

## ОБЗОРЫ

### Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи

В.Л. Зорин<sup>1,2</sup>, А.И. Зорина<sup>1</sup>, О.С. Петракова<sup>1</sup>, В.Р. Черкасов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ООО «Биотехнологическая компания», Москва

<sup>2</sup> НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

#### Dermal fibroblasts for skin defects therapy

V.L. Zorin<sup>1,2</sup>, A.I. Zorina<sup>1</sup>, O.S. Petrakova<sup>1</sup>, V.R. Cherkasov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The Biotechnologic Company Ltd., Moscow

<sup>2</sup> The Research Institute of Cancer Genesis of the RAMS N.N. Blokhin RCRC, Moscow

Лечение дефектов кожи с использованием культивированных *in vitro* клеток получило широкое признание во всем мире, как безопасный и эффективный метод. Среди множества типов клеток, способных оказывать клинический эффект, особый интерес вызывают дермальные фибробласты, которые представляют собой гетерогенную популяцию клеток мезенхимного ряда и играют ключевую роль в процессах регуляции клеточных взаимодействий и поддержания гомеостаза кожи. Фибробласты не только формируют оптимальные условия для функционирования и пролиферации других типов клеток (эпителиальных, эндотелиальных, клеток волосяных фолликулов), но и отвечают за координацию их функций в соответствии с расположением на теле. Способность фибробластов формировать межклеточный матрикс, синтезировать цитокины, вызывать миграцию и пролиферацию разных типов клеток при повреждениях кожи делает их перспективными для широкого клинического применения. В данном обзоре представлены описание свойств и функций фибробластов, опыт клинического применения, перечислены используемые для лечения повреждений кожи коммерческие препараты.

**Ключевые слова:** аллогенные фибробласты, аутогенные фибробласты, регенерация; заживление ран, имплантационные материалы, кожные трансплантаты.

В связи с достигнутыми в последнее время успехами в области клеточных технологий и началом их применения в клинической практике получило активное развитие новое направление в медицине — клеточная терапия. Среди наиболее перспективных и успешных областей использования культивированных клеток можно особо выделить лечение повреждений кожи посредством дермальных фибробластов, которые, благодаря своей эффективности и относительно небольшой себестоимости, прочно заняли определенную нишу на рынке клеточных трансплантатов.

#### Роль фибробластов в регенерации тканей

Фибробласты — одни из основных секреторных клеток организма, участвующие в формировании внеклеточного матрикса, репарации повреждений кожи, стимуляции роста кератиноцитов и сосудов. В соответствии со своим расположением в тканях и выполняемыми функциями фибробласты способны продуцировать проколлаген,

Therapy of skin defects by *in vitro* cultivated cells acquired a world-wide recognition as a safe and efficient method. Among a great number of clinically efficient cells the dermal fibroblasts — a heterogenic population of mesenchymal cells playing a key function in the control of cell interaction and a skin homeostasis — are of particular interest. The fibroblasts form the optimal conditions for functioning and proliferation of other cells (epithelial, endothelial, hair follicles) as well as are responsible for coordination of their functions according to position in the body.

The fibroblast ability to form intercellular matrix, to synthesize cytokines and to provoke migration and proliferation of cells of different types under skin damage make them a promising tool for broad clinical applications.

The current review contains description of the properties and functions of fibroblasts, the best clinical practices of their application. Commercially available products for treatment of skin damage are also discussed.

**Key words:** allergenic fibroblasts, autogenous fibroblasts, regeneration, wound healing, implantation materials, skin grafts.

фибронектин, гликозаминогликаны, проэластин, нидоген, ламинин, хондроитин-4-сульфат, тенасцин [1, 2]. Коллаген и эластин формируют волокнистый каркас тканей, гликозаминогликаны и фибронектин составляют аморфный (основной) компонент межклеточного матрикса, фибронектин отвечает за адгезию, подвижность, дифференцировку и взаимную ориентацию клеток [3, 4].

Фибробласты также участвуют в формировании базальной мембраны кожи посредством синтеза коллагена IV и VII типов, ламинина-1, нидогена и цитокинов, стимулирующих кератиноциты к синтезу компонентов базальной мембраны [5–7]. Данные клетки также продуцируют и выделяют в межклеточное пространство цитокины и факторы роста, оказывающие аутокринный и паракринный эффекты.

Аутокринный эффект обеспечивается секрецией ряда ростовых факторов, в частности, фактором роста соединительной ткани, синтез которого, в свою очередь, стимулирует трансформирующий ростовой фактор TGFβ.

e-mail: doc\_zorin@pisem.net

TGF $\beta$  также стимулирует хемотаксис фибробластов и продукцию ими коллагена и фибронектина [8]. Фактор роста соединительной ткани стимулирует синтез коллагена и пролиферацию фибробластов [9].

Паракринный эффект обеспечивается секрецией фактора роста кератиноцитов (KGF), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста колоний гранулоцитов-макрофагов, интерлейкина (IL)-6, фактора роста фибробластов (FGF)-10 [10–12]. В свою очередь, кератиноциты синтезируют IL-1, который стимулирует фибробласты к синтезу KGF, образуя, таким образом, стройную систему взаимно стимулирующих положительных обратных связей [13, 14]. А. El Ghalbzourг и соавт. показали, что кератиноциты в культуре образуют тонкий эпидермальный слой и без поддержки мезенхимных клеток подвергаются апоптозу через две недели культивирования [15]. В опытах по выращиванию кератиноцитов на коллагеновом геле, содержащем фибробласты, обнаружено, что фибробласты кожи не только стимулируют пролиферацию кератиноцитов, но и способствуют стратификации эпидермиса на базальный, шиповатый, зернистый и роговой слои.

Паракринная активность фибробластов выражается также в стимуляции образования кровеносных и лимфатических сосудов за счет секреции семейства факторов роста эндотелия сосудов (VEGF), в частности, VEGF-A, -B, -C, -D [16]. Ростовые факторы VEGF-A и, в меньшей степени, VEGF-B влияют на ангиогенез за счет активации эндотелиальных клеток-предшественников. VEGF-C стимулирует ангиогенез, VEGF-D — образование лимфатических сосудов за счет воздействия на рецепторы [16, 17]. При совместном культивировании на коллагеновом геле эндотелиальных клеток и дермальных фибробластов с избыточной экспрессией VEGF-C была выявлена активация эндотелиальных клеток и повышение уровня экспрессии матриксной металлопротеиназы-1, благодаря чему эндотелиальные клетки обрели способность разрушать окружающий коллаген, образовывать капиллярноподобные разветвленные структуры и мигрировать в геле [17].

Стимулирующее влияние на ангиогенез выявлено также у трансформирующего фактора роста (TGF)- $\alpha$ . Ростовой фактор TGF $\beta$ 1 оказывает воздействие на ангиогенез посредством стимуляции синтеза VEGF-B, -C, -D [16, 18]. Основной фактор роста фибробластов (bFGF) ускоряет рост и миграцию эндотелиоцитов, что может быть связано со способностью bFGF контролировать синтез компонентов межклеточного матрикса, которые воздействуют на экспрессию генов [19].

Фибробласты — гетерогенная клеточная популяция, уровень экспрессии генов которой зависит не только от расположения в ткани [6, 20] и выполняемых функций [21, 22], но и от расположения на тех или иных участках тела [23, 24]. Фибробласты взрослого человека сохраняют характерный для эмбриональных клеток *HOX* код, который представляет собой образец экспрессии генов, относящихся к семейству транскрипционных факторов. В период эмбриогенеза экспрессия специфических генов *HOX* определяет различную позиционную идентичность, что приводит к сайт-специфической клеточной дифференцировке и тканевому морфогенезу. Анализ экспрессии генов 47 культур фибробластов из 43 анатомических участков тела взрослого человека показал, что все разнообразие фибробластов обусловлено их происхождением из разных участков тела, принадлежащих к одному из трех анатомических отделов: передне-заднему, проксимально-дистальному или дер-

мально-недермальному. Например, гены *HOXB* (*HOXB2*, *HOXB4*, *HOXB5*, *HOXB6*, *HOXB7* и *HOXB9*) экспрессируются в ограниченном количестве в дермальных образцах из туловища и недермальных образцах, тогда как *HOXD4* и *HOXD8* экспрессируются исключительно в образцах из туловища и ног. Это соответствует роли данных генов в установлении передне-задней оси тела и формировании тела и конечностей в течение процесса эмбриогенеза. *HOXA13*, регулирующий развитие дистальных элементов в процессе эмбриогенеза, экспрессируется исключительно в фибробластах взрослого человека, полученных из дистальных участков тела (стопа, пальцы, крайняя плоть). Данный механизм обеспечивает наличие у фибробластов эпигенетической памяти, которая несет информацию о расположении ткани на теле и о специфичности выполняемых ими на данном участке функций [23]. Транскрипционный образец остается стабильным даже после серии пассажей *in vitro*, что свидетельствует о том, что дифференцированные фибробласты имеют мощные механизмы, ответственные за поддержание своей эпигенетической информации. Происхождение дермальных фибробластов определяет фенотипический профиль и расположенных над ними кератиноцитов [25]. К примеру, при совместном культивировании фибробластов из биоптата кожи ладоней и подошв с кератиноцитами, полученными из других областей, кератиноциты начинают экспрессировать кератин-9 и формировать более толстый эпидермис, что для них не характерно [26]. Представленные данные свидетельствуют о том, что место биопсии необходимо выбирать с учетом анатомического расположения участка кожи, нуждающегося в клеточной терапии.

Фибробласты играют важную роль в процессах эпителизации и заживления ран [27]. Заживление ран включает в себя несколько фаз, среди которых можно выделить следующие: воспаления, грануляции, эпителизации и образования рубца. Начиная с первой фазы, запускается каскад реакций взаимодействия кератиноцитов с фибробластами, в результате которых происходит миграция клеток от края раны по раневому ложу перпендикулярно его краям, пролиферация клеток края раны или вблизи него и пролиферация новообразованного эпителия, мигрировавшего к центру раны. В итоге, формируется эпителий с характерными признаками, свойственными нормальному эпителию данного участка кожи [28]. В случае повреждения ткани одними из первых регуляторных факторов синтезируются KGF/FGF7, которые связываются с FGFR2IIIb-рецептором на кератиноцитах [27, 29]. В случае больших повреждений ткани наблюдается дифференцировка фибробластов в миофибробласты (начиная с фазы грануляции), чему способствуют механические воздействия и активность TGF $\beta$  [30, 31]. Миофибробласты характеризуются измененным синтезом фибронектина и гликозаминогликанов, повышенным синтезом TGF $\beta$ 1, -2, коллагена I типа и рецептора IGF-II/манноза-6-фосфата [32]. Миофибробласты в составе рубцовой ткани вызывают дистрофические изменения кератиноцитов [33–37].

