Flores L., Gutierrez R., Varela H. et al. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol.* 1991; 6: 269–86.
14. Farrington-Rock C., Crofts N., Doherty M. et al. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 2004; 110: 2226–32.
15. Sorrell M., Caplan A.I. Fibroblasts – a diverse population at the center of it all. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2009; 276: 161–214.
16. Chen F., Zhang W., Bi D. et al. Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J. Cell Sci.* 2007; 120: 2875–83.
17. Toma J., Akhavan M., Fernandes K. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3: 778–84.
18. Toma J., McKenzie I., Bagli D. et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 2005; 23: 727–37.
19. Lorenz K., Sicker M., Schmelzer E. et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 2008; 17: 925–32.
20. Fernandes K., Toma J., Miller F. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2008; 363: 185–198.
21. Young H., Steele T., Bray R. et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat. Rec.* 2001; 264: 51–62.
22. Bartsch G., Yoo J., De Coppi P. et al. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev.* 2005; 14: 337–48.
23. Киселева Е.В., Черных Э.С., Воротеляк Е.А. и др. Сравнение дифференцировочных потенциалов фибробластоподобных клеток стромы костного мозга, жировой ткани, волосяного сосочка и фибробластов дермы человека. *Цитология* 2009; 51(1): 12–9.
24. Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y. et al. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev. Dyn.* 2004; 231: 258–69.
25. Lorenz K., Sicker M., Schmelzer E. et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 2008; 17: 925–32.
26. Lavoie J-F., Biernaskie J., Chen Y. et al. Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem cells develop.* 2009; 18(6): 893–905.
27. Gago N., Perez-Lopes V., Sanz-Jaka J. et al. Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells* 2009; 27: 1164–72.
28. Bi D., Chen F., Zhang W. et al. Differentiation of human multipotent dermal fibroblast into islet-like cell cluster. *BMC Cell Biol.* 2010; 11: 46.
29. Bianco P., Robey P., Simmons P. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4): 313–9.
30. Fu X., Sun X. Can hematopoietic stem cells be an alternative source for skin regeneration? *Ageing Res. Rev.* 2009; 8(3): 244–9.
31. Martin-Ruiz C., Saretzki G., Petrie J. et al. Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative lifespan. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(17): 17826–33.
32. Middelkoop E. Fibroblast phenotypes and their relevance for wound healing. *Int. J. Low extrem. Wounds.* 2005; 4: 9–11.
33. Sellheyer K., Krahl D. Skin mesenchymal stem cells: prospects for clinical dermatology. *J. Am Acad. Dermatol.* 2009; 10(1016): 1–7.
34. Хрущов Н.Г. Гистогенез соединительной ткани: Экспериментальные исследования происхождения фибробластов. Москва: Наука; 1976.
35. Ланге М.А. Авторадиографическое исследование происхождения и обновления фибробластоподобных элементов очага новообразования соединительной ткани (диссертация). Москва; 1975.
36. Friedenstein A.J., Deriglasiya U.F., Kulagina N.N. et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 1974; 2(2): 83–92.
37. Ogawa M., LaRue A.C., Drake C.J. Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: its pathophysiologic implications. *Blood* 2006; 108(9): 2893–6.
38. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276 (5309): 71–4.
39. Lama V.N., Phan S.H. The Extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2006; 3(4): 373–6.
40. Щелкунов С. Интима мелких артерий и вен. *Арх. Биол. Наук.* 1935; 37(3): 609–37.
41. Chang H.Y., Chi J.T., Dudoit S. et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS USA* 2002; 99(20): 12877–82.
42. Bucala R., Spiegel L., Chesney J. et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol. Med.* 1994; 1: 71–81.
43. Quan T., Cowper S., Wu S. et al. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 598–606.
44. Hartlapp I., Abe R., Saeed R. et al. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J.* 2001; 15: 2215–24.
45. Chesney J., Bacher M., Bender A. et al. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *PNAS USA* 1997; 94: 6307–12.
46. Abe R., Donnelly S., Peng T. et al. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J. Immunol.* 2001; 166: 7556–62.
47. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Leet A.I. et al. Circulating connective tissue precursors: extreme rarity in humans and chondrogenic potential in guinea pigs. *Stem Cells* 2007; 25(7): 1830–9.
48. Levesque J.P., Winkler I.G. Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the art. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2008; 13(1): 53–8.
49. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). Москва: Медицина; 1981.
50. Юрина Н.А., Радостина А.И. Морфофункциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани: Монография. Москва: Изд-во УДН; 1990.
51. Lochner K., Gaemlich A., Südel K.M. et al. Expression of decorin and collagens I and III in different layers of human skin in vivo: a laser capture microdissection study. *Biogerontology* 2007; 8(3): 269–82.
