

Дермальные фибробласты: разнообразие фенотипов, физиологических функций, возможности терапевтического применения

Алла Зорина, Вадим Зорин, Владимир Черкасов
doc_zorin@pisem.net



Об авторах:

Зорина Алла Ивановна, врач-биохимик, канд.мед.н., сотрудник Института Стволовых Клеток Человека

Зорин Вадим Леонидович, врач-биофизик, канд.биол.н., сотрудник Института Стволовых Клеток Человека, старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики НИИ Канцерогенеза, РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Черкасов Владимир Рюрикович, канд.хим.н., сотрудник Института Стволовых Клеток Человека

Сокращения, встречающиеся в тексте:

МКМ	межклеточный матрикс
ФП	фибробласты папиллярного слоя дермы
ФР	фибробласты ретикулярного слоя дермы
МФ	митотически активные фибробласты
ПМФ	постмитотические фибробласты
ММСК	мультипотентные мезенхимные стромальные клетки
ГСК	гемопозитические стволовые клетки
ММП	матриксная металлопротеиназа
SKPs	клетки-предшественники из кожи
MSCs	дермальные мезенхимные стволовые клетки
ДЭС	дермальноеэпидермальное соединение

ВСТУПЛЕНИЕ

Многочисленные клинические исследования продемонстрировали, что культивированные дермальные аутологичные фибробласты при их интрадермальном введении способны эффективно корректировать возрастные изменения кожи человека — толщину, упругость, количество и глубину морщин [1–6]. При этом отмечено, что пролиферативный потенциал дермальных фибробластов взрослого человека в течение всей его жизни остается на довольно высоком уровне — первичные культуры, полученные даже от очень пожилых людей (95 лет), содержат до 14% митотически активных фибробластов [7].

Каковы основы этого биологического феномена и какова роль дермальных фибробластов в поддержании микроструктуры кожи? Данный обзор посвящен этим и другим вопросам, связанным с регенеративными возможностями дермальных фибробластов.

СТРУКТУРА КОЖИ

Кожа человека состоит из трех слоев: наружного — эпидермиса (многослойного плоского ороговевающего эпителия), среднего — двухслойной дермы и внутреннего — гиподермы, состоящей преимущественно из жировых клеток (рис. 1) [8, 9].

Наружный слой кожи — эпидермис — прочно связан с подлежащей дермой посредством базальной мембраны, которая служит опорой для клеток и регулирует поступление питательных веществ из сосудов в клетки и удаление продуктов клеточного метаболизма. Волокнистая базальная мембрана — продукт совместной «работы» клеток эпидермиса — кератиноцитов и клеток дермы — фибробластов. Кератиноциты вырабатывают и организуют коллагены IV и VII типов, ламинины и перлекан [11]. Фибробласты, локализованные на границе дермы и эпидермиса, вырабатывают коллагены IV и VII типов, гликопротеины, ламинин-1 и энтактин/нидоген. При этом показано, что ключевую роль в данном процессе играют фибробласты папиллярного слоя дермы [8].

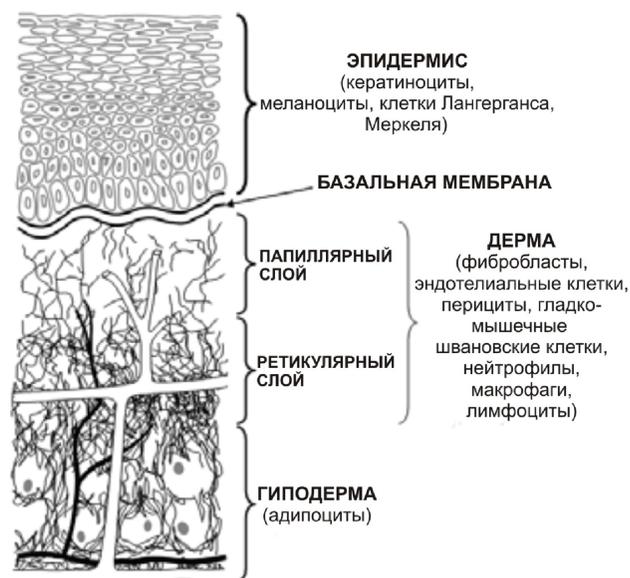


Рис. 1. Строение кожи и ее клеточный состав (по P. Stephens, P. Genever, 2007 [10])

Таблица 1. Компоненты межклеточного матрикса, синтезируемые дермальными фибробластами человека (Zouboulis C. с соавт., 2008 [18], дополнено авторами)

Класс веществ	Основные представители
Коллаген	Тип I, III, IV, V, VI, VII
Гликопротеины	Фибронектин, фибриллин, тромбоспондин, ламинин, тенасцин
Гликозаминогликаны	Гиалуроновая кислота, гепарансульфат, хондроитинсульфат
Протеогликаны	Версикан, декорин
Белки, модифицирующие матрикс	Матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы металлопротеиназ
Цитокины	IL-1, 6, 10, TNFα
Факторы роста	TGFβ, CSF-1, GM-CSF, PDGF, bFGF, IGF-1,2, NGF, KGF, HGF, SCF, VEGF
Хемокины	IL-8, MCP-1, GRO-1, MIP-1,2, RANTES, ENA-78
Медиаторы воспаления	Фосфолипаза A2, PGE2, простаглицлин, HETE, PAF, NO

Внутренний слой кожи — гиподерма — состоит из зрелых адипоцитов, сгруппированных в дольки, отделенные друг от друга тонкими соединительнотканными перегородками. Через эти перегородки проходит развитая сосудистая сеть, состоящая из артерий, вен, капилляров, лимфатических сосудов и нервов, которые осуществляют трофику ткани. Гиподерма играет роль механической опоры кожи и участвует в терморегуляции организма [10].

Особого внимания заслуживают волосные фолликулы, относящиеся к придаткам кожи [8]. Интерес к ним вызван тем, что в фолликулах взрослого человека обнаружены популяции дермальных и эпителиальных клеток с различными свойствами [10]. В луковицах волосных фолликулов найдена популяция стволовых клеток, участвующая в восстановлении кожи после ее повреждений. Показано, что по способности к дифференцировке стволовые клетки волосных фолликулов кожи не отличаются от мезенхимных стволовых клеток костного мозга [12].

Биосинтетические потенции фибробластов чрезвычайно велики: одна дифференцированная клетка в активном состоянии способна произвести до 3,5 млн макромолекул проколлагена в сутки.

Средний слой кожи — дерма [13, 14] — состоит преимущественно из межклеточного матрикса (МКМ), который, в свою очередь, представлен различными типами белков (таблица 1), продуцируемых фибробластами [8]. Биосинтетические потенции фибробластов чрезвычайно велики: одна дифференцированная клетка в активном состоянии способна произвести до 3,5 миллионов макромолекул проколлагена в сутки [11]. Наиболее значимым белком кожи является коллаген I типа, на долю которого приходится 80–90% от ее сухого веса. Коллаген IV типа составляет

основную часть базальных мембран эпидермальной зоны, сосудов и придатков кожи. Коллаген VII типа формирует прикрепляющие фибриллы папиллярного слоя дермы, VI типа — пронизывает всю дерму в виде нежной сети [15]. Фибриллярные (волоконнообразующие) коллагены I, III и V типов организуются в большие поперечно-связанные коллагеновые волокна, формирующие трехмерную структурную сеть дермы и во многом определяющие биомеханические свойства кожи [14]. Основной каркас дермы представлен волокнами, состоящими из коллагенов I и III типов, соотношение которых в коже меняется с возрастом [16]. Коллаген III типа — главный интерстициальный коллаген человека в эмбриональном и раннем постнатальном периоде. После рождения продукция коллагена I типа начинает превалировать над продукцией коллагена III типа, и их соотношение во взрослой коже составляет уже 6:1 [17]. Помимо коллагена фибробласты продуцируют другие фибриллярные компоненты матрикса (эластин, фибриллин), структурные белковые компоненты основного вещества МКМ — гликопротеины и протеогликаны, а также ферменты, участвующие в посттрансляционном процессинге структурных белков и катаболических реакциях [11].