#### **Выделение и культивирование фибробластов *in vitro***

Активные попытки использовать культивированные фибробласты в медицинской практике стали предприниматься после того, как было установлено, что дермальные фибробласты в культуре сохраняют диплоидный кариотип, имеют ограниченную продолжительность жизни [38], не экспрессируют антигены главного комплекса

гистосовместимости класса II, не проявляют онкогенных свойств [39]. Фибробласты получают из биопатов кожи посредством ферментативной обработки или механической дезагрегации образцов. В настоящее время наиболее часто используют ферментативный способ получения первичной культуры. Для этого биопатат промывают физиологическим раствором или фосфатно-солевым буфером, содержащим антибиотики, обрабатывают раствором фермента коллагеназы и/или трипсина. Затем, осторожно пипетируя, клетки освобождают от матрикса, осаждают центрифугированием, отмывают от ферментов и после ресуспендирования в культуральной среде, культивируют в условиях насыщающей влажности в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

Получаемая клеточная популяция — гетерогенна, так как выделенные фибробласты находятся на разных стадиях развития (небольшие веретеновидные активно делящиеся клетки-предшественники; более крупные веретеновидные созревающие клетки; крупные плащевидные зрелые фиброциты) [40]. Кроме того, различают фибробласты сосочкового, сетчатого слоев дермы и фибробласты, ассоциированные с волосяным фолликулом. Каждый тип фибробластов имеет свои особенности: фибробласты сосочкового слоя, по сравнению с фибробластами сетчатого, делятся с большей скоростью, их рост не полностью ингибируется контактным торможением. Фибробласты сетчатого слоя быстрее растут на подложке из коллагена I типа. Фибробласты сосочкового слоя синтезируют протеогликан декорин, в то время как для сетчатых фибробластов характерен синтез версикана. По синтезу коллагена I и III типов дермальные фибробласты значительных различий не имеют.

Имунофенотипический профиль культивируемых фибробластов кожи в норме соответствует профилю клеток мезенхимного ряда. Фибробласты имеют высокий уровень экспрессии виментина, молекул адгезии (CD44, CD49b, CD54, CD90, CD105), не экспрессируют маркеры прогениторных, гемопоэтических (CD34, CD45, CD133, CD117, HLA-DR, нестин) и эндотелиальных (фактор фон Виллебранда, CD106) клеток [41, 42].

На скорость роста и свойства фибробластов в культуре оказывают влияние следующие факторы: количество пассажей, способ культивирования, тип используемых сред и сывороток, возраст донора, область проведения биопсии. Показано, что для культур, полученных от пожилых доноров, скорость удвоения клеточной популяции снижена, наблюдается более быстрое старение клеточных культур, количество клеток в них на момент образования монослоя на 50% меньше, чем у молодых. Это связано с тем, что в клеточных культурах, полученных от пожилых доноров, преобладают более крупные зрелые дифференцированные фибробласты [43].

Для определения пролиферативного потенциала клеточной культуры используют понятие эффективности клонирования, которая представляет долю клеток, способных образовывать колонии из 16 и более клеток в течение 18 сут. Эффективность клонирования в значительной степени зависит от таких факторов, как условия культивирования, количество пассажей, тип используемой сыворотки и, при одинаковых условиях, она является очень точной и воспроизводимой характеристикой штамма клеток. Эффективность клонирования тканеспецифична и, по всей видимости, имеет генетическую предопределенность, так как является постоянной для данного организма и имеет незначительную корреляцию с возрастом донора. Для дермальных фибробластов эффективность клонирования в процессе культивиро-

вания плавно нарастает, достигая максимума на 5 пассаже, затем образуется плато и последующий спад. Такие изменения связаны с кинетикой роста фибробластов: к пятому пассажу постепенно увеличивается доля активно делящихся клеток в силу их селективного преимущества, затем наблюдается постепенное истощение их пролиферативного потенциала. Для фетальных штаммов фибробластов эффективность клонирования находится в пределах 38–82%, для постнатальных штаммов — 12–60% [44].

Считается, что из аллогенных фибробластов наибольшей клинической эффективностью обладают эмбриональные (фетальные) фибробласты, которые имеют больший пролиферативный потенциал по сравнению с клетками постнатальных культур. Однако их применение имеет ряд ограничений, в том числе этического характера. В то же время показано, что фибробласты от пожилых доноров сохраняют свой терапевтический потенциал, не теряют способность делиться и продуцировать коллаген I типа, несмотря на уменьшение их числа и эффективности клонирования в стареющем организме [41]. V.J. Cristofalo и соавт., проанализировав клетки 124 здоровых доноров, показали, что продолжительность жизни фибробластов в культуре не коррелирует с возрастом пациента [45]. Также показано, что пролиферативный ответ культивируемых фибробластов на стимуляцию цитокинами и способность синтезировать коллаген и неколлагеновые белки после стимуляции FGF не зависят от возраста донора клеток [46].

**Кожные эквиваленты:  
преимущества использования живых клеток  
по сравнению с факторами роста и компонентами  
межклеточного матрикса**

В настоящее время существует целый ряд коммерческих продуктов на основе искусственно полученных наполнителей и биодеградируемых матриц. Среди множества применяемых материалов можно выделить несколько групп: синтетические и эндогенные ростовые факторы; различного рода наполнители; живые кожные эквиваленты.

Что касается ростовых факторов, то в медицинской практике, для ускорения естественной регенерации тканей при локальном использовании, они не нашли широкого применения в силу кратковременности действия (из-за быстрого вымывания раневым экссудатом, деградация в кислом экссудате) и неэффективности при больших повреждениях кожи (из-за отсутствия клеточмишеней в зоне повреждения).

В то же время, в ряде случаев использование эндогенных факторов (в виде лизатов клеточных культур или экстрактов секреторных клеток) в сочетании с компонентами межклеточного матрикса оказалось достаточно эффективным [47].

В настоящее время в мире существует более сотни различных наполнителей и имплантационных материалов, представляющих собой как аналоги естественных компонентов межклеточного матрикса, так и биосовместимые материалы, сходные по своим физическим свойствам с тканями организма. К используемым веществам предъявляются строгие требования: материалы должны быть безопасны, эффективны, стабильны, рентабельны, не аллергенны, физиологичны, удобны в применении. Ни один из известных наполнителей не обладает данными качествами одновременно, поэтому подборка или разработка оптимального материала в соответствии с поставленной задачей является весьма актуальной.

Имплантационные материалы можно подразделить на следующие группы.

1. Гидрофобные синтетические препараты (производные полидиметилсилоксана): Bioplastique – Голландия; Adatosil-5000; Silikon-1000; Biopolimero-350 – Испания; SilSkin. Данные силиконовые препараты не подвергаются биодеградации (возможна лишь некоторая их деструкция под действием активных форм кислорода), не вызывают аллергических реакций. Однако, инъекционное введение силикона может вызывать отдаленные осложнения в виде неспецифического воспаления или гранулем.

2. Гидрофильные препараты. Среди препаратов данной группы наиболее распространен полиакриламидный гель, выпускаемый под разными коммерческими названиями (Интерфалл, Украина; Формакрил, Биоформакрил, Космогель, Агриформ – Россия; Аквамид – Италия; Амазингель – Китай; Артеколл – Голландия; Дермалайф – Франция). Данные материалы – не биодеградируемые, косметический эффект достигается за счет введения микросфер геля, вокруг которых, со временем, образуются фиброзные капсулы. Иногда гель вводят совместно с гиалуроновой кислотой (Дермалайф) и коллагеновым наполнителем (Артеколл).

3. Декстран и гиалуроновая кислота (Ревидерм интра – Голландия; Матридекс, Матридур – Германия). Препарат Ревидерм интра, содержащий декстрановые микросферы и 2% гиалуроновую кислоту, принципиально отличается от препаратов первых двух групп тем, что не только эффективно корректирует дефекты кожи, но и, благодаря декстрану, стимулирует синтез коллагена в дерме. Препарат предназначен для коррекции морщин, моделирования губ и овала лица; обладает длительным клиническим эффектом.

4. Коллагеновые препараты на основе бычьего коллагена (GeteroCollagen Zyderm I, Zyplast – США; Resoplast – Голландия; AutoCollagen, Autologen, Allo Collagen – Dermalogics, Fascian, Alloderm, Cymetra, Fibrel, PlasmaGel, Cosmoplast, Cosmoderm, DermiCol). Данные препараты используются в медицинской практике уже более 10 лет и занимают лидирующее место в мире по частоте применения. Эффект при коррекции морщин сохраняется от 3 мес. до года. Но, у 1–9,8% пациентов применение данных препаратов вызывает аллергические реакции.

5. Препараты на основе гиалуроновой кислоты (Restylane – Швеция; Restylane fine line, Perlane, Macrolane, Hylaform – Канада; Hylafoorm fine line, Hylaform plus, Juvederm – Франция; Rofilan hyan – Голландия; MacDermol – Франция).

Гиалуроновая кислота – природный полисахарид, не видоспецифичен, обладает способностью удерживать воду. Аллергические реакции, развивающиеся в ответ на инъекционное введение гиалуроновой кислоты – крайне редкое явление, связанное, в основном, с наличием в препарате примесей других белков. Данный материал получают из петушиных гребней или биотехнологическим путем (бактериальный синтез). В коммерческих целях используют стабилизированную гиалуроновую кислоту, поскольку ее естественный аналог выводится из места введения в течение 1–10 сут. Препараты на основе модифицированной гиалуроновой кислоты применяют для коррекции мелких и глубоких морщин, гипотрофических рубцов. Основным недостатком большинства рассмотренных препаратов является кратковременность клинического эффекта.

Учитывая данные о том, что введенные экзогенные материалы имеют способность постепенно замещаться эндогенными структурами [48], возникла идея создания ниши из искусственного матрикса для миграции и пролиферации собственных клеток реципиента, которая и была с успехом реализована компанией Integra LifeSciences (Plainsboro, NJ, США) в препарате Integra. Препарат, состоящий из коллагеновой кожной матрицы с хондроитин-6-сульфатом и временным силиконовым эпидермальным слоем, способен создавать условия для неоваскуляризации и миграции собственных фибробластов [49]. Сходный механизм действия имеют и препараты на основе кожи, лишённой клеточных элементов (Alloderm, США), 3D-коллагеновые матрицы [50]. Данные препараты используют, в основном, для лечения острых и хронических ран, ожогов.