52. Mine S., Fortunel N., Paveon H. et al. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: A New View of Skin Morphogenesis and Aging 2008; 3: 1–13.
53. Aumailley M., Rousselle P. Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biol.* 1999; 18: 19–28.
54. Moulin V., Auger F., Garrel D. et al. Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burns* 2000; 26: 3–12.
55. Sorrel J.M., Caplan A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* 2004; 117: 667–75.
56. Омеляненко Н.П., Л.И. Слуцкий. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). Москва: Известия; 2009.
57. Chang H., Chi J-T., Dudoit S. et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS* 2002; 99(20): 12877–82.
58. Lee D., Cho K. The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. *Arch. Dermatol. Res.* 2005; 296: 296–302.
59. Marionnet C., Pierrard C., Vioux-Chagnoleau C. et al. Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J. Inv. Dermatol.* 2006; 126: 971–9.
60. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. Москва: Медицина; 1995.
61. Kalluri R., Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Publishing Group* 2006; 6: 392–401.
62. Sorrell J., Baber M., Caplan A. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *J. Cell. Physiol.* 2004; 200: 134–45.
63. Ghalzouri A., Lamme E., Ponec M. Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 2002; 310: 189–99.
64. Boehnke K., Mirancea N., Pavesio A. et al. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *Eur. J. Cell Biol.* 2007; 86: 731–46.
65. Жукова О., Потеева Н., Стенько А. и др. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи. *Клиническая дерматология и венерология* 2009; 3: 4–9.
66. Haniffa M., Collin M., Buckley C. et al. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts new clothes? *Haematologica* 2009; 94 (2): 258–63.
67. Tomasek J., Gabbiani G., Hinz B. et al. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Mol. Cell Biol.* 2002; 3: 349–63.

68. Gabbiani G., Majno G., Ryan G.B. The fibroblast as a contractile cell: the myofibroblast. In: *Biology of fibroblast*. London; 1973. p. 139–54.
69. Jain R. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 2003; 9: 685–93.
70. Sorrel J., Baber M., Caplan A. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. *Cell Tissue Res.* 2003; 327: 499–510.
71. Supp D., Wilson-Landy K., Boyce S. Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. *FASEB J.* 2002; 16: 797–804.
72. Besedovsky H.O. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 1996; 17: 64–102.
73. Richards R.G., Hartman S.M. Human dermal fibroblast cells express prolactin in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 1996; 106(6): 1250–5.
74. Wu H, Devi R, Malarkey W.B. Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system – a clinical research center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; 81(3): 1278–82.
75. Ashcroft G.S., Greenwell-Wild T, Horan M.A. et al. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J. Pathol.* 1999; 155(4): 1137–46.
76. Larsen C.G., Anderson A.O., Oppenheim J.J. et al. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 1989; 68(1): 31–6.
77. Korn J.H. Modulation of lymphocyte mitogen responses by cocultured fibroblast. *Cell Immunol.* 1981; 63(2): 374–84.
78. Hogaboam C.M., Steinhauser M.L., Chensue S.W. et al. Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int.* 1998; 54(6): 2152–9.
79. Davies M., Martin J., Thomas G.J. et al. Proteinases and glomerular matrix turnover. *Kidney Int.* 1992; 41: 671–7.
80. Soukupova M., Holeckova E. The latent period of explanted organs of newborn, adult and senile rats. *Exp. Cell Res.* 1964; 33: 361–7.
81. Schneider E.L., Mitsui Y. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *PNAS USA* 1976; 73(10): 3584–8.
82. Iudintseva N.M., Blinova M.I., Pinaev G.P. Characteristics of cytoskeleton organization of human normal postnatal, scar and embryonic skin fibroblasts spreading on different proteins of extracellular matrix. *Tsitologia* 2008; 50(10): 861–7.
83. Reed M.J., Ferrara N.S., Vernon R.B. Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors. *Mech. Ageing Dev.* 2001; 122(11): 1203–20.
84. Schulze C., Wetzel F., Kueper T. et al. Stiffening of human skin fibroblasts with age. *Biophys. J.* 2010; 99(8): 2434–42.
85. Smith J.R., Pereira-Smith O.M., Schneider E.L. Colony size distributions as a measure of in vivo and in vitro aging. *PNAS USA* 1978; 75(3): 1353–6.
86. Hayflick L. The cell biology of aging. *J. Invest. Dermatol.* 1979; 73(1): 8–14.
87. Mammone T, Gan D, Foyouzi-Youssefi R. Apoptotic cell death increases with senescence in normal human dermal fibroblast cultures. *Cell Biol. Int.* 2006; 30(11): 903–9.