В дерме выделяют два слоя, разделенных капиллярной сетью, — папиллярный (сосочковый) и ретикулярный (сетчатый) (рис. 2) [8]. Поверхностная часть папиллярного слоя дермы, находящаяся сразу под эпидермисом, организована в гребнеподобные структуры — так называемые дермальные сосочки, которые содержат микроваскулярные и нейральные компоненты, поддерживающие жизнедеятельность эпидермиса, и существенно увеличивают площадь эпидермально-мезенхимных взаимодействий [8].

Как в папиллярном, так и в ретикулярном слое дермы основными производителями МКМ служат фибробласты.

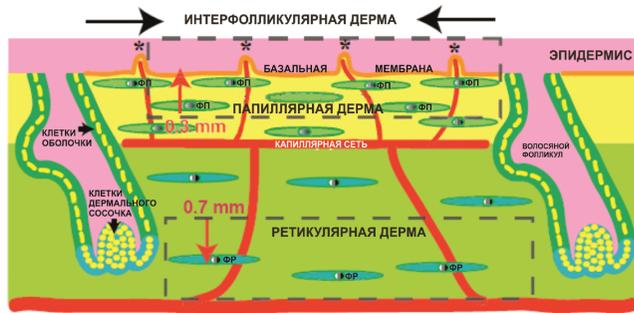


Рис. 2. Строение дермы (по Sorrell J.M., Caplan A.I., 2004 [8]):
ФП — фибробласты папиллярной дермы, ФР — фибробласты ретикулярной дермы

Интересно то, что дермальные фибробласты, находящиеся в одном и том же участке дермы, но в разных ее слоях, выполняют специфические функции, благодаря чему каждый из слоев дермы имеет особенности по составу и организации компонентов МКМ (таблица 2). Так, папиллярный слой дермы характеризуется тонкими, неорганизованными тяжами коллагеновых волокон I и III типов, в то время как в ретикулярном слое тяжи толстые и хорошо организованные. При этом в папиллярном слое, по сравнению с ретикулярным, коллагена III типа содержится больше.

Структурные и композиционные различия обнаружены и в отложениях протеогликанов (таблица 2). Так, декорин интенсивно экспрессируется в папиллярном слое дермы, в ретикулярном же слое его содержание незначительно — в основном, он распределен между тяжами коллагеновых волокон. Версикан, напротив, находится в большом количестве в ретикулярном слое и ассоциирован с эластическими волокнами, в то время как в папиллярном слое дермы он содержится в небольшом количестве в ассоциации с микрофибриллами. Папиллярный слой дермы характеризуется наличием в нем тенасцина-С и нефибриллярного коллагена XII и XVI типов, тогда как ретикулярный слой — наличием тенасцина-Х и коллагена IV типа. Стабильные различия в экспрессии ряда белков МКМ выявлены также и в культурах фибробластов папиллярного слоя (ФП) и ретикулярного слоя (ФР).

Mine с соавт. (2008), исследуя культуры фибробластов клональным методом, обнаружили более высокую скорость удвоения клеточных популяций ФП по сравнению с ФР, полученных из одного и того же участка кожи [19]. По всей видимости, фибробласты папиллярного и ретикулярного слоев дермы представляют собой разные популяции клеток, поскольку проявляются различия в морфологии, скорости деления, продукции МКМ и факторов роста/цитокинов. Предполагается, что такое разнообразие фибробластов дермы продиктовано влиянием ряда факторов, в частности, генов семейства AP-1, гомеобок-генов,

Таблица 2. Распределение некоторых компонентов МКМ в дерме (Sorrell J.M., Caplan A.I., 2004 [8])

Компоненты МКМ	Сосочковый слой	Ретикулярный слой
Коллаген I и III	Высокое соотношение (3:1)	Низкое соотношение (3:1)
Коллаген IV	Присутствует в базальной мембране	Отсутствует
Коллаген VI	Присутствует в области дермальноэпидермального соединения (ДЭС)	Малоприсутствует
Коллаген XII	Присутствует	Мало/отсутствует
Коллаген XIV	Мало/отсутствует	Присутствует
Коллаген XVI	Присутствует в области ДЭС	Отсутствует
Тенасцин-С	Присутствует в области ДЭС	Отсутствует
Тенасцин-Х	Мало (в области ДЭС)	Присутствует
Версикан	Диффузно в области ДЭС. В фибриллярных волокнах	Присутствует в ассоциации с эластическими волокнами
Декорин	Присутствует	Присутствует

регуляторов этих генов, а также компонентов прилежащего эпидермиса [8]. Можно надеяться, что проводимые в настоящее время исследования, направленные на изучение эффектов данных факторов, помогут понять значение различий между ФП и ФР и, соответственно, расширить наши представления о специфических функциях этих клеток в коже, что играет немаловажную роль при выборе фибробластов для клинического применения. В частности, показано, что дермальный эквивалент, содержащий ФП, значительно лучше поддерживает эпидермальный морфогенез по сравнению с эквивалентом, содержащим ФР [19]. Исследования, проведенные на молекулярном уровне, выявили возрастные изменения в синтезе и деградации молекул МКМ дермы, во многом зависящие от дермальных фибробластов. Возможно, и в этих процессах роль ФП и ФР различна, что может быть существенным при выборе клеток для коррекции

Дермальные фибробласты — ключевое звено в биологии кожи. Они не только поддерживают гомеостаз МКМ дермы, обеспечивая его организацию и ремоделирование, но также играют значительную роль в поддержании физиологического состояния других слоев кожи. Взаимодействуя с эпителиальными клетками и продуцируя факторы роста, фибробласты регулируют эпидермальный морфогенез, вырабатывая коллагены и гликопротеины, участвуют в организации базальной мембраны, продуцируя проангиогенные факторы роста, способствуют образованию и стабилизации сосудов.

возрастных изменений кожи. По мнению Mine с соавт. (2008), **центральным звеном в процессах старения кожи являются изменения, связанные именно с популяцией ФП дермы.**

Клеточный компонент кожи, помимо фибробластов, представлен рядом других клеток — эпидермальных, эндотелиальных, нейральных и клеток гемопоэтического происхождения. К последним относят постоянно присутствующую популяцию дендритных клеток и появляющуюся время от времени популяцию лейкоцитов (моноцитов/макрофагов, нейтрофилов и лимфоцитов). Клетки, входящие в состав кожи, активно общаются друг с другом путем прямых контактов и с помощью различных сигнальных молекул, что обеспечивает структурно-функциональное единство кожи [20]. Ключевую же роль в регуляции физиологических параметров кожи играют именно фибробласты [8]. Они не только участвуют в синтезе факторов роста/цитокинов, матричных металлопротеиназ, продукции и организации МКМ дермы, но и взаимодействуют друг с другом и другими типами клеток, оказывая значительное влияние на все клеточное сообщество кожи [7, 11, 21, 22].

ФУНКЦИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

К основным функциям фибробластов кожи можно отнести следующие:

- продукция, организация и обновление межклеточного матрикса (МКМ);
- регуляция процесса воспаления;
- участие в заживлении ран;
- регуляция дифференцировки эпителия [23, 24].

Дермальные фибробласты синтезируют основные компоненты МКМ (см. **таблицу 1**) [25]. Являясь основным источником металлопротеиназ, расщепляющих компоненты МКМ, они регулируют самообновление МКМ и поддерживают его гомеостаз [26].