Срок жизни имплантатов может быть значительно увеличен при совместном использовании их с живыми клетками [51]. Применение гиалуроновой кислоты в качестве наполнителя широко распространено в косметологии и позволяет добиться хорошего клинического эффекта, но, в силу достаточно быстрой ее деградации, возникает необходимость в повторных инъекциях препарата. В эксперименте на бестимусных мышцах было показано, что увеличение срока жизни имплантата, состоящего из стабилизированной гиалуроновой кислоты (например, Restylane), возможно за счет присоединения к нему культивированных дермальных фибробластов. Было показано, что при подкожном инъекционном введении мышам смеси, состоящей из суспензии фибробластов ( $5 \cdot 10^5$  клеток в 200 мкл фосфатно-солевого буфера) и Restylane (200 мкл) лишь в течение первых 2-х нед. наблюдалось незначительное уменьшение в объеме образовавшихся подкожных узелков, затем на протяжении всего срока наблюдения (16 нед.) объем узелков не изменялся. В то же время, подкожные узелки в контрольной группе, образовавшиеся в результате введения 200 мкл фосфатно-солевого буфера и 200 мкл Restylane, уменьшились за время наблюдений в 2 раза. При иммунохимическом окрашивании в образцах, полученных из подкожных узелков опытной группы, в отличие от узелков контрольной группы, был выявлен коллаген человека, что может свидетельствовать о постепенном замещении экзогенной гиалуроновой кислоты компонентами эндогенного матрикса [51].

В этой связи представляется перспективным создание препаратов, содержащих экзогенный носитель и живые клетки, поскольку экзогенный бесклеточный носитель способен образовывать пространственную нишу для функционирования клеточных элементов, которые, в свою очередь, способны продуцировать ферменты и цитокины, усиливать миграцию аутогенных клеток, что позволит значительно увеличить как срок жизни, так и клиническую эффективность трансплантата. Благодаря наличию живых клеток такой трансплантат может быть эффективным даже в случае глубоких повреждений кожи в отсутствие собственных клеточных компонентов дермы [52, 53].

Живые кожные заменители подразделяют на дермальные, эпидермальные и двойные. В табл. представлены основные коммерческие продукты, выпускаемые в настоящее время.

## Коммерческие продукты, официально применяющиеся в медицинской практике

Производитель, краткая информация	Название продукта	Краткая характеристика продукта	Стадия клинической разработки	Цена, USD
Advanced Biohealing США	Dermagraft®	<b>Состав:</b> криоконсервированные аллогенные фибробласты человека (из кожи крайней плоти новорожденных), выращенные на биосорбирующем сетчатом скаффолде из полиглактина (викрила) <b>Назначение:</b> лечение длительно незаживающих ран при синдроме диабетической стопы	Лечение длительно незаживающих ран при синдроме диабетической стопы; коммерческий продукт на рынке США Лечение длительно незаживающих ран нижних конечностей при варикозной болезни: III фаза FDA; продукт в процессе клинических исследований	\$1300 за лоскут 5×8 см; 10,48 евро/см <sup>2</sup>
Forticell Bioscience, Inc. США	OrCel®	<b>Состав:</b> двухслойный матрикс из бычьего коллагена 1 типа, на поверхности и в пористом слое которого находятся аллогенные дермальные фибробласты, а на непористом слое – эпидермальные кератиноциты от того же донора <b>Назначение:</b> лечение острых и длительно незаживающих ран, а также кожных заболеваний	Лечение буллезного эпидермолиза (не криоконсервированный продукт); коммерческий продукт на рынке Лечение ожоговых ран (не криоконсервированный продукт); коммерческий продукт на рынке Лечение длительно незаживающих ран нижних конечностей при варикозной болезни (криоконсервированный продукт): III фаза FDA завершена; коммерческий продукт Лечение синдрома диабетической стопы: III фаза FDA; продукт в процессе клинических исследований	Ок. \$1000 за лоскут 5×5 см
Genzyme Corporation США	Epicel®	<b>Состав:</b> искусственно полученный эпидермальный ауто трансплантат, представляющий пласт (от 2 до 8 слоев клеток) аутогенных кератиноцитов, культивированные ex vivo в присутствии мышинных фибробластов <b>Назначение:</b> лечение обширных ожоговых поражений кожи (от 30% тела)	Коммерческий продукт с 1988 г. Пролечено более 1300 пациентов	\$1170 за 50 см <sup>2</sup>
Intercytex Великобритания	Cyuzact® (ICX-PRO)  VAVELTA®	<b>Состав:</b> аллогенные фибробласты кожи человека в матриксе из фибринового геля человека <b>Назначение:</b> лечение длительно незаживающих ран (в т. ч. при варикозной болезни и синдроме диабетической стопы)  <b>Состав:</b> суспензия аллогенных дермальных фибробластов (из кожи крайней плоти новорожденных) в специальной питательной среде <b>Назначение:</b> средство для коррекции возрастных изменений кожи, рубцов (после акне и ожогов)	Лечение длительно незаживающих ран нижних конечностей: III фаза FDA; клинические исследования прекращены из-за отсутствия ожидаемого клинического эффекта  Лечение рубцов постакне: II фаза FDA завершена, коммерческий продукт на рынке Великобритании Коррекция возрастных изменений кожи: II фаза FDA завершена, коммерческий продукт на рынке Великобритании Врожденный буллезный эпидермолиз: I фаза FDA; продукт в процессе клинических исследований	н/д  \$1500 за дозу (20 млн клеток)

Продолжение таблицы

Производитель, краткая информация	Название продукта	Краткая характеристика продукта	Стадия клинической разработки	Цена, USD
	ICX-TRC <sup>®</sup>	<b>Состав:</b> препарат аутогенных дермальных фибробластов из волосных сосочков человека <b>Назначение:</b> лечение алопеций	Лечение мужского облысения: II фаза FDA завершена	
Invitrx, Inc. США	Invitrx CSS <sup>™</sup> (Composite Skin Substitute)	<b>Состав:</b> 3-мерный кожный эквивалент, состоящий из кератиноцитов (верхний слой) и дермальных аутогенных фибробластов, помещенных на коллаген и (или) викриловую сетку <b>Назначение:</b> Лечение ожогов и длительно незаживающих ран	Лечение ожогов и длительно незаживающих ран; коммерческий продукт (за исключением рынка США)	н/д
Isolagen Inc. США	Isolagen Therapy <sup>™</sup>	<b>Состав:</b> суспензия аутогенных культивированных фибробластов кожи (полученных из-за ушной раковины пациента) <b>Назначение:</b> коррекция возрастных изменений кожи и рубцов постакне	Коррекция носогубных складок и устранение/уменьшение морщин: III фаза FDA завершена (2008), коммерческий продукт на рынках Великобритании Пост-акне рубцы: III фаза FDA в стадии завершения (1 кв. 2009); продукт в процессе клинических исследований Лечение рубцов вследствие ожогов: II фаза FDA; продукт в процессе клинических исследований Восполнение утраченных мягких тканей пародонта: II фаза FDA; продукт в процессе клинических исследований	\$5000–6000 за лечебный курс
LifeCell Corporation США	AlloDerm <sup>®</sup>	<b>Состав:</b> криоконсервированный бесклеточный дермальный матрикс, полученный из донорской кожи человека <b>Назначение:</b> лечение ран и ожогов, восстановлении кожных покровов (более 1 млн случаев применения)	Коммерческий продукт	\$1550 за лоскут 4×12 см;
	Cymetra <sup>®</sup>	<b>Состав:</b> икрокорпускулированная форма AlloDerm, дающая возможность инъекционного введения с минимальным повреждением тканей <b>Назначение:</b> коррекция дефектов мягких тканей, включая ларингопластику	Коммерческий продукт	\$337 за 1 мл; \$443 за 2 мл
	Strattice <sup>™</sup>	<b>Состав:</b> стерильный матрикс из свиной дермы, получаемый путем удаления иммунокомпетентных клеток <b>Назначение:</b> восстановление мягких тканей, включая маммопластику	Коммерческий продукт	н/д
Organogenesis Inc. США	Apligraf <sup>®</sup>	<b>Состав:</b> Двухслойный искусственный эквивалент кожи, состоящий из дермального (аллогенные фибробласты на коллагеновом гелевом матриксе) и эпидермального (кератиноциты,	Лечение длительно незаживающих ран; коммерческий продукт на рынках США, Канады и Великобритании	\$1300 за стандарт. диск диаметром 7,5 см; 20,85 евро/см <sup>2</sup>

Окончание таблицы

Производитель, краткая информация	Название продукта	Краткая характеристика продукта	Стадия клинической разработки	Цена, USD
		выращенные на предварительно сформированном дермальном слое) слоев. Пролечено более 200 тыс. пациентов <b>Назначение:</b> лечение длительно незаживающих ран (в т. ч. при варикозной болезни и синдроме диабетической стопы)		
Smith & Nephew (Pty) Ltd Великобритания	TransCyte™ (панель Dermagraft-TC и Dermagraft Transitional Covering)	<b>Состав:</b> полимерная силиконовая мембрана размером 13×19 см, покрытая нейлоновой сеткой, на которую нанесен слой свиного коллагена с аллогенными фибробластами человека. Коммерческий продукт в криоконсервированном виде <b>Назначение:</b> временное покрытие для лечения ран и тяжелых ожогов	Коммерческий продукт	11,55 евро/см <sup>2</sup>
	Biobrane™	<b>Состав:</b> синтетическая повязка на рану, состоящая из силиконовой мембраны с частично погруженной в нее нейлоновой сетки с химически связанным свиным коллагеном. Коммерческий продукт в криоконсервированном виде <b>Назначение:</b> быстрое и эффективное заживление тяжелых ожогов	Коммерческий продукт	0,70 евро/см <sup>2</sup>

В настоящее время разработан и лицензирован целый ряд коммерческих продуктов на основе матрицы из бычьего коллагена I типа (или полиглактина), донорских аллогенных фибробластов и кератиноцитов (в частности, Apligraf, Dermagraft). Данные кожные трансплантаты обладают рядом неоспоримых достоинств: при их использовании, как правило, достаточно одной трансплантации; удобны в применении; содержат неонатальные фибробласты, обладающие высоким пролиферативным потенциалом [54]. Так, трансплантат Apligraf успешно применен в США более чем 200 000 пациентов при лечении ожогов [55, 56].

Одним из факторов, ограничивающим сроки хранения кожных трансплантатов является способность фибробластов вызывать быструю контракцию коллагенового геля. Учитывая данный факт, российскими учеными был разработан полный аналог кожи, состоящий из коллагенового геля с заключенной в него эндопротезной сеточкой, фибробластов и выращенных на поверхности кератиноцитов. Эндопротезная сеточка, в данном случае, выполняет роль каркаса, предотвращающего контракцию геля, а также облегчает процесс доставки и фиксации трансплантата [57].