88. Varani J., Dame M., Rittie L. et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin. Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *AJP* 2006; 168(6): 1861–8.
89. Greco M., Villani G., Mazzucchelli F. Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. *FASEB J.* 2003; 17(12): 1706–8.
90. Varani J., Warner R., Gharaee-Kermani M. et al. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J. Inv. Dermatol.* 2000; 114: 480–6.
91. Смирнова И.О. Функциональная морфология старения кожи. *Успехи геронтологии* 2004; 13: 44–5.
92. Iudintseva N.M., Pleskach N.M., Smagina L.V. et al. Reconstruction of the connective tissue as a result of transplantation of fibrous dermal equivalent to the wounds of experimental animals. *Tsitologia* 2010; 52(9): 724–8.
93. Зорин В.Л., Зорина А.И., Петракова О.С. и др. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009; 4(4): 26–40.
94. Boss W.K., Marko O. Isolagen. In: Klein A.W., editor. *Tissue augmentation in clinical practice*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1998. p. 335–47.
95. Watson D., Keller G.S., Lacombe V. et al. Autologous fibroblasts for treatment of facial rhytids and dermal depressions. A pilot study. *Arch. Facial Plast. Surg.* 1999; 1: 165–70.
96. Келлер Г., Себастиан Д., Лакомбе Ю. и др. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов. *Бюл. Эксп. Биол. Мед.* 2000; 130(8): 203–6.
97. Mentz H., Ruiz A., Patronella C. et al. Use of cultured autologous fibroblasts for facial rejuvenation. Annual meeting, American Society of Plastic Surgeons; Philadelphia, Pennsylvania; 2004.
98. Boss W.K., Usal H., Chernoff G. et al. Autologous cultured fibroblasts as cellular therapy in plastic surgery. *Clin. Plastic Surg.* 2000; 27(4): 613–26.
99. Boss W. K., Usal H., Fodor P.B. et al. Autologous cultured fibroblast: protein repair system. *Ann Plast Surg.* 2000; 44: 536–542.
100. Weiss R.A., Weiss M.A., Beasley K.L. et al. Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, phase III clinical trial. *Dermatol. Surg.* 2007; 33(3): 263–8.
101. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С. и др. Использование аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. *Вест. Эстет. Мед.* 2008; 7(2): 72–8.
102. Туманов В.П. Исследование эффективности использования культивированных аутофибробластов в системе anti-age. *Нов. Клин. Цит. России.* 2008; 3: 4.
103. Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Калинина Н.И. и др. Аутологичные фибробласты дермы: перспективы применения в медицине. В кн.: Качук В.А., редактор. *Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения*. Руководство для врачей. Москва: Литтерра; 2009. с. 222–33.
104. Зорина А., Зорин В., Черкасов В. и др. Применение аутологичных дермальных фибробластов человека для коррекции возрастных изменений кожи. X Международный симпозиум по эстетической медицине; 2011 Янв 26–28; Москва; 2011.
105. Зорин В., Зорина А., Черкасов В. и др. Качественная и количественная оценка состояния кожи лица после применения аутологичных дермальных фибробластов. *Вестник Эстетической Медицины* 2011; 10(2): 16–26.
106. Bouhout S., Perron E., Gauvin R. In vitro reconstruction of an autologous, watertight, and resistant vesical equivalent. *Tissue Eng. Part A.* 2010; 16(5): 1539–48.
107. McAllister T.N., Maruszewski M., Garrido S.A. et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet* 2009; 373: 1440–6.
108. Zhen Y., Xu K., Chen X.S. et al. Embolization of aneurysm by chitosan-glycerophosphate-fibroblast tissue hydrogel, a tissue engineering material: experiment with rabbits. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2009; 89(11): 727–31.
109. Takahashi K., Yamanaka S., Tanabe K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861–72.
110. Yu J., Vodyanik M.A., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917–20.
111. Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448(7151): 260–2.
112. Strutz F., Okada H., Lo C. et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J. Cell Biol.* 1995; 130: 393–405.
113. Seruya M., Shah A., Pedrotty D. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant.* 2004; 13(2): 93–101.
114. Chunmeng S., Tianmin C. Skin: a promising reservoir for adult stem cell populations. *Med. Hypotheses.* 2004; 62: 683–8.
115. Jahoda C., Reynolds A. Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth. *Dermatol. Clin.* 1996; 14: 573–83.
116. Lako M., Armstrong L., Cairns P. et al. Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haematopoietic system. *J. Cell Sci.* 2002; 115: 3967–74.
117. Roufosse C., Direkze N., Otto W. et al. Circulating mesenchymal stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36(4): 585–97.
118. Tepper O., Capla J., Galiano R. et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 2005; 105(3): 1068–77.

Поступила: 25.02.2011