Непосредственно взаимодействуя с эпителиальными клетками [26, 27] и секретируя различные факторы роста (фактор роста кератиноцитов KGF-1, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор GM-CSF, интерлейкины IL-6, IL-8 [25]), фибробласты играют ключевую роль в регуляции эпидермального морфогенеза. Секретируемый фибробластами фактор роста TGF β противодействует митотическому эффекту KGF на кератиноциты, а одна из его изоформ (TGF β 1) сдерживает рост эпителия, индуцирует дифференцировку и апоптоз кератиноцитов [28]. Продуцируя коллаген IV типа и ламинин, фибробласты участвуют в формировании базальной мембраны [29–31]. Продуцируя и организуя коллагены, эластин, гликопротеины и протеогликаны, фибробласты обеспечивают опорно-механическую функцию кожи, а влияя на проницаемость сосудов, регулируют трофику кожной ткани.

Дермальные фибробласты активно участвуют в ангиогенезе: продуцируя множество проангиогенных факторов (таких, как VEGFs, FGFs, TGF- β 1, HGF/SF и ангиопоэтин-1), индуцирующих дифференцировку и миграцию эндотелиальных клеток, они способствуют образованию и стабилизации сосудов [32, 33].

Дермальные фибробласты принимают также участие в процессах нейроэндокринной регуляции кожи — они синтезируют разнообразные биологически активные пептиды, идентичные таковым в центральной нервной и эндокринной системах, экспрессируют ген гормона роста. В дермальных фибробластах обнаружены рецепторы андрогенов и эстрогенов, посредством которых осуществляется влияние этих гормонов на кожу человека.

Немаловажную роль фибробласты играют в поддержании иммунитета. В частности доказано ключевое значение дермальных фибробластов в реализации механизмов взаимодействия иммунокомпетентных клеток [34]. В условиях *in vitro* показаны иммуносупрессорные и иммуномодулирующие свойства фибробластов, а также их ингибирующее действие на митогенез и пролиферацию Т-клеток [34]. Фибробласты синтезируют ряд ключевых посредников воспаления, одним из которых является фактор транскрипции RelB ядерного фактора семейства KB (NF- κ B), оказывают активирующее воздействие на тучные клетки (совместное культивирование дермальных фибробластов и мастоцитов сопровождается усилением продукции последними гистамина) [35]. По мнению Н.П. Омеляненко (2009), фибробласты можно рассматривать как «сторожевые» клетки, организующие ответы ткани на инфекцию или повреждение [11].

Существенна роль дермальных фибробластов и в заживлении ран [24, 34]. Повреждение кожи сопровождается изменениями в структуре МКМ, механическим стрессом и воспалительными процессами в ране. Эти изменения приводят к активации фибробластов. Мигрируя к месту повреждения ткани, они дифференцируются в премиофибробласты, которые активно продуцируют коллаген, фибронектин и организуют МКМ, служащий каркасом для других клеток. В последующем под влиянием специфических факторов (TGF β 1, EGF, PDGF, FGF2) и механического напряжения премиофибробласты дифференцируются в миофибробласты, которые стягивают края раны и уменьшают раневую поверхность. Миофибробласты посредством апоптоза элиминируются из места повреждения и замещаются фибробластами [8].

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Дермальные фибробласты *in vivo* отличаются пластичностью и разнообразием форм (могут быть овальными, полигональными, веретеновидными, уплощенными, отросчатыми и проч.) [11]. В культуре дермальные фибробласты (**рис. 3**) способны прикрепляться к поверхности культуральной посуды и длительно сохранять пролиферативный потенциал [29, 34].

Имунофенотипическая характеристика фибробластов позволяет оценить их антигенный профиль и выявлять эти клетки как *in vivo*, так и *in vitro*. Так, дермальные фибробласты характеризуются экспрессией мезенхимных маркеров (CD44, CD73, CD90, CD105, виментин) и отсутствием эпителиальных, гемопоэтических и эндотелиальных маркеров (CD31, CD34, CD45) [33, 36]. Интересно отметить, что более чем у 30% дермальных фибробластов обнаружена экспрессия маркера, характерного для мезен-

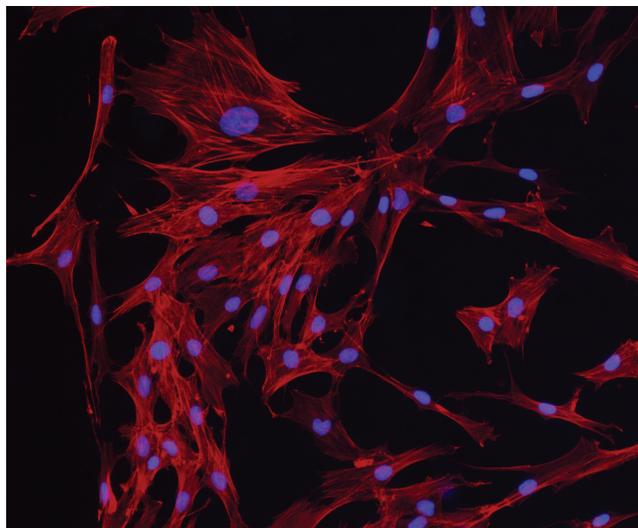


Рис. 3. Культура дермальных фибробластов человека. Флуоресцентная микроскопия (ув. $\times 200$): красное свечение — фаллоидин, специфично связывающий F-формы цитоскелета фибробластов (метка TRITC); синее свечение — ядра клеток (метка DAPI). Фото авторов.

химных стволовых клеток костного мозга — нейротрофинового рецептора CD271, что свидетельствует о высоком пролиферативном и дифференцировочном потенциале фибробластов кожи [37, 38]. Иммунофенотипической особенностью дермальных фибробластов является также экспрессия белков МКМ — фибронектина, эластина и коллагенов I, III, IV, V типов [36]. Несмотря на то, что дермальные фибробласты экспрессируют большое число клеточных антигенов (таблица 3), ни один из них не является эксклюзивным маркером для этой популяции клеток [26]. Так, поверхностный клеточный антиген Thy-1/CD90

экспрессируют все дермальные фибробласты [32] (предполагается, что он регулирует адгезию фибробластов, организацию цитоскелета и миграцию клеток). В то же время Thy-1/CD90 является одним из трех обязательных поверхностных маркеров мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) [36]. Другие маркеры, характерные для фибробластов кожи, такие как структурные белки промежуточных филаментов цитоскелета виментин и десмин, помимо всех фибробластоподобных клеток, экспрессируются и другими клетками [39] (см. таблицу 3).

На сегодняшний день два маркера — белок FSP1 (член семейства внутриклеточных белков S100) и белок FAP α (белок активации фибробластов) считаются наиболее специфичными для идентификации фибробластов [26, 33, 38, 40], но они также не являются эксклюзивными для дермальных фибробластов.

Таким образом, уникальные маркеры пока не найдены (но не исключено, что в конце концов их удастся обнаружить), а это означает, что в настоящее время трудно выявить четкие функциональные различия между отдельными представителями обширной «семьи» фибробластов [34]. Так что проблема идентификации эксклюзивных клеточных маркеров дермальных фибробластов остается весьма актуальной.

РАЗНОРОДНОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

В процессе онтогенеза все клетки проходят определенный путь согласно генетической программе, что сопровождается выполнением ими специфических функций. Соотношение в клеточной популяции стволовых и нестволовых клеток на каждом этапе онтогенеза будет разным, и это обстоятельство лежит в основе фенотипической клональной гетерогенности (т.е. разнородности) клеточных популяций как *in vivo*, так и *in vitro*.

Таблица 3. Основные охарактеризованные маркеры фибробластов (Kalluri R., Zeisberg M., 2006 [26])

Маркер	Характеристика	Фибробласты / место обнаружения	В каких клетках еще обнаружен
Виментин	Белок, связанный с промежуточными филаментами	Разные	Эндотелиальные клетки, миоэпителиальные клетки и нейроны
α -Гладкомышечный актин	Белок, связанный с промежуточными филаментами	Разные	Гладкомышечные клетки сосудов, пероциты и миоэпителиальные клетки
Десмин	Белок, связанный с промежуточными филаментами	Фибробласты кожи	Мышечные клетки, гладкомышечные клетки сосудов
FSP1 (специфический белок фибробластов)	Белок, связанный с промежуточными филаментами	Разные	Клетки инвазивной карциномы
Рецептор 2, содержащий дискоидиновый домен	Коллагеновый рецептор	Фибробласты сердца	Эндотелиальные клетки
Белок активации фибробластов (FAP α)	Сериновая протеаза	Активированные фибробласты	Активированные меланоциты
$\alpha 1\beta 1$ -интегрин	Коллагеновый рецептор	Разные	Моноциты и эндотелиальные клетки
Пролил-4-гидроксилаза	Биосинтез коллагена	Разные	Эндотелиальные, эпителиальные и раковые клетки
Проколлаген I $\alpha 2$	Биосинтез коллагена I типа	Разные	Остеобласты и хондробласты

Дермальные фибробласты представляют собой популяцию клеток, гетерогенность которой определяется двумя главными факторами [8, 28].