Сравнительный анализ применения различных кожных трансплантатов для лечения длительно незаживающих ран (были сформированы следующие группы: 1 — фибробласты на коллагеновом геле (11 пациентов); 2 — фибробласты, затем через 2–3 дня кератиноциты (17 пациентов); 3 — полный аналог кожи — фиброблас-

ты на коллагеновом геле и кератиноциты (38 пациентов); 4 — многослойный пласт кератиноцитов (14 пациентов) и 5 — контрольная группа, получившая традиционное лечение), показал, что наиболее хороший клинический эффект наблюдается у пациентов, которым была осуществлена последовательная трансплантация фибробластов, а затем через 2–3 дня — многослойного пласта кератиноцитов. При этом методе лечения отмечали самый высокий уровень эпителизации ран и отсутствие рецидивов. В целом, эпителизация ран у пациентов 2, 3 и 4 групп наблюдалась в сходном проценте случаев (93,0±0,6%), тогда как заживление ран в группе 1 было сопоставимо с контрольной группой, что может быть связано с большой площадью раневой поверхности и, соответственно, затрудненностью миграции собственных кератиноцитов пациента. Таким образом, сравнительный анализ продемонстрировал: применение двойного кожного трансплантата является наиболее эффективным методом лечения длительно незаживающих ран. Высокий уровень эпителизации ран с помощью многослойного пласта кератиноцитов, по всей видимости, связан с наличием на ране пациента собственных фибробластов в достаточном количестве. Также следует учитывать, что выбор оптимального метода лечения должен осуществляться с учетом особенностей каждого конкретного клинического случая [58].

В литературе [59] описана методика получения двойного кожного эквивалента без использования экзогенных материалов. Фибробласты человека культивируют в сре-

де DMEM:F12 (3:1) с добавлением 10% FBS и факторов роста: 5 нг/мл EGF, 5 мг/мл инсулина, 0,4 мг/мл гидрокортизона, 5 мг/мл трансферрина и  $10^{-11}$  М трийодтиронина. Через 3 нед. культивирования на поверхности чашки Петри формируется волокнистый клеточный слой, который легко отделяется с помощью пинцета. Образовавшийся волокнистый клеточный пласт складывают в 2–3 раза и на его поверхность высевают кератиноциты, которые остаются погруженными в культуральную среду в течение 2 сут., после чего клетки культивируют еще в течение 2 нед. на границе жидкость – воздух. Последующая трансплантация полученной конструкции бестимусным мышам выявила наличие в коже компонентов базальной мембраны человека, вновь образованных сосудов мыши, а также хорошую приживляемость дермального эквивалента. Таким образом, данная методика позволяет получить полностью аутогенные кожные трансплантаты для лечения пациентов, имеющих гиперчувствительность к экзогенным материалам.

#### **Сравнение аутогенного и аллогенного клеточного материала**

Для лечения кожи применяют как аллогенные, так и аутогенные фибробласты. При использовании аутоклеток наблюдается длительный клинический эффект, исключен риск заражения пациента инфекционными агентами (HIV, RW, HCV и др.), а также риск развития аллергических реакций, не возникает трудностей с поиском подходящих доноров. Так, после однократного применения аутофибробластов для лечения длительно незаживающих ран (диабетических, трофических и др.) площадью 1–10 см<sup>2</sup>, полное восстановление кожи наблюдается в течение 8 нед. [60]. При коррекции контура лица, носогубных складок, атрофических рубцов клинический эффект сохраняется в течение 12–48 мес. после третьей трансплантации фибробластов [61, 62]. Для получения аутогенных клеток биопсию кожи, при необходимости, можно проводить неоднократно, клетки можно использовать (или замораживать для последующих процедур) на ранних пассажах в довольно больших количествах (для получения достаточного количества аутогенных фибробластов необходимо 3–6 нед.).

Для лечения острых ран и ожогов, в настоящее время, успешно применяют аллогенные фибробласты в составе кожных эквивалентов. Незамедлительное применение аллофибробластов способствует быстрому восстановлению дермы, ускорению заживления ран, снижению риска образования рубцов [63]. Аллотрансплантат, синтезируя цитокины и другие компоненты межклеточного матрикса, стимулирует пролиферацию и дифференцировку собственных клеток реципиента, обеспечивая, тем самым, быстрое заживление ран [64]. Коллаген, продуцируемый аллогенными фибробластами, обнаруживают в трансплантате уже через 2 нед. [51]. При использовании аллогенных фибробластов (с коллагеновым матриксом или гиалуроновой кислотой) для лечения длительно незаживающих ран не было выявлено ни аллергических реакций, ни реакций отторжения клеток [65, 66]. Но жизненный срок аллогенных фибробластов в трансплантате весьма ограничен. Так, при использовании кожного трансплантата Arligraf аллогенные фибробласты не обнаруживаются уже через 6 нед. после нанесения препарата на свежие раны [67]. По всей видимости, для создания трансплантата с длительным сроком жизни целесообразно использовать аутоклетки, которые, по сравнению с аллогенными, сохраняются в

трансплантате гораздо дольше и их терапевтическое действие, соответственно, более длительное [68, 69].

#### **Безопасность применения клеточного материала**

Широкое использование клеточных технологий в медицинской практике требует разработки стандартной системы обеспечения биологической безопасности применяемых препаратов. Вопросы биологической безопасности культивируемых клеток касаются использования культуральных сред и сывороток, условий культивирования, тестирования клеток на наличие вирусных инфекций и микоплазм, онкогенных свойств, патологических трансформаций клеток, стабильности хромосомного аппарата [70, 71].

Культивирование клеток проводят в специализированных GMP-лабораториях, в соответствии с международными стандартами. В связи с тем, что в культуральную среду добавляют фетальную сыворотку коров, были высказаны опасения о возможности заражения пациентов бычьей губчатой энцефалопатией. По этой причине в настоящее время используют сыворотку, поставляемую из стран, в которых не было отмечено случаев данного заболевания [72]. Но самое верное решение в данной ситуации – при культивировании клеток использовать бессиывороточные среды.

В связи с тем, что клеточные технологии в Российской Федерации получили развитие только в последние несколько лет, в настоящее время вопросы стандартизации обследования клеточных культур находятся в разработке. В этой связи, в отсутствие специализированной законодательной базы, при тестировании клеточных культур следует учитывать следующие документы: Закон РФ «Об охране здоровья населения Российской Федерации», «О трансплантации органов и тканей человека», «Временной инструкции о порядке исследования в области клеточных технологий и их использования в учреждениях здравоохранения» от 18.04.2002, Приказ № 325 МЗ РФ «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации» от 25.07.2003, а также Методические Указания 4.1/4.2.588.96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям» от 31.10.1996. В соответствии с вышеперечисленными документами кровь донора клеток и полученные культуры фибробластов должны быть обследованы методами твердофазного ИФА и ПЦР на наличие инфекционных агентов: провирусной ДНК и вирусной РНК ВИЧ-1 и ВИЧ-2; РНК вируса гепатита С; ДНК вируса гепатита В; ДНК вирусов простого герпеса 1 и 2-го типов; ДНК вируса Эпштейна – Барр; ДНК папилломавирусов 6-го и 11-го типов; ДНК микоплазмы; ДНК токсоплазмы [73].

Доклинические исследования на бестимусных мышках показали, что культивированные фибробласты не проявляют онкогенных свойств. Также не было обнаружено окислительных повреждений ДНК [74]. В культуре клеток не наблюдали трансформации фибробластов в патологические, вызывающие фиброз тканей [36]. Также не наблюдали образование келоидных и гипертрофических рубцов вследствие внутрикожных инъекций аутодермальных фибробластов [61, 75]. Использование аутодермальных фибробластов для коррекции морщин и рубцов постакне (компания ISOLAGEN, США) продемонстрировало безопасность и клиническую эффективность данной процедуры (завершена III фаза клинических исследований FDA, пролечено 1250 пациентов (4800 инъекций), наблюдения проводили в течение 7 лет)



[76].

Учеными доказано, что при длительном культивировании фибробласты теряют способность синтезировать белки внеклеточного матрикса, возникает риск накопления в клетках хромосомных аномалий [46, 77]. В этой связи, наиболее безопасными для клинического применения являются фибробласты, находящиеся на более ранних пассажах (обычно 4–6).

Фоновый уровень хромосомных aberrаций для различных тканей человека составляет около 3%. В этой связи, для предотвращения отдаленных последствий применения клеточных препаратов необходимо проводить анализ стабильности хромосомного аппарата используемых клеток, поскольку уже на ранних пассажах возможно появление субклонов с хромосомными аномалиями [78]. Цитогенетический анализ может включать комплексное исследование культуры по доле клеток (в промилле) с двойными ядрами и микроядрами клеток в состоянии апоптоза, долей клеток с преждевременной конденсацией хромосом по отношению к количеству делящихся клеток [79]. Также можно проводить рутинный анализ хромосомных aberrаций, при котором учитывается количество одиночных и парных фрагментов, кольцевых и дицентрических хромосом, обменов хромосомного и хроматидного типов; в исследование включают не менее 200 метафаз [80]. Необходимо также проводить кариотипический анализ хромосом (не менее 20 метафаз для культуры) с помощью дифференциального окрашивания или методами SKY, mFISH. Для определения уровня анеуплоидий, тетраплоидизации и точечных разрывов хромосом удобно использовать FISH с соответствующими ДНК-зондами [81].

#### **Применение фибробластов в косметологии**

Кожа подвергается многочисленным воздействиям окружающей среды и со временем в ней наблюдаются такие изменения, как образование морщин, растяжек, снижение упругости и эластичности, изменение пигментации. Наиболее значимым экзогенным фактором, усугубляющим естественные возрастные изменения, является ультрафиолетовое излучение [82]. С возрастом в коже происходит изменение баланса между процессами синтеза и деградации компонентов межклеточного матрикса, в результате чего в дерме уменьшается содержание гликозаминогликанов, коллагена, образование ковалентных связей между волокнами [42, 83, 84]. Эластические волокна подвергаются значительным дегенеративным изменениям, в результате чего образуются аморфные скопления эластоидного материала (особенно на открытых участках кожного покрова), между которыми откладываются гликозаминогликаны; одновременно с этим наблюдается снижение содержания гликозаминогликанов между коллагеновыми волокнами [42, 85].

Образование морщин является результатом множественных изменений компонентов эпидермиса, дермы и гиподермы. Показано, что эпидермис морщины подвергается значительной атрофии, одновременно с этим наблюдается снижение экспрессии некоторых маркеров дифференцировки кератиноцитов. В базальной мембране снижается содержание коллагена IV и VII типов. В дерме наблюдаются разрывы эластических и атрофия коллагеновых волокон, изменяется состав гликозаминогликанов [42].