Первым фактором является локализация фибробластов в коже. В дерме выделяют три субпопуляции фибробластов, каждая из которых имеет свои особенности [41]:

- 1) фибробласты папиллярной дермы;
- 2) фибробласты ретикулярной дермы;
- 3) фибробласты волосяных фолликулов.

Вторым фактором, определяющим гетерогенность фибробластов, является их положение в так называемом *фибробластическом диффероне* — ряде клеток одной гистогенетической детерминации от наименее дифференцированной до терминально дифференцированной. Еще А.А. Максимов в 1927 году обратил внимание на наличие в соединительной ткани, наряду с дифференцированными формами, предшественников фибробластов [36]. А.Б. Шехтер (1978 г.) по ультраструктурным признакам выделил 6 типов фибробластов. Два типа представлены незрелыми формами (малодифференцированные и юные фибробласты) и четыре типа — зрелыми фибробластами (коллагенобласты, миофибробласты, фиброкласты, фиброциты) [22].

Таким образом, популяция дермальных фибробластов как *in vivo*, так и *in vitro* также представляет гетерогенную смесь клеток, различающихся по морфологии, молекулярно-генетическим характеристикам и потенциальным к пролиферации и дифференцировке. Не вызывает сомнений, что данная популяция клеток имеет определенную иерархическую структуру, состоящую из клеточных форм разной степени — *гистогенетического ряда (дифферона)*. В настоящее время единой общепринятой модели этого клеточного ряда нет, поскольку отсутствуют надежные маркеры коммитированных и некоммитированных предшественников фибробластов, поэтому расположение в диффероне возможно лишь по функциональным характеристикам и степени зрелости данных клеток. Таким образом, основываясь на современных данных [11, 36] фибробластический дифферон здоровой дермы можно представить следующим образом (рис. 4):

- мультипотентные мезенхимные стволовые клетки соединительной ткани кожи (обладают сходными с ММСК костного мозга потенциальными);
- полипотентные циркулирующие стволовые клетки — особая популяция переносимых кровью клеток, так называемые циркулирующие фиброциты;
- префибробласты — коммитированные клетки-предшественники (обладают высокой митотической активностью);

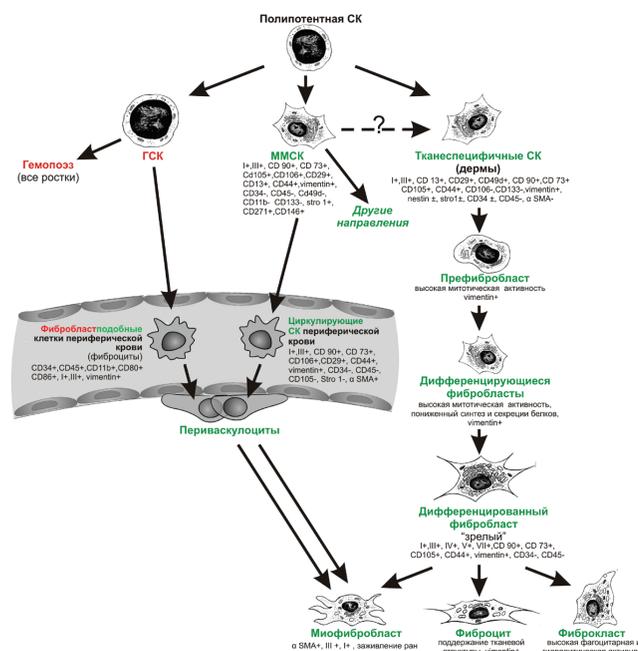


Рис. 4. Фибробластический дифферон дермы

- дифференцирующиеся фибробласты — промежуточный тип клеток между префибробластами и дифференцированными фибробластами — находятся на разных стадиях дифференцировки, характеризуются низким уровнем синтеза и секреции белков, митотически активны;
- дифференцированные фибробласты (зрелые фибробласты) — центральное звено фибробластического дифферона. Эти клетки митотически не активны, но активны синтетически (отвечают за синтез и резорбцию компонентов МКМ);
- конечный тип клеток фибробластического дифферона:
- фиброциты — дефинитивные формы фибробластов, синтетически неактивные клетки, необходимы для поддержания структуры дермы;
- специализированные формы дермальных фибробластов:
 - репаративные фибробласты — клетки (возможно, происходящие из мигрирующих в очаг повреждения циркулирующих фиброцитов, или префибробластов), активно синтезирующие компоненты МКМ и участвующие в его построении в условиях репарации;
 - миофибробласты — клетки, обладающие выраженным сократительным аппаратом (комплекс α-гладкомышечного актина и миозина), способны к продукции коллагена (особенно III типа) и сокращению грануляционной ткани в процессе заживления ран;
 - фиброкласты — клетки, характеризующиеся высокой фагоцитарной и гидролитической активностью

Термин «дермальные фибробласты» сильно упрощен. Популяция дермальных фибробластов представлена множеством клеточных линий, имеющих различное происхождение, а фенотип «фибробласт», по всей видимости, объединяет представителей нескольких гистогенетически различных рядов на определенных этапах дифференцировки.

(имеют хорошо развитый лизосомальный аппарат), обеспечивают разрушение и резорбцию гипертрофированного или несоответствующего окружающим тканям МКМ соединительной ткани в зоне заживления.

Гетерогенность фибробластов *in vitro* и *in vivo*

Клональный анализ клеточных культур дермальных фибробластов позволяет выделить различные по размерам клеточные колонии и морфологическую гетерогенность составляющих их клеток. Выделяют три типа колоний [42]:

- I тип — колонии, состоящие из мелких, веретеновидных, хорошо взаимно ориентированных, обладающих высокой митотической активностью клеток;
- II тип — колонии, состоящие из больших, сильно распластанных, не обладающих взаимной ориентацией клеток, для которых характерна парусовидная форма и невысокая митотическая активность;
- III тип — смешанные колонии, состоящие как из мелких веретеновидных, так и больших парусовидных клеток.

Выявленные различия в морфологии, по всей видимости, отражают неодинаковую степень зрелости дермальных фибробластов в гистогенетическом диффероне, где мелкие, веретеновидные клетки менее зрелые, в то время как большие парусовидные — более зрелые.

Chen с соавт. (2007), исследовав с помощью клонального анализа дермальные фибробласты крайней плоти, показали, что они также представляют собой разнородную популяцию, содержащую клетки-предшественники на разных стадиях дифференцировки [43].

В дермальном слое кожи человека выделяют две большие клеточные популяции [7, 28]: митотически активные фибробласты (МФ) и постмитотические фибробласты (ПМФ). МФ, согласно результатам исследования их цитоморфологии, пролиферативного потенциала и способности синтезировать специфические цитокины и факторы роста (TGF β и KGF), классифицируют по трем типам клеточных популяций: МФ I, МФ II и МФ III [28]. 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. Клеточный пул МФ II, в свою очередь, перед дифференцировкой в МФ III совершает около 15–20 делений. МФ III, перед дифференцировкой в ПМФ, осуществляет уже около 5–8 делений. Последний клеточный пул, согласно полученным биохимическим характеристикам, отражает функциональный тип клеточной системы «фибробласт-фиброцит». В пересчете на клетку эта система, по сравнению с клеточной популяцией МФ, продуцирует общего коллагена в 5–8 раз больше и обеспечивает необходимое для поддержания гомеостаза дермального слоя корректное соотношение коллагена I, III и V типов [28]. Выяснилось, что в коже человека соотношение клеточных популяций МФ/функциональные ПМФ постоянно и составляет 2:1. Показано, что это соотношение не зависит от возраста человека. В условиях *in vitro* клеточные популяции МФ и функциональные ПМФ классифицируют на основании специфической экспрессии фермента β -галактозидазы, характерного для ПМФ и не характер-

ного для МФ. По уровню экспрессии этого фермента определяют процесс клеточного старения в культурах фибробластов.