Для нехирургической коррекции возрастных измене-

ний кожи первоначально использовали бычий коллаген, который у 1–6% пациентов вызывал аллергическую реакцию [86]. Применение аутоколлагена позволило исключить риск развития таких реакций у пациентов. Однако данный метод имеет существенные ограничения: сложность получения собственного коллагена в достаточном количестве и необходимость повторных инъекций в результате быстрой деградации имплантированного материала [87]. Положительный и относительно длительный эффект был получен при липофилинге — пересадке аутожира. Чаще всего липофилинг используют для восполнения объема лица при возрастных изменениях, для коррекции атрофических рубцов, липодистрофии и склеродермии [88]. Хороший косметический эффект для коррекции морщин был получен при использовании смеси аутоматериалов из элементов дермы, мышечной ткани, жировой ткани и фасций. Метод был апробирован на 450 пациентах с длительностью наблюдения от 6 мес. до 10 лет [89].

Длительный и выраженный клинический эффект был получен при использовании культивированных аутофибробластов для коррекции морщин, атрофических рубцов, депрессии кожи, нарушений структуры кожи после воспалительных процессов акне [76]. Клинический эффект сохраняется более 2-х лет. В клинических исследованиях по применению суспензии аутофибробластов для коррекции морщин и рубцов кожи лица принимали участие 154 пациента [90]. У 107 человек проводили коррекцию морщин (27 получили плацебо), у 47 — коррекцию рубцов после травм и акне, из них плацебо получили 14 пациентов. Клеточный материал применяли в концентрации 20 млн клеток/мл. Курс лечения состоял из трех процедур, с интервалом между процедурами 3–6 нед., количество вводимых клеток за 1 процедуру составляло 20 млн. Клинический эффект оценивали врач и пациент через 1, 2, 4, 6 мес. по 7-бальной фотошкале. Анализ полученных результатов показал, что через месяц положительный клинический эффект наблюдался у 57% пациентов, к 6-му мес. — у 82% пациентов.

В клинических исследованиях по применению аутофибробластов для лечения атрофических рубцов кожи лица (после акне) участвовали 30 пациентов. В группу сравнения вошел 31 человек с сопоставимой патологией. После 4-кратного химического пилинга на основе 15% трихлоруксусной кислоты пациентам опытной группы интрадермально вводили суспензию аутогенных культивированных фибробластов (от 1 до 10 млн в зависимости от размера рубца), курс состоял из 3-х процедур с интервалом в месяц. Через 6 мес. у пациентов опытной группы с «молодыми» рубцами, уровень выравнивания поверхности рубца по отношению к здоровой коже составил 40%, уменьшение глубины рубца на 50% отмечали у 26,7% пациентов; 33,3% пациентов оценили результат, как удовлетворительный. У пациентов со «старыми» рубцами хороший клинический результат был отмечен в 28,6% случаев; 71,4% пациентов были удовлетворены результатом. В группе сравнения за период наблюдения положительная клиническая динамика отсутствовала [91].

Таким образом, применение культивированных аутофибробластов, в качестве живой динамичной клеточной системы, позволяет эффективно корректировать возрастные изменения кожи и рубцы постакне с длительным клиническим эффектом.

Что касается применения аллогенных клеток для коррекции дефектов кожи, то целесообразность такой идеи вызывает сомнение, поскольку, как показали ис-

следования на бестимусных мышах, быстрая элиминация аллогенных фибробластов наблюдается даже у иммунодефицитных животных [92]. Возможно, применение аллогенных клеток будет оправданным в тех случаях, когда возраст пациента превышает 60 лет, так как в ряде работ было показано снижение эффективности терапии собственными фибробластами у людей старше 65 лет [93].

Имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют предположить, что наиболее перспективным направлением развития технологий коррекции косметических дефектов является совместное использование аутодермальных фибробластов с компонентами межклеточного матрикса. Исследования по разработке препарата, содержащего гиалуроновую кислоту и дермальные фибробласты человека, показали, что быстрый видимый клинический эффект от использования коммерческих наполнителей можно успешно сочетать с долговременным эффектом от применения живых фибробластов [51]. Эти результаты были использованы в клинической практике для коррекции дефектов носа у 11 пациентов, где 7 пациентам инъецировали трансплантат (Restylane + аутодермальные фибробласты от  $10^7$  до  $1,5 \cdot 10^7$ ) в качестве первичного вмешательства, 4 пациентам — в качестве процедуры после удаления силиконового импланта. Длительное (более года) наблюдение показало, что 5 пациентов из 6 были удовлетворены клиническим результатом. Несмотря на то, что у пациентов наблюдалось постепенное уменьшение трансплантационного материала, авторы отмечают явные преимущества данного метода: простота применения, низкая травматичность, быстрый видимый результат, безопасность применения аутогенного клеточного материала. В целом, данный метод признается перспективным для коррекции мягких тканей лица и нуждается в дальнейших исследованиях для определения оптимальных концентраций дермальных фибробластов [94].

#### **Применение фибробластов для лечения ожогов**

Ожоговый травматизм представляет собой серьезную медицинскую и социальную проблему. Ежегодно в Российской Федерации регистрируют более 600 тыс. случаев ожогов, общая летальность от которых колеблется от 2,3 до 3,6% [95]. При потере дермы (ожоги III Б степени и выше) истинное восстановление кожи невозможно без дополнительного вмешательства, заживление сопровождается образованием рубцов [96]. Пограничные ожоги IIIA степени могут заживать самостоятельно, но эпидермальные производные при этом находятся под угрозой гибели [97].

На сегодняшний день разработан ряд перевязочных средств для лечения глубоких ожогов, позволяющих снизить риск инфекционного заражения, потерю белка и жидкости. Данные перевязочные средства представляют собой биологические повязки (аллогенная консервированная кожа, в том числе и кадаверная, ксенотрансплантаты, амниотическая оболочка, препараты на основе коллагена — Комбутек, Alloderm), а также препараты растительного происхождения (альгипор) и синтетические покрытия (Синкрит, Эпигард, Сис-пур-дерм, различные плёнки и др.) [98–102]. По литературным данным, в случае пограничных ожогов возможна эпителизация ран при использовании биологических повязок (на основе свиной кожи, денатурированной амниотической пленки), однако, при ожогах большей степени тяжести, зачастую, требуется пересадка кожи [97, 103].

Лечение ожогов, как правило, проводят в две стадии, при этом кожная матрица с искусственным эпидермисом создает условия для аутогенной васкуляризации и миграции фибробластов реципиента в искусственный кожный каркас. После образования новой дермы временный эпителий удаляют и заменяют эпидермальным аутоотрансплантантом. Коммерческим продуктом такого типа является Integra (Integra LifeSciences, Plainsboro, NJ, США) [49].

Большой прорыв в области комбустиологии был обусловлен появлением клеточных технологий. Первые опыты клеточной терапии ожоговых ран связаны с трансплантацией культивированных аутогенных [104–108] или аллогенных [109–111] кератиноцитов. Однако, в отсутствие фибробластов, кератиноциты, хоть и оказывают стимулирующее действие на собственные клетки реципиента, практически не приживаются при трансплантации на гранулирующие ожоговые раны [105, 109].

В 1993 г. в Институте хирургии им. А.В. Вишневского РАМН был разработан способ лечения ожоговых ран с применением культивированных аллогенных фибробластов [112, 113]. Показано, что трансплантация культивированных фибробластов при лечении ожогов IIIA степени значительно ускоряет эпителизацию ран и обеспечивает заживление пограничных ожогов уже через 6–8 сут. после операции [114–116]. Аллогенные фибробласты стимулируют пролиферацию и дифференцировку периваскулоцитов реципиента, которые, трансформируясь в фибробласты, способствуют пролиферации и миграции кератиноцитов [117, 118]. Благодаря этому достигается более длительный клинический эффект по сравнению с трансплантацией кератиноцитов.

Имеющийся клинический опыт применения аллогенных фибробластов в различных ожоговых центрах [115, 119–122] показал высокую эффективность метода и хорошую приживаемость клеточных трансплантатов (в среднем 97%). Преимуществом метода является также возможность создания банка аллогенных клеток и относительно небольшая себестоимость аллотрансплантатов.

Наиболее перспективным направлением является производство различных кожных эквивалентов, которые включают не только культивированные клетки, но и дермальный эквивалент, состоящий из коллагена, гликозаминогликанов и других носителей [123–125]. Кожные эквиваленты, включающие культивированные аллогенные кератиноциты, фибробласты и коллагеновую матрицу [124], имеют ряд преимуществ, в том числе: клетки в них находятся в активном функциональном состоянии, близком к таковому в ткани организма; фибробласты и кератиноциты оказывают взаимостимулирующее действие; коллагеновая матрица выполняет функцию внеклеточного матрикса до тех пор, пока не заместится тканями реципиента.

Современные подходы к применению клеточных технологий для лечения ожоговых ран часто ограничиваются использованием коммерческих кожных эквивалентов с последующей трансплантацией кожи пациента. Данный метод позволяет улучшить эпителизацию ран, повысить приживаемость трансплантатов кожи пациента, сократить раневую поверхность, нуждающуюся в пересадке кожи, снизить риск образования рубцов. Однако, в случае обширных ожогов (более 60% поверхности тела) возникает дефицит собственной кожи пациента. По этой причине наиболее перспективным является комплексный подход к лечению ожоговых ран, который включает первоначальную трансплантацию аллогенных

кожных заменителей с последующей заменой их на аутогенные клеточные трансплантаты. Интерес к пересадке культивированных аутофибробластов пациента объясняется возможностью создания постоянного трансплантата с минимальной травматизацией собственных тканей пациента. Из относительно небольшого кусочка кожи можно выделить клетки, способные покрыть раневую поверхность, в тысячи раз превышающую площадь донорской кожи [49, 126].

**Использование фибробластов для лечения длительно незаживающих ран (трофических, диабетических, лучевых)**

Хронические незаживающие раны развиваются в результате длительного воздействия аномальных физиологических условий (пролежни), нарушений функционирования сосудов и повышения их ломкости (атеросклероз, тромбоз, варикоз, последствия сахарного диабета) или вредных воздействий окружающей среды (радиационные и прочие излучения). Несмотря на разнообразие причин, в патогенезе длительно незаживающих ран главное значение имеют процессы нарушения трофики кожи. В случае механических воздействий нарушается локальная микроциркуляция крови и лимфы в сосудах и капиллярах; венозная гипертензия при варикозной и посттромботической болезни приводит к целому каскаду реакций, результатом которых является постепенно нарастающий дефицит клеток и, в конечном итоге, деструкция тканей [127]. Особенность влияния ионизирующих излучений заключается в их крайне разрушительном действии на хромосомный аппарат, вследствие чего клетки, вступающие в митоз, оказываются неспособными восстанавливать возникшие повреждения и наблюдается их апоптоз. Особенно сильно страдают от радиационного облучения наиболее активно обновляющиеся ткани (эпидермис кожи, эпителий крипт кишечника, гемопоэтические клетки), в которых быстро развивается клеточное истощение. Следствием облучения кожи является повреждение эпидермиса, повреждение и гибель капиллярной сети, включая лимфатическую [128–131].