Стволовые клетки фибробластического дифферона

Источник происхождения первого звена дифферона — стволовой клетки — окончательно не установлен. В настоящее время в качестве стволовой клетки фибробластического дифферона рассматривают три варианта:

- 1) местные тканевые клетки-предшественники (периваскулоциты);
- 2) мультипотентные мезенхимные стромальные клетки;
- 3) стволовые клетки костного мозга.

Многочисленные исследования [44–46] показали, что мультипотентные стволовые клетки дермы человека находятся в специфических нишах, которые располагаются в волосяном фолликуле (дермальный сосочек и соединительнотканная оболочка), и, вероятно, в самой дерме [43, 47–49]. Роль этих ниш заключается в регуляции дифференцировки стволовых клеток для поддержания гомеостаза ткани.

- *Местные тканевые клетки-предшественники (периваскулоциты)*

Периваскулярные клетки находятся на стенках адвентимы артериол и мелких венул. К сегодняшнему дню накопилось немало данных, указывающих на то, что периваскулярные клетки, имея тесную связь с эндотелиоцитами, обладают схожей со стволовыми клетками активностью и могут дифференцироваться во множество клеточных линий, включая остеобласты, хондроциты, адипоциты, фибробласты, миофибробласты, гладкомышечные клетки [38, 50].

Периваскулоциты являются разнородной в иммунофенотипическом отношении популяцией — большинство этих клеток экспрессируют поверхностные маркеры, характерные как для ММСК (мультипотентные мезенхимные стромальные клетки), так и для ГСК (гемопозитивные стволовые клетки). Можно предположить, что перекрытие функции ММСК и ГСК, как источников «новых» фибробластов, служат основой для репаративных процессов в тканях организма [36]. Поскольку дерма кожи имеет хорошо развитую сеть мелких кровеносных сосудов, то вполне вероятно, что резидентные периваскулярные клетки принимают активное участие в процессе заживления ран и поддержании ткани в физиологическом состоянии [50].

- *Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки*

ММСК, открытые в конце 60-х годов прошлого века в лаборатории А.Я. Фриденштейна, находятся практически во всех тканях организма [50–53], включая дерму. По всей видимости, эти клетки, представляя собой популяцию недифференцированных или малодифференцированных клеток-предшественников, являются резервуаром для регенерации ткани при ее повреждении [53], пролиферируют и дифференцируются в ответ на локальные сигналы, поступающие из органа, в котором они расположены [54]. Chunmeng с соавт. (2004) предположили, что именно ММСК-подобные клетки дермы служат ис-

точником фибробластов, участвующих в заживлении ран [55, 56]. Авторами было показано, что у крыс локальная и общая трансплантация ММСК дермы ускоряет процесс заживления обычной раны, при этом стимуляция процессов заживления при локальной трансплантации возникает раньше, чем при общей. Эти мультипотентные клетки после трансплантации имплантируются в зоны повреждения кожи реципиента.

В последние годы в ходе многочисленных исследований в дермальном слое кожи человека и грызунов было выявлено наличие различных популяций со свойствами мультипотентных стволовых клеток (см. таблицу 2) [57–62, 76].

Так, Young с соавт. (2001) выделили мультипотентные стволовые клетки из дермы человека разного возраста (зародыша, взрослого и старого человека) [61]. Все выделенные популяции содержали линиекоммитированные миогенные, адипогенные, хондрогенные и остеогенные стволовые клетки-предшественники наравне с линиекоммитированными мультипотентными стволовыми клетками, способными к образованию гладкомышечных клеток, адипоцитов, хондробластов, остеобластов, фибробластов и эндотелиальных клеток. Toma с соавт. (2001, 2005) идентифицировали и описали популяцию мультипотентных стволовых клеток дермы, так называемых «клеток-предшественников из кожи» (SKPs, skin-derived

progenitor cells) [57, 58]. Эти SKPs были выделены из ниши дермального сосочка волосяного фолликула молодых и взрослых грызунов и поддерживались в культуре на среде с факторами роста, часто используемыми для выращивания нейрональных клеток-предшественников. SKPs экспрессировали нестин, фибронектин, виментин и так же, как и ММСК, были способны дифференцироваться в мезодермальном и нейральном направлениях [53, 63]. Возможно, они представляют собой новый тип мультипотентных «взрослых» клеток с «разносторонней» дифференцировкой [57]. Популяция клеток со свойствами SKPs была выделена из неонатальной ткани крайней плоти человека [58, 59], а также из кожи плода, зрелого и старого человека [60].

SKPs человека способны в течение длительного времени пролиферировать в культуре *ex vivo* и дифференцироваться в мезодермальном, нейральном и гладкомышечном направлениях. Предполагают, что эти клетки, имеющие фенотип мезенхимных стволовых клеток и мультилинейный дифференцировочный потенциал, находятся в состоянии покоя до момента повреждения ткани (что подтверждается экспрессией нестина — маркера клеток-предшественников, чаще всего встречаемого у клеток в области регенерации тканей после их повреждения). Интересно отметить, что эта субпопуляция SKPs, вы-



Инновации в эстетической медицине

www.sprs-therapy.ru

Естественное восстановление кожи



SPRS-терапия -
уникальный комплекс персонализированных диагностических и лечебных процедур для восстановления структуры и функций кожи с признаками возрастных и других изменений, основанный на применении собственных клеток кожи - фибробластов.

ОАО "Институт Стволовых Клеток Человека"
Лицензия ФС-99-01-005845, разрешение ФС 2009/398

Имеются противопоказания. Необходима консультация специалистов.

Реклама

Научные исследования

деленная из крайней плоти, может дифференцироваться в нейроны — тип клеток, который никогда не встречается в коже [10]. Предполагается, что SKPs представляют собой эмбриональные эндогенные клетки-предшественники, появляющиеся в периферических тканях организма в период онтогенеза, в том числе и в коже, и сохраняющие свою мультипотентность во взрослом организме. Bartsch с соавт. (2005) идентифицировали в дерме крайней плоти еще одну мультипотентную клеточную популяцию, обозначенную MSCs — дермальные мезенхимные стволовые клетки. Было отмечено, что данная клеточная популяция способна дифференцироваться в мезодермальном направлении, включая адипоциты, остеоциты и миоциты [62].

Lavoie с соавт. (2009) выделили из дермы крайней плоти человека и кожи кролика мультипотентные клетки, подобные SKPs [64]. Было установлено, что в культуре эти SKPs способны дифференцироваться в остеоциты (щелочная фосфатаза⁺, коллаген I⁺) и хондроциты (коллаген II⁺), секретирующие хондроцит-специфические протеогликаны. Исследования *in vivo* показали, что при трансплантации SKPs, выделенных из кожи кролика, в зону перелома кости кролика они дифференцируются в остеогенные клетки. Часть субпопуляций данных SKPs способна также дифференцироваться в гладкомышечные клетки и перициты, ассоциированные с кровеносными сосудами. По мнению авторов, свойства этих SKPs аналогичны свойствам эмбриональных стволовых клеток нервного гребня, и их можно выделить как на стадии эмбриогенеза, так и на стадии взрослого организма.

Gago с соавт. (2009) [48] выделили SKPs (по протоколу Тома с некоторой модификацией) из биоптатов кожи разных анатомических областей от 102 здоровых доноров (в возрасте от 8 месяцев до 85 лет). При этом данные мультипотентные клетки были выделены из ниш *вне* дермального сосочка волосных фолликулов, что подтверждает описанные ранее случаи выделения SKPs из областей кожи без волосных фолликулов. В своем исследовании Gago с соавт. показали, что с возрастом наблюдается резкое снижение пула SKPs и/или его дифференцировочного потенциала.

Chen с соавт. (2007) в дерме ювенильной крайней плоти обнаружили еще одну популяцию мультипотентных клеток, которую назвали мультипотентными дермальными фибробластами (MDFs) [43], отличную от SKPs, выделенную Тома с соавт. [57, 58]. С помощью клонального анализа выявлено, что эти мультипотентные клетки составляют приблизительно 0,3% от общей популяции дермальных фибробластов крайней плоти человека. В противоположность SKPs, обнаруженная Chen с соавт. популяция клеток экспрессировала виментин и не экспрессировала нестин и помимо дифференцировки в эктодермальные и мезодермальные клетки оказалась способна к эндодермальной дифференцировке (в частности, в гепатоциты). Необходимо отметить, что условия культивирования выделенных клеток были различными, что может оказывать значительное влияние на экспрессию маркеров [51]. Так, Тома с соавт. культивировали SKPs в среде с FGF2, EGF и B27, которые используются для культивирования нейрональных клеток-предшественников. В этих условиях SKPs экспрессировали нестин, виментин и фибронектин. Chen с соавт. культивировали выделенные ими SKPs на стандартной культуральной среде без

добавления факторов роста. Не исключено, что эти две группы исследователей выделили одну и ту же популяцию клеток-предшественников, которые в разных условиях экспрессируют разные маркеры.

Практически одновременно с предыдущими исследователями Lorenz с соавт. (2008) [59] выделили из ювенильной крайней плоти человека фибробластподобные мезенхимные стволовые клетки (FMSCs), которые экспрессируют виментин, фибронектин, коллаген I типа и (слабо) нестин, α -SMA. Общий антигенный профиль этих клеток сходен с ММСК из костного мозга и жировой ткани. FMSCs обладали остеогенным и адипогенным дифференцировочным потенциалом. Авторы предположили, что выделенные ими FMSCs представлены в дерме человека не в виде отдельных клеток, а в виде главной клеточной популяции, которая, по всей видимости, находится в состоянии покоя до момента повреждения ткани (что подтверждается низким уровнем экспрессии нестина). Клетки этой популяции при повреждении кожи способны дифференцироваться в миофибробласты (но нельзя исключить, что и сам метод выделения клеток может запускать процесс регенерации тканей, который может сопровождаться активацией FMSCs и появлением миофибробластов).

В 2010 году группа под руководством Chen [65] еще раз подтвердила мультипотентность MDFs, показав их способность дифференцироваться в островковоподобные клетки поджелудочной железы, экспрессирующие инсулин, глюкагон и соматостатин после панкреатической индукции. Более того, эти клеточные кластеры способны *in vitro* высвобождать инсулин в ответ на глюкозу.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что дерма человека содержит большое количество разных клеточных популяций с мультипотентными характеристиками. Какова физиологическая роль такого избытка стволовых клеток в дерме? Каковы иерархические взаимоотношения между этими клетками? На сегодняшний день ученые обсуждают две гипотезы взаимодействия, в частности, между SKPs и ММСК:

- 1) популяция SKPs является родоначальником ММСК;
- 2) обе популяции клеток независимо существуют в дерме, при этом ММСК генерируют клетки в мезодермальном направлении, а SKPs — клеточные популяции с более широкой потенциальностью, включая дифференцировку и в невральном направлении [60].

Данные вопросы остаются открытыми и заставляют работать над ними ведущие лаборатории мира. Сегодня ясно, что имеющиеся в дермальном слое кожи мультипотентные стволовые клетки (с участием или без участия волосных фолликулов) способны генерировать множество клеточных линий и могут быть рассмотрены в качестве альтернативного костному мозгу источника стволовых клеток, а соединительная ткань кожи — в качестве локального резервуара «взрослых» стволовых клеточных популяций [9, 66–68], которые могут быть использованы в регенеративной медицине.

- Фибробластподобные стволовые клетки костного мозга

Показано, что небольшой пул фибробластподобных клеток, происходящих из костного мозга (и, возможно, из подкожной жировой ткани [33]), циркулирует в пе-

Таблица 4. Популяции клеток-предшественников в дермальном слое

Название клеток-предшественников	Возможные направления дифференцировки	Дополнительная информация	Источники информации
Клетки-предшественники кожи (SKPs)	Остео-, хондро-, адипо-нейрональное, миогенное направления, перициты	Происходят из ниши дермального сосочка волосяного фолликула, изолированы из дермы крайней плоти и кожи кролика	Fernandes K. et al., 2004 [44]; Toma J. et al., 2001, 2005 [47, 57]; Lavoie J-F. et al., 2009 [64]
Мультипотентные дермальные фибробласты (MDFs)	Остео-, хондро-, адипо-, фибро-, нейрональное направления, гепатоциты, инсулинпродуцирующие клетки	Выделены из ювенильной крайней плоти человека	Chen F. et al., 2007, 2010 [43, 65]
Фибробластподобные мезенхимные стволовые клетки (FMSCs)	Остео-, адипоцитарное направления	Выделены из ювенильной крайней плоти, представляют собой доминантную клеточную популяцию	Lorenz K. et al., 2008 [59]
Предполагаемые мезенхимные стволовые клетки дермы	Адипо-, хондро-, миогенное направления	—	Seruya M. et al., 2004 [80]
Стволовые клетки дермы	Адипо-, хондро-, остео-, фибро-, миогенное направления, эндотелиальные клетки	Предположительно являются источником репаративных фибробластов	Young H. et al., 2001 [61]; Chunmeng S. et al., 2004 [55]
Стволовые клетки волосяного фолликулы	Клетки эритроидной и миелоидной линий	Происходят из структур волосяного фолликула (терминальная луковица, дермальный сосочек, соединительнотканная оболочка)	Lako M., et al., 2002 [81]
Клетки-предшественники кожи (SKPs)	Мезодермальное и нейрональное направления	Выделены из ниш вне дермального сосочка волосяного фолликула	Gago N. et al., 2009 [48]
Фиброциты из костного мозга	Дифференцировка в миофибробласты	Играют роль в процессе воспаления (презентация антигенов, взаимодействие с Т-клетками, продукция провоспалительных факторов и ангиогенных факторов, необходимых для формирования новых кровеносных сосудов)	Bucala R. et al., 1994 [76]; Quan T. et al., 2004 [82]
Эндотелиальные клетки-предшественники из костного мозга	Эндотелий кровеносных сосудов	Мигрируют в зоны роста новых кровеносных сосудов. Обнаруживаются на ранней стадии процесса заживления ран	Roufousse C. et al., 2004 [83]; Tepper O. et al., 2005 [84]
Периваскулярные клетки	Остео-, адипо-, и хондрогенное направления	—	Doherty M. et al., 1998 [85]; Farrington-Rock C. et al., 2004 [50]
Дермальные мезенхимные стволовые клетки (MSCs)	Остео-, адипо- и миогенное направления	Изолированы из крайней плоти	Bartsch G. et al., 2005 [62]

риферической крови [9, 33, 68–70]. Bucala с соавт. (1994) описали популяцию этих фибробластподобных клеток [76], устремляющихся к местам повреждения кожи, где они заселяют межклеточный матрикс и участвуют в восстановлении поврежденной ткани [9, 71]. Одна из этих популяций определяется как ММСК или их ближайшие потомки [72], которые дифференцируются в мезенхимные клетки и восполняют популяцию дермальных фибробластов [33]. Эти клетки не экспрессируют гемопоэтических маркеров и способны к дифференцировке в фибробластическом, остеобластическом, хондробластическом и адипоцитарном направлениях [72]. Мультипотентность данных клеток, способность их циркулировать в кровотоке [73] и отсутствие специфического для фибробластов маркера FSP-1 [72] отличает их от истинных фибробластов.