Традиционные способы лечения длительно незаживающих ран, как правило, сводятся к сочетанию системной фармакотерапии и местного воздействия на раневую поверхность, но данные методы не эффективны в 76% случаев [132]. Наиболее радикальным и действенным оказывается хирургическое вмешательство. Но в случае активной трофической язвы высок риск развития гнойно-септических осложнений [133], а при обширных лучевых язвах, практически, невозможно добиться приживаемости пересаженных аутодермальных лоскутов [134].

Показано, что фибробласты, полученные из зоны формирования трофической язвы, имеют сниженный пролиферативный потенциал и уровень экспрессии белков межклеточного матрикса [135, 136]. Фибробласты, выделенные из диабетических язв, характеризуются измененной морфологией [137]. В этой связи возникла идея применения различных ростовых факторов для ускорения заживления длительно незаживающих ран. В опытах на культурах фибробластов человека, изолированных из облученной кожи, показано, что добавление олигонуклеотида, ингибирующего действие TGF $\beta$ , значительно увеличивает ангиогенный потенциал клеток посредством стимуляции выделения культивируемыми фибробластами VEGF. Данный эффект, по всей видимости, развивается в результате блокировки трансфор-

мации облученных фибробластов в миофибробласты [138]. В исследованиях *in vivo* на мышах показано стимулирующее действие TGF $\beta$  и FGF на заживление ран. У животных, получивших стимуляцию ростовыми факторами TGF $\beta$ , FGF или TGF $\beta$ +FGF, наблюдается более быстрое заживление ран, увеличение содержания компонентов межклеточного матрикса и более упорядоченное расположение коллагеновых фибрилл [139]. Показано, что применение химерного фактора FGF1:FGF2 способствует усилению пролиферации клеток и улучшению эпителизации ран, что послужило основанием для использования его в качестве радиопротектора [140].

Культивированные фибробласты кожи были использованы в эксперименте на мышах по лечению лучевых поражений кожи. При системном введении донорские фибробласты определялись как в ранах кожи, так и в костном мозге [141]. Было показано, что при сравнении системного и местного применения дермальных фибробластов облученным крысам, на заживление ран влияло только системное введение клеток [142].

В настоящее время в медицинской практике более распространено использование живых кожных эквивалентов. Применение Apligraf в сочетании с компрессионной терапией для лечения язв трофического генеза (при варикозной болезни) приводит к ускорению заживления ран в 3 раза [143]. В другом исследовании оценивалось действие культивированных аллогенных фибробластов в сочетании с матриксом из коллагена или гиалуроновой кислоты для лечения длительно незаживающих ран у 13 пациентов. Эпителизация ран наблюдалась в 92% случаев после повторного применения клеток [144]. Сравнение клинического эффекта при использовании клеточных технологий и традиционного лечения показало, что при стандартном лечении заживление длительно незаживающих варикозных ран наблюдалось в 66,7% случаев, тогда как при использовании клеточных технологий – в 99,1% случаев. В исследовании было включено 110 пациентов, из которых 76 – имели трофические язвы вследствие варикозной болезни, 34 – трофические язвы вследствие сочетания варикозной и посттромбофлебической болезни. Авторы пришли к выводу, что одной из главных причин, препятствующих эпителизации ран, является непроходимость глубоких вен и артерий, что свидетельствует о том, что истинное заживление ран невозможно без устранения главной причины заболевания – нарушения кровотока [58].

Клинические исследования, проведенные при использовании живого двухслойного эквивалента кожи (bilayered skin construct (BSC)), созданного на основе кератиноцитов и фибробластов из кожи новорожденных, для лечения варикозных и диабетических язв показали хороший клинический результат. Не было отмечено ни аллергических реакций, ни реакций отторжения трансплантата [65].

Большой интерес у исследователей вызывает использование в трансплантате аутоклеток, поскольку они сохраняются в трансплантате значительно дольше, соответственно, дольше проявляется и клинический эффект. Свидетельством тому является клиническое исследование, проведенное на 19 пациентах с длительно незаживающими ранами (у 14 пациентов язвы не заживали от 6 мес. до 50 лет) [60]. После проведения биопсии кожи фибробласты и кератиноциты были выделены и культивированы по стандартной методике. Затем были приготовлены аутокожные эквиваленты, где в качестве матрикса использовали бесклеточную аллогенную дер-

му. После однократного применения полученных трансплантатов наблюдалось полное заживление ран у 11 пациентов, площадь поверхности ран которых не превышала 10 см<sup>2</sup>. У оставшихся 8 пациентов с площадью ран 60–150 см<sup>2</sup> в 5 случаях полная эпителизация ран произошла за время наблюдения свыше 8 нед., в 3 случаях наблюдалось постепенное увеличение грануляции и эпителизации раны.

При лечении глубоких (3 степень по Вагнеру) диабетических язв, ассоциированных с воспалительным процессом, применение стандартных методов лечения и ростовых факторов вызывало эпителизацию ран в 30% случаев [145]; применение Dermagraft (281 пациент) и Apligraf (208 пациентов) улучшало эпителизацию до 50,8 и 56% соответственно [146, 147]. При использовании аутологичных фибробластов и кератиноцитов заживление наблюдалось в 65% случаев (79 пациентов) [148]. В исследовании с использованием аутологичного кожного эквивалента, состоящего из культивированных фибробластов и матрикса на основе Hyalograft 3D удалось добиться стабильной и полной эпителизации ран у 70% пациентов после двух (5 пациентов) или трех (5 пациентов) трансплантаций [149].

#### **Фибробласты в терапии других дерматологических заболеваний**

Применение дермальных фибробластов возможно также для лечения витилиго, буллезного эпидермолиза.

В медицинской практике зафиксированы случаи успешного лечения язвенной гангренозной пиодермии: при использовании Apligraf в сочетании с кортикостероидами и циклоспорином наблюдали быструю эпителизацию ран с минимальным образованием рубцов [150]. Положительный клинический эффект и отсутствие рецидивов отмечено также при лечении ран, вызванных гидроксимочевинной, при буллезной склеродермии, язвенном саркоидозе [151–153].

В терапии различных генодерматозов положительный клинический эффект наблюдали как от введения аллогенных фибробластов в составе коммерческих кожных эквивалентов, так и от применения генетически модифицированных фибробластов. Буллезный эпидермолиз — представляет собой группу заболеваний, характеризующихся повышенной хрупкостью и непрочностью кожи, развивающейся вследствие мутаций в генах, кодирующих белки внеклеточного матрикса. Показано, что при использовании Apligraf для лечения острых и хронических ран при буллезном эпидермолизе различных типов (простой буллезный эпидермолиз Доулинга — Меара и Вебера — Кокайна, суставной буллезный эпидермолиз Нерлитца, рецессивный дистрофический буллезный эпидермолиз) наблюдается более быстрое заживление ран, уменьшение болевых симптомов, зуда и кровотечения, улучшение функционирования кистей рук после хирургического разделения слипшихся пальцев [154, 155].

Обнадеживающие результаты были получены при использовании генетически модифицированных фибробластов для лечения рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза. Данная патология развивается в результате мутации гена COL7A1, вследствие чего образуется дефектный коллаген VII типа. При введении иммунодефицитным мышам генетически модифицированных фибробластов человека определялось наличие нормального коллагена человека VII типа в зоне базальной мембраны [156, 157]. Также отмечено увеличение содержания нормального коллагена и улучшение регенерации

кожи после введения генетически модифицированных фибробластов человеку [158].

#### **Нерешенные вопросы и перспективы развития**

Клеточные технологии находят все большее применение в медицинской практике. Использование культивированных *in vitro* клеток, например, при длительно незаживающих ранах показало результаты, недостижимые посредством других, известных на данный момент, способов, а в случае тяжелых лучевых поражений это, практически, единственный клинически эффективный метод.

Развитие клеточных технологий за последние несколько лет и внедрение их в широкую медицинскую практику требует создания четкой законодательной базы. Особого внимания требуют вопросы биологической безопасности используемых материалов и культивированных клеток. Среди важных аспектов в данной области заслуживает внимания, в первую очередь, переход при культивировании клеток на бессывороточные среды, уточнение перечня инфекционных агентов, которые необходимо определять в клеточных культурах, введение обязательного цитогенетического исследования культивированных клеток на планируемом для клинического применения пассаже.

Важным шагом при создании трансплантатов является переход на аутогенные клетки. В связи с тем, что наработка достаточного количества фибробластов требует значительных затрат времени (3–6 нед.), возникает необходимость создания банков аутоклеток. Такие банки представляют собой своеобразную систему «биологического страхования» населения и являются наиболее актуальными для людей, занятых на производстве, связанном с вредными воздействиями на организм (механическими, термическими, радиационными, токсическими и т.д.), а также для пациентов перед химиотерапией. Кроме этого, банкированные в молодом возрасте клетки могут быть использованы в дальнейшем для эффективной коррекции возрастных изменений кожи.

Интересным направлением в области клеточных технологий по восстановлению кожного покрова является создание эквивалентов дермы, содержащих не только фибробласты и кератиноциты, но и другие клеточные элементы (например, эндотелиоциты), а также цитокины, факторы роста и вещества для антимикробной защиты.

Разработка методов комплексного лечения различных патологий с использованием сочетания коммерческих кожных эквивалентов и культивированных аутофибробластов позволит значительно уменьшить потребность в ауто трансплантации кожи.

Интересным и перспективным направлением в области клеточных технологий является также развитие методов лечения генетических заболеваний. Применение фибробластов в капсулах позволит уменьшить симптомы аутоиммунных заболеваний кожи, коррекция генетических дефектов культивированных клеток — позволит эффективно лечить генодерматозы. Данная патология требует разработки принципиально нового способа введения генетического материала в клетку, поскольку имеющиеся в настоящее время технологии с использованием ретровирусов характеризуются низкой эффективностью и связаны с повышенным риском онкотрансформации, метод же, основанный на применении плазмид — быстрой элиминацией их из клеток.