Другая популяция клеток, так называемые циркулирующие *фиброциты*, которую их первооткрыватели Bucala с соавт. (1994) описали как коллаген+/виментин+/CD34+

клеточный пул, представляет собой моноцитоподобные клетки [74, 75]. Особенности поверхностного иммунофенотипа — наличие маркеров, характерных как для ММСК, так и ГСК, дают основания считать эти клетки уникальной и отличной от других популяцией циркулирующих в кровотоке предшественников фибробластов, дифференцирующихся, по всей видимости, из ГСК [74]. Bucala с соавт. (1994) показали, что хотя эти клетки составляют только 0,5% лейкоцитов периферической крови, в ране на их долю приходится 10% от всех инфильтрирующих поврежденную ткань клеток [76]. При этом установлено, что при попадании фиброцитов с кровотоком в раневое ложе происходит процесс дифференцировки этих клеток [70], что указывает на важную роль циркулирующих фиброцитов в процессе восстановления повреждений ткани. Они индуцируют ангиогенез, выделяя ангиогенные факторы [74], синтезируют цитокины для привлечения CD4⁺-лимфоцитов и других клеток воспаления, экспрессируют антигены, в частности CCR7, для активации ми-

грации клеток к ране. Предполагается также, что циркулирующие фиброциты способны дифференцироваться в миофибробласты (возможно, и в репаративные фибробласты), участвующие в заживлении ран.

Учитывая все вышесказанное, трудно не согласиться с мнением Sorrell и Carlan (2004), что термин «дермальные фибробласты» сильно упрощен [33]. Популяция дермальных фибробластов представлена множеством клеточных линий, имеющих различное происхождение, а фенотип «фибробласт», по всей видимости, объединяет представителей нескольких гистогенетически различных рядов на определенных этапах дифференцировки [36].

КАКОВЫ ЖЕ ОСНОВНЫЕ ПРИЧИНЫ РАЗНОРОДНОСТИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ?

Можно предположить, что в основе наблюдаемой фенотипической разнородности фибробластов лежит происхождение этих клеток из различных источников [36]. Одним из источников, вероятно, служит популяция предполагаемых эмбриональных эндогенных клеток-предшественников, которые появляются в дерме еще на стадии эмбриогенеза и сохраняют мультипотентность во взрослом организме [60]. Другим вероятным источником дермальных фибробластов может служить костный мозг [36]. Рассматривая последний вариант, ученые предположили, что предшественники фибробластов через сосудистое русло из костномозговых ниш мигрируют в дерму. При этом они временно находятся в периваскулярной нише. По мере продвижения от стенки сосудов вглубь ткани большинство клеток дифференцируется, а часть клеток занимает периваскулярные ниши, пополняя местный тканевой резерв. Это клеточное движение сопровождается последовательной сменой тканевых ниш, в каждой из которых происходят закономерные процессы пролиферации и/или дифференцировки фибробластоподобных клеток.

Существуют ли общие мезенхимные предшественники стволовых клеток для всего организма или эти предшественники являются тканеспецифичными (см. таблицу 4)? Приходится признать, что данный вопрос по-прежнему остается открытым. Очевидно лишь то, что дерма человека содержит различные популяции стволовых клеток, и эти клетки с мультипотентными характеристиками определяют фибробластический дифферон и неоднородность фибробластов.

Принимая во внимание данный феномен, можно объяснить возможность получения из небольшого биоптата кожи (размером 2–5 мм) на ранних пассажах значительного количества функционально активных фибробластов. По всей видимости, находящиеся в дерме в состоянии покоя клетки-предшественники фибробластов в условиях *in vitro* вступают в пролиферацию и дифференцируются в функционально активные клетки, которые можно эффективно использовать для восстановления дефектов мягких тканей. Впервые эту особенность фибробластов кожи применили в медицинской практике ученые компании Isolagen в 1995 году, доказавшие безопасность и клиническую эффективность



Рис. 5. Потенциальные возможности применения дермальных ММСК в регенеративной медицине (Sellheyer и Krahl, 2009 [68], дополнено авторами)

[5] использования культивированных дермальных фибробластов для коррекции морщин и рубцов постакне. Культивированные дермальные фибробласты после введения их в дермальный слой активно синтезируют коллаген и другие компоненты МКМ, тем самым реорганизуя микроструктуру дермы и, соответственно, эффективно корректируя дефекты кожи [2, 35]. Гистологический анализ биоптатов кожи показал, что после введения аутологичных дермальных фибробластов регистрируется увеличение содержания новообразованного коллагена [2, 6] и эластина, усиление эпидермального морфогенеза, стимуляция резидентной популяции дермальных фибробластов [6].

Зарубежные исследователи [77–79] на примере препаратов гиалуроновой кислоты (в частности, Restylane) продемонстрировали возможность увеличения длительности клинического эффекта филеров при их совместном использовании с аутологичными дермальными фибробластами.

Интерес к «многоликой» популяции дермальных фибробластов не ограничивается только применением функционально активных фибробластов в эстетической медицине. В настоящее время в ведущих лабораториях мира [9, 48, 59, 65, 68] активно исследуется возможность использования в разных областях медицины стволовых клеток, обнаруженных в дермальном слое кожи (рис. 5), поскольку их мультилинейный дифференцировочный потенциал, легкая доступность и размножение в культуре делает их идеальным кандидатом для аутологичной клеточной трансплантации.