#### **Заключение**

Таким образом, применение дермальных фибробластов является перспективным методом для лечения

дефектов кожи. Данные клетки легко культивируются в лабораторных условиях, не теряя своих функций. Благодаря ключевой роли в поддержании гомеостаза ткани, фибробласты, как никакие другие клетки, способны

эффективно создавать условия для пролиферации и миграции иных типов клеток. Полученные на сегодняшний день данные достоверно демонстрируют высокую клиническую эффективность и безопасность применения фибробластов для коррекции косметических дефектов и лечения длительно незаживающих ран и ожогов.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Гайер Г. Электронная гистохимия. М.: Мир; 1974.
2. Глуценко Е.В., Заец Т.Л., Серов Г.Г. Динамика синтеза фибронектина фибробластами человека в культуре. Бюл. эксперимент. биол. и мед. 1996; 5: 575–7.
3. Гаврилюк Б.К. Культура клеток и реконструкция тканей (на примере кожи). Пуццо: АН СССР, НЦБИ, ИБФ; 1988: 123.
4. Златопольский А.Д., Чубкина А.Н., Зайденов М.А. Влияние ферментов фибронектина на пролиферативную активность фибробластов. Биохимия 1989; 54(1): 74–9.
5. Marinkovich M.P., Keene D.R., Rimborg C.S., Burgeson R.E. Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. Dev. Dyn. 1993; 197(4): 255–67.
6. Sorrell J.M., Baber M.A., Caplan A.I. 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(1): 134–45.
7. Konig A., Lauharanta J., Bruckner-Tuderman L. Keratinocytes and fibroblasts from a patient with mutilating dystrophic epidermolysis bullosa synthesize drastically reduced amounts of collagen VII: lack of effect of transforming growth factor-beta. J. Invest. Dermatol. 1992; 99(6): 808–12.
8. Kane C.J., Hebda P.A., Mansbridge J.N., Hanawalt P.C. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing. J. Cell Physiol. 1991; 148(1): 157–73.
9. Igarashi A., Okochi H., Bradham D.M., Grotendorst G.R. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. Mol. Biol. Cell. 1993; 4(6): 637–45.
10. Boxman L., Lowik C., Arden L., Ponc M. Modulation of IL-6 production and IL-1 activity by keratinocyte-fibroblast interaction. J. Invest. Dermatol. 1993; 101(3): 316–24.
11. Marchese C., Felici A., Visco V. et al. Fibroblast growth factor 10 induces proliferation and differentiation of human primary cultured keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 2001; 116(4): 623–8.
12. Werner S., Beer H.D., Mauch C. et al. The Mad1 transcription factor is a novel target of activin and TGF-beta action in keratinocytes: possible role of Mad1 in wound repair and psoriasis. Oncogene 2001; 20(51): 7494–504.
13. Blomme E.A., Sugimoto Y., Lin Y.C. et al. Parathyroid hormone-related protein is a positive regulator of keratinocyte growth factor expression by normal dermal fibroblasts. Mol. Cell Endocrinol. 1999; 152(1–2): 189–97.
14. Maas-Szabowski N., Shimotoyodome A., Fusenig N.E. Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. J. Cell Sci. 1999; 112(12): 1843–53.
15. El Ghalbzouri A., Lamme E., Ponc M. Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. Cell Tissue Res. 2002; 310(2): 189–99.
16. Trompezinski S., Berthier-Vergnes O., Denis A. et al. Comparative expression of vascular endothelial growth factor family members, VEGF-B, -C and -D, by normal human keratinocytes and fibroblasts. Exp. Dermatol. 2004; 13(2): 98–105.
17. Bauer S.M., Bauer R.J., Liu Z.J. et al. Vascular endothelial growth factor-C promotes vasculogenesis, angiogenesis, and collagen constriction in three-dimensional collagen gels. J. Vasc. Surg. 2005; 41(4): 699–707.
18. Chu A.J., Prasad J.K. Up-regulation by human recombinant transforming growth factor beta-1 of collagen production in cultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling. J. Am. Coll. Surg. 1999; 188(3): 271–80.
19. Palmon A., Roos H., Edel J. et al. Inverse dose- and time-dependent effect of basic fibroblast growth factor on the gene expression of collagen type I and matrix metalloproteinase-1 by periodontal ligament cells in culture. J. Periodontol. 2000; 71(6): 974–80.
20. Ali-Bahar M., Bauer B., Tredget E.E., Ghahary A. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. Wound Repair Regen. 2004; 12(2): 175–82.
21. Palaiologou A.A., Yukna R.A., Moses R., Lallier T.E. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. J. Periodontol. 2001; 72(6): 798–807.
22. Hirt-Burri N., Scaletta C., Gerber S. et al. Wound-healing gene family expression differences between fetal and foreskin cells used for bioengineered skin substitutes. Artif. Organs 2008; 32(7): 509–18.
23. Chang H.Y., Chi J.T., Dudoit S. et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99(20): 12877–82.
24. Rinn J.L., Bondre C., Gladstone H.B. et al. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. PLoS Genet. 2006; 2(7): 119.
25. Okazaki M., Yoshimura K., Suzuki Y., Harii K. Effects of subepithelial fibroblasts on epithelial differentiation in human skin and oral mucosa: heterotypically recombined organotypic culture model. Plast. Reconstr. Surg. 2003; 112(3): 784–92.
26. Yamaguchi Y., Hearing V.J., Itami S. et al. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: aiming for site-specific tissue regeneration. J. Dermatol. Sci. 2005; 40(1): 1–9.
27. Werner S., Krieg T., Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. J. Invest. Dermatol. 2007; 127(5): 998–1008.
28. Вялов С.Л., Пшенистов К.П., Куиндоз П. и др. Современные представления о регуляции процесса заживления ран: обзор лит. Анналы пласт., реконстр., эстет. хирургии. 1999; 1: 49–56.
29. Grose R., Werner S. Wound healing studies in transgenic and knockout mice. A review. Methods Mol. Med. 2003; 78: 191–216.
30. Desmouliere A., Geinoz A., Gabbiani F., Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. J. Cell Biol. 1993; 122(1): 103–11.
31. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. J. Pathol. 2003; 200(4): 500–3.
32. Messadi D.V., Doung H.S., Zhang Q. et al. Activation of NF-kappaB signal pathways in keloid fibroblasts. Arch. Dermatol. Res. 2004; 296(3): 125–33.
33. Bitzer M., von Gersdorff G., Liang D. et al. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. Genes Dev. 2000; 14(2): 187–97.
34. Nagarajan R.P., Chen F., Li W. et al. Repression of transforming-growth-factor-beta-mediated transcription by nuclear factor kappa B. Biochem. J. 2000; 348(3): 591–6.
35. Verrecchia F., Pessah M., Atfi A., Mauviel A. Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta/Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. J. Biol. Chem. 2000; 275(39): 30226–31.
36. Guidry C., Grinnell F. Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. J. Cell Sci. 1985; 79: 67–81.
37. Desmouliere A., Chaponnier C., Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. Wound Repair Regen. 2005; 13(1): 7–12.
38. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 1961; 25: 585–621.
39. Theobald V.A., Lauer J.D., Kaplan F.A. et al. «Neutral allografts» — lack of allogeneic stimulation by cultured human cells expressing MHC class I and class II antigens. Transplant. 1993; 55(1): 128–33.
40. Байрейтер К., Франц П.И., Родман Х.П. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации. Онтогенез 1995; 26: 22–37.
41. Суздальцева Ю.Г., Бурунова В.В., Вахрушев И.В. и др. Сравнительный анализ цитотипов, способности к дифференцировке и иммунологические свойства клеток мезенхимального ряда в культурах постнатальных органов и тканей человека. Всероссийская и международная научная конференция «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении», 30–31 мая 2007; Москва.
42. Смирнова И.О. Функциональная морфология старения кожи. Усп. геронтол. 2004; 13: 44–51.
43. Schneider E.L., Mitsui Y. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1976; 73(10): 3584–8.
44. Терехов С.М. Клональный анализ при изучении наследственной патологии. Дис. ... канд. биол. наук, Москва, 1984.
45. Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J. et al. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95(18): 10614–9.
46. Freedland M., Karmiol S., Rodriguez J. et al. Fibroblast responses to cytokines are maintained during aging. Ann. Plast. Surg. 1995; 35(3): 290–6.
47. Chajchir A., Fabrizio D., Chajchir G., Celi E. Growth factors in plastic surgery. Aesthetic Plast. Surg. 2005; 29(4): 295–9.
48. El Ghalbzouri A., Commandeur S., Rietveld M.H. et al. Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products. Biomat. 2009; 30(1): 71–8.
49. Atiyeh B.S., Hayek S.N., Gunn S.W. New technologies for burn wound closure and healing — review of the literature. Burns. 2005; 31(8): 944–56.
50. George J., Onodera J., Miyata T. Biodegradable honeycomb collagen scaffold for dermal tissue engineering. J. Biomed. Mater. Res. 2008; 87(4): 1103–11.
51. Yoon E.S., Han S.K., Kim W.K. Advantages of the presence of living dermal fibroblasts within restylane for soft tissue augmentation. Ann. Plast. Surg. 2003; 51(6): 587–92.