ЛИТЕРАТУРА

- Weiss R.A., Weiss M.A., Beasley K.L., Munavalli G. Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial. *Dermatol Surg* 2007; 33(3): 263–268.
- Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Малишевская Е.Г. Использование аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. *Вестник эстетической медицины*. 2008; 7(2): 72–78.
- Palmer M.A., Lowe N. Human Dermal Fibroblasts for Regeneration and Rejuvenation: A Practical Guide. *Adv Aesthet Cell Rejuv* 2008; 3: 1–16.
- Озерская О.С., Щеголев В.В. Экспериментальные подходы к обоснованию применения клеточных композиций на основе фибробластов для дерматокосметологии. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2008; 3(2): 66–67.
- Briefing Document. Advisory Committee Materials: Available for Public Release. *Isolagen Therapy TM (Laviv™)*. Autologous Cell Therapy, 2009.
- Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Калинина Н.И. и др. Аутологичные фибробласты дермы: перспективы применения в медицине. В кн.: Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения. Под ред. В.А. Ткачука. Руководство для врачей. М.: Литтерра, 2009.
- Байрейтер К., Франц П., Родеман Х. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации. *Онтогенез* 1995; 236(1): 22–37.
- Sorrell J.M., Caplan A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci*. 2004; 117: 667–675.
- Fu X., Sun X. Can hematopoietic stem cells be an alternative source for skin regeneration? *Ageing Res Rev* 2009; 244–249.
- Stephens P., Genever P. Non-epithelial oral mucosal progenitor cell populations. *Oral Diseases*. 2007; 13: 1–10.
- Омельяненко Н.П., Слуцкий Л.И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). М.: Известия, 2009.
- Hogdlijn M., Gorup E., Genever P. Comparative characterization of hair follicle dermal stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2006; 15: 49–60.
- Хрупкин В.И., Зубрицкий В.Ф., Ивашкин А.Н. и др. Дерматоπλαстика раневых дефектов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.
- Fisher G., Varani J., Voorhees J. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol*. 2008; 144(5): 666–672.
- Жукова О., Потеев Н., Стенько А., Бурдина А. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи. *Клиническая дерматология и венерология*. 2009; 3: 4–9.
- Zhao Y., Wang J., Yan X. et al. Preliminary survival studies on autologous cultured skin fibroblasts transplantation by injection. *Cell transplantation*. 2008; 17: 775–783.
- Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань (Функциональная морфология и общая патология). М.: Медицина, 1981.
- Zouboulis C., Adjaye J., Akamatsu H., et al. Human skin stem cells and the ageing process. *Experimental gerontology*. 2008; 43: 986–997.
- Mine S., Fortunel N., Pigeon H. et al. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS* 2008; 3(12): 1–13.
- Смирнова И. Функциональная морфология старения. *Усп. геронтол.* 2004; 13: 44–51.
- Kahari V.M., Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*. 1997; 6: 199–213.
- Шехтер А.Б., Берченко Г.Н. Фибробласты и развитие соединительной ткани: ультраструктурные аспекты биосинтеза, фибриллогенеза и катаболизма коллагена. *Архив патологии*. 1978; 8: 70.
- Parsonage G. et al. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol*. 2005; 26: 150–156.
- Tomasek J., Gabbiani G., Hinz B. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Mol. Cell Biol*. 2002; 3: 349–363.
- Sorrell J.M., 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: 134–145.
- Kalluri R., Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Publishing Group*. 2006; 6: 392–401.
- Wiseman B., Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*. 2002; 296: 1046–1049.
- Nolte S.V., Xu W., Rennekampff H-O., Rodemann P. Diversity of Fibroblasts – A Review on Implications for Skin Tissue Engineering Cells Tissues Organs. 2008; 187: 165–176.
- Chang H., Chi J-T., Dudoit S. et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS*. 2002; 99(20): 12877–12882.
- 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.
- 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 Invest Dermatol*. 2006; 126: 971–979.
- Sorrell J.M., Baber M., Caplan A. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. *Cell Tissue Res*. 2003; 327: 499–510.
- Sorrell J.M., Caplan A.I., Fibroblasts – a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Molecular Biol*. 2009; 276: 161–214.
- Haniffa M., Collin M., Buckley C., et al. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts new clothes? *Haematologica* 2009; 94(2): 258–263.
- Hogaboam C.M., Steinhauser M.L., Chensue S.W., Kunkel S.L. Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int* 1998; 54(6): 2152–2159.
- Бозо И.Я., Деев Р.В., Пинаев Г.П. Фибробласт — специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? *Цитология* 2010; 52(2): 99–109.
- Quirici N, Soligo D., Bossolasco P. et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol*. 2002; 30: 789–791.
- 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. *Exp Hematol* 2008; 36(5): 642–654.
- Минин А.А., Молдавер М. В. Виментиновые промежуточные филаменты и их роль во внутриклеточном распределении органелл. *Успехи биологической химии*. 2008; 48: 221–252.
- Strutz F., Okada H., Lo C. et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol*. 1995; 130: 393–405.
- Jahoda C., Reynolds A. Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth. *Dermatol. Clin*. 1996; 14: 573–583.
- Терехов С.М., Гацадзе Х.А., Гринберг К.Н. Клональная гетерогенность фибробластов разных тканей эмбриона человека in vitro. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1984; 5: 590–591.

43. Chen F., Zhang W., Bi D. et al. Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci.* 2007;120: 2875–2883.
44. Fernandes K., McKenzie I., Mill P. et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol.* 2004; 6: 1082–1093.
45. Hunt D., Morris P., Sterling J. et al. A highly enriched niche of precursor cells with neuronal and glial potential within the hair follicle dermal papilla of adult skin. *Stem Cells.* 2008; 26: 163–172.
46. Lysy P., Smets F., Sibille C. et al. Human skin fibroblasts: from mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology.* 2007; 46: 1574–1585.
47. Toma J., McKenzie I., Bagli D. et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells.* 2005; 23: 727–737.
48. Gago N., Perez-Lopes V., Sanz-Jaka J. et al. Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells.* 2009; 27: 1164–1172.
49. French M., Rose S., Canseco J. et al. Chondrogenic differentiation of adult dermal fibroblasts. *Ann Biomed Eng.* 2004; 32: 50–56.
50. Farrington-Rock C., Crofts N., Doherty M. et al. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation.* 2004; 110: 2226–2232.
51. Bianco P., Robey P., Simmons P. Mesenchymal Stem Cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008; 2(4): 313–319.
52. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230–247.
53. Киселева Е.В., Чермных 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): 12–19.
54. Jiang Y., Jahagirdar B., Reinhardt R. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; 418: 41–49.
55. Chunmeng S., Tianmin C. Skin: a promising reservoir for adult stem cell populations. *Med Hypotheses.* 2004; 62: 683–688.
56. Chunmeng S., Tianmin C., Yongping S. et al. Effects of dermal multipotent cell transplantation on skin wound healing. *J Surg Res.* 2004; 121: 13–19.
57. 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: 778–784.
58. Toma J., McKenzie I., Bagli D. et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells.* 2005; 23: 727–737.
59. Lorenz K., Sicker M., Schmelzer E. et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol* 2008; 17: 925–932.
60. 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.
61. 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.
62. Bartsch G., Yoo J. J., De Coppi P. et al. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev.* 2005; 14: 337–348.
63. Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y., Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn.* 2004; 231: 258–269.
64. Lavoie J-F., Biernaskie J., Chen Y. et al. Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem Cells and Development.* 2009; 18(6): 893–905.
65. Bi D., Chen F., Zhang W., Bi D. et al. Differentiation of human multipotent dermal fibroblast into islet-like cell cluster. *BMC Cell Biol.* 2010; 11: 46, 1–7.
66. 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, 826–1833.
67. Middelkoop E. Fibroblast phenotypes and their relevance for wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005; 4: 9–11.
68. Sellheyer K. and Krahl D. Skin mesenchymal stem cells: Prospects for clinical Dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2009; 10: 1–7.
69. Mori L., Bellini, A., Stacey, M. et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp. Cell Res.* 2005; 304: 81–90.
70. Скоробогатая Е.В., Калмыкова Н.В., Блинова М.И., Пинаев Г.П. Выделение и идентификация фиброцитов из периферической крови человека. *Цитология.* 2008; 50(2): 118–123.
71. Caplan A. Mesenchymal stem cells. In: R. Lanza, J. Gearhart, B. Hogan, D. Melton, R. Pedersen, J. Thomason. *Essentials of Stem Cell Biology*, Elsevier Academic Press, Burlington. MA. 2005, pp. 205–210.
72. Kuznetsov S., Mankani M., Leet A. et al. Circulating connective tissue precursors: extreme rarity in humans and chondrogenic potential in guinea pigs. *Stem Cells.* 2007; 25: 1830–1839.
73. Caplan A. Mesenchymal stem cells. In: R. Lanza, J. Gearhart, B. Hogan, D. Melton, R. Pedersen, J. Thomason. *Essentials of Stem Cell Biology*, Elsevier Academic Press, Burlington. MA. 2005, pp. 205–210.
74. 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.
75. Metcalfe A., Ferguson M. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials.* 2007; 28: 5100–5113.
76. 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.
77. Yoon E., Han S., and Kim W. Advantages of the presence of living dermal fibroblasts within restylane for soft tissue augmentation. *Eur. Annals of Plastic Surgery.* 2003; 51(6): 587–592.
78. Han S.K., Shin S.H., Kang H.J., Kim W.K. Augmentation rhinoplasty using injectable tissue-engineered soft tissue: a pilot study. *Ann Plast Surg.* 2006; 56(3): 251–255.
79. Solakoglu S., Tiryaki T., Eroglu Ciloglu S. The effect of cultured autologous fibroblasts on Longevity of cross-linked hyaluronic acid used as a filler. *Aesthetic Surg J.* 2008; 28(4): 412–416.
80. Seruya M., Shah A., Pedrotty D. et al. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant.* 2004; 13(2): 93–101.
81. Lako M., Armstrong L., Cairns P. et al. Hair follicle dermal cells repopulate the mouse haematopoietic system. *J Cell Sci.* 2002, 115, 3967–3974.
82. 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.
83. Roufosse C., Direkze N., Otto W., Wright N. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(4): 585–597.
84. 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): 1068–1077.
85. Doherty M., Ashton B., Walsh S. et al. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 828–838.