52. Mansbridge J. Skin tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2008; 19(8): 955–68.
53. Nolte S.V., Xu W, Rennekampff H.O., Rodemann H.P. Diversity of fibroblasts — a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 2008; 187(3): 165–76.
54. Waymack P., Duff R.G., Sabolinski M. The effect of a tissue engineered bilayered living skin analog, over meshed split-thickness autografts on the healing of excised burn wounds. *The Apligraf Burn Study Group. Burns.* 2000; 26(7): 609–19.
55. Kirsner R.S. The use of Apligraf in acute wounds. *J. Dermatol.* 1998; 25(12): 805–11.
56. Trent J.F., Kirsner R.S. Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent. *Int. J. Clin. Pract.* 1998; 52(6): 408–13.
57. Смирнов С.В., Киселев И.В., Васильев А.В., Терских В.В. Современные методы клеточной терапии при лечении ожогов. *Хирургия* 2003; 12: 58–62.
58. Лапин А.Ю., Топузов Э.Г., Пинаев Г.П., Рубцов М.А. Заместительная клеточная терапия в лечении трофических язв, вызванных хронической венозной недостаточностью. Стационарозамещающие технологии. *Амбулаторная хирургия* 2007; 1: 24–6.
59. Lee D.Y., Lee J.H., Yang J.M. et al. A new dermal equivalent: the use of dermal fibroblast culture alone without exogenous materials. *J. Dermatol. Sci.* 2006; 43(2): 95–104.
60. Gibbs S., van den Hoogenband H.M., Kirtschig G. et al. Autologous full-thickness skin substitute for healing chronic wounds. *Br. J. Dermatol.* 2006; 155(2): 267–74.
61. Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомбе Ю. и др. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов. *Бюл. эксперимент. биол. мед.* 2000; 130(8): 203–6.
62. 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): 263–8.
63. Nie X., Zhang J.Y., Cai K.J. et al. Cosmetic improvement in various acute skin defects treated with tissue-engineered skin. *Artif. Organs.* 2007; 31(9): 703–10.
64. Phillips T.J., Gilchrist B.A. Cultured epidermal allografts as biological wound dressings. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1991; 365: 77–94.
65. Badiavas E.V., Paquette D, Carson P, Falanga V. Human chronic wounds treated with bioengineered skin: histologic evidence of host-graft interactions. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2002; 46(4): 524–30.
66. Yonezawa M., Tanizaki H., Inoguchi N. et al. Clinical study with allogeneic cultured dermal substitutes for chronic leg ulcers. *Int. J. Dermatol.* 2007; 46(1): 36–42.
67. Griffiths M., Ojeh N., Livingstone R. et al. Survival of Apligraf in acute human wounds. *Tissue Eng.* 2004; 10(7–8): 1180–95.
68. Lamme E.N., van Leeuwen R.T., Mekkes J.R., Middelkoop E. Allogeneic fibroblasts in dermal substitutes induce inflammation and scar formation. *Wound Repair Regen.* 2002; 10(3): 152–60.
69. Morimoto N., Saso Y., Tomihata K. et al. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. *J. Surg. Res.* 2005; 125(1): 56–67.
70. Mansbridge J. Commercial considerations in tissue engineering. *J. Anat.* 2006; 209(4): 527–32.
71. Бочков Н.П. Клеточная терапия в свете доказательной медицины. *Клин. мед.* 2006; 10: 4–9.
72. Navsaria H.A., Myers S.R., Leigh I.M., McKay I.A. Culturing skin in vitro for wound therapy. *Trends Biotechnol.* 1995; 13(3): 91–100.
73. Бурунова В.В., Суздальцева Ю.Г., Чеглаков И.Б. и др. Подходы к паспортизации и обеспечению безопасности при работе с клеточными материалами. Тезисы доклада на конф.: Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества. 15–16 марта 2007; Москва.
74. Hollstein M.C., Peri L, Mandard A.M. et al. Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas: frequent p53 base substitutions and absence of ras mutations. *Cancer Res.* 1991; 51(15): 4102–6.
75. Watson D., Keller G.S, Lacombe V. Autologous Fibroblasts for Treatment of Facial Rhytids and Dermal Depressions. *Arch. Facial Plast. Surg.* 1999; 1: 165–17.
76. Boss W.K. Jr, Usal H, Fodor P.B., Chernoff G. Autologous cultured fibroblasts: a protein repair system. *Ann. Plast. Surg.* 2000; 44(5): 536–42.
77. Бочков Н.П. Цитогенетический контроль безопасности стволовых клеток. Тезисы доклада на конф.: Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества. 15–16 марта 2007; Москва.
78. Бочков Н.П., Никитина В.А. Цитогенетика стволовых клеток человека. *Молекулярная медицина* 2008; 3: 40–7.
79. Ковалева О.А., Вагина И.Н., Морозова Л.М. и др. Генетическая нестабильность и предрасположенность к развитию опухолей у лабораторных линий мышей. *Доповіді НАН України.* 2007; 2: 158–62.
80. Бочков Н.П. Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках. М.: Генетика, 1972; 5: 133–41.
81. Рубцов Н.Б. Хромосомы человека в четырёх измерениях. М.: Природа. 2007; 6: 18–25.
82. Benedetto A.V. The environment and the skin aging. *Clin. Dermatol.* 1998; 16(1): 129–39.
83. Ditto J., Pektstein E.F. Molecular mechanisms of cutaneous ageing: connective tissue alterations in the dermis. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1998; 3(1): 41–4.
84. Fisher G.J., Varani J, Voorhees J.J. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch. Dermatol.* 2008; 144(5): 666–72.
85. Хертель Б. Молекулярные и клеточные механизмы естественного старения и фотостарения (стрессорные факторы, защитные механизмы). *Косметика и медицина* 2000; 4: 5–17.
86. Cooperman L.S. Injectable collagen: a six year clinical investigation. *Aesthetic Plast. Surg.* 1985; 9: 145–51.
87. Apesos J., Muntzing M.G. Autologen. *Clin. Plast. Surg.* 2000; 27(4): 507–13.
88. Schmeller W., Meier-Vollrath I. Autologous fat grafting. *Hautarzt.* 2003; 54(12): 1185–9.
89. Erol O.O. Facial autologous soft-tissue contouring by adjunction of tissue cocktail injection (micrograft and minigraft mixture of dermis, fascia, and fat). *Plast. Reconstr. Surg.* 2001; 106(6): 1375–87.
90. Mentz H., Ruiz A., Patronella C., Newall G. Cultured Autologous Fibroblasts for Wrinkle Reduction. In: Annual Meeting, American Society of Plastic Surgeons, Philadelphia, 2004 Oct. 12; Pennsylvania, USA.
91. Золотовицкая Н.Н. Экспериментально-клиническая оценка эффективности применения культуры фибробластов. В книге: Колсанов А.В., Иванова В.Д., Волова Л.Т., Дорожкина Е.Б. Клиническая анатомия и экспериментальная хирургия: Ежегодник Российской ассоциации клинических анатомов в составе ВНОАГЭ. Приложение к журналу «Морфологические ведомости». 2006; 6: 68–73.
92. Remmler D., Thomas J.R., Mazoujian G. et al. Use of injectable cultured human fibroblasts for percutaneous tissue implantation. An experimental study. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1989; 115(7): 837–44.
93. Boss W.K., Marko O. Isolagen. In: Klein A.W. Ed. *Tissue Augmentation in Clinical Practice.* New York: Marcel Dekker Inc.; 1998; 335–47.
94. 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): 251–5.
95. Азолов В.В., Жегалов В.А., Перетягин С.П. Состояние и перспективы развития комбустиологии в России. *Комбустиология* 1999; 1: 15–20.
96. Burd A., Yuen C. A global study of hospitalized paediatric burn patients. *Burns.* 2005; 31(4): 432–8.
97. Ермолов А.С., Смирнов С.В., Хватов В.Б. и др. Применение биологически активных раневых покрытий, стимулирующих регенерацию эпителия ожоговых ран IIIA степени. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2008; 3: 166–72.
98. Heinbokel H.E., Simon M.R., Jodan M.H. Cadaver allograftskin supply and demand. *Proc. Ann. Burn. Assoc.* 1985; 17: 87–95.
99. Gobel P., Schubert W. Our experiences in covering of juvenile burn injuries with amnion. *Beitr. Orthop. Traumatol.* 1990; 37(9): 495–8.
100. Mills D.C., Lord W.D. Propofol for repeated burns dressings in child: A case report. *Burns.* 1992; 18: 58–9.
101. Dorling A., Lechler R.I. Prospects for xenografting. *Current Opinion in Immunol.* 1994; 6(5): 765–9.
102. Germann G., Raff T. Homograft transplantation in severely burned patients. Principles, indications and possibilities. *Chirurg.* 1995; 66(4): 260–70.
103. Шавга Н.Г., Логинов Л.П., Рейлян Н.С. и др. Клинический эффект тканевой терапии при лечении послеожоговых ран. Тезисы доклада на Третьей Всесоюзной конференции «Современные средства первой помощи и методы лечения ожоговой болезни»; 1986; Москва: 274–276.
104. Hunyadi J., Farkas B., Bertynyi C. et al. Keratinocyte grafting: covering of skin defects by separated autologous keratinocytes in a fibrin net. *J. Invest. Dermatol.* 1987; 89(1): 119–20.
105. Туманов В.П., Пальцин А.А., Саркисов Д.С. Пластика ожоговых ран с помощью культивированного эпителия. *Acta chir. Plast.* 1989; 31: 14–20.
106. Compton C.C., Gill J.M., Bradford D.A. et al. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Lab. Invest.* 1989; 60(5): 600–12.
107. Teepe R.G., Kreis R.W., Koebrugge E.J. et al. The use of cultured autologous epidermis in the treatment of extensive burn wounds. *J. Trauma.* 1990; 30(3): 269–75.
108. Terskikh V.V., Vasiliev A.V. Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. *Int. Rev. Cytol.* 1999; 188: 41–72.
109. De Luca M., Albanese E., Bondanza S. et al. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. *Burns.* 1989; 15(5): 303–9.
110. Duinslaeger L., Verbeken G., Reper P. et al. Lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft-covered burn wounds with efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures. *Plast. Reconstr. Surg.* 1996; 98(1): 110–7.

111. Oshima H, Inoue H, Matsuzaki K, Tanabe M, Kumagai N. Permanent restoration of human skin treated with cultured epithelium grafting — wound healing by stem cell based tissue engineering. *Hum. Cell.* 2002; 15(3): 118–28.
112. Саркисов Д.С., Глуценко Е.В., Туманов В.П. и др. Опыт применения культуры фибробластов при лечении ожоженных. *Воен.-мед. журнал.* 1991; 10: 62–3.
113. Фёдоров В.Д., Саркисов Д.С., Алексеев А.А. и др. Применение культивированных фибробластов при ожогах кожи. *Врач* 1993; 11: 26–8.
114. Глуценко Е.В. Восстановление кожных покровов у ожоженных с помощью культивированных фибробластов человека. Автореф. дис. ... канд. мед. Москва 1994.
115. Алексеев А.А., Яшин А.Ю. Комбинированная аутодермопластика с трансплантацией культивированных аллофибробластов при обширных глубоких ожогах: клинические результаты и перспективы. Доклад на Международном симпозиуме «Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи». 1996; Тула.
116. Матчин Е.Н., Потапов В.И., Алексеев А.А. Клинико-морфологическая оценка результатов комбинированной аутодермопластики с трансплантацией культивированных аллофибробластов у ожоженных. *Комбустиология* 2000; 2: 35–42.
117. Саркисов Д.С., Алексеев А.А., Туманов В.П. и др. Пятнадцатилетний опыт использования культивированных фибробластов для лечения тяжелоожоженных. Тезисы на II Международном конгрессе «Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи». 1998; Саратов.
118. De Lapp, Dieckman D.K. Effect of basic fibroblast growth factors type I (IGF-I) and insulin-like growth factors type I (IGF-I) and type II (IGF-II) on adult human keratinocyte growth and fibronectin secretion. *J. Invest. Dermatol.* 1990; 94(6): 817–22.
119. Воздвиженский С.И., Будкевич Л.И., Шурова Л.В. Организация этапной медицинской помощи детям раннего возраста с термической травмой. Тезисы на VII Всероссийской научно-практической конференции по проблеме термических поражений. 1999; Челябинск.
120. Матчин Е.Н., Потапов В.П., Огольцова В.А., Кузько Ю.Н. Клинико-гистологические результаты кожной аутопластики традиционными методами и с использованием клеточной культуры фибробластов. Тезисы на II Международном конгрессе «Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи» 1998; Саратов.
121. Алейник Д.Я., Амиев В.А., Чарыкова И.Н., Кувакина Н.А. Использование современных биотехнологий для лечения поверхностных ожогов у детей младшего возраста. Тезисы на II Международном конгрессе «Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи» 1998; Саратов.
122. Кузнецов Н.М., Мазка О.Н., Шанина Л.Н. и др. Применение культивированных клеток для закрытия дефектов кожи. Тезисы на II Международном конгрессе «Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи» 1998; Саратов.
123. Asselineau D., Bernard B.A., Bailly C. et al. Human epidermis reconstructed by culture: is it «normal»? *J. Invest. Dermatol.* 1986; 86(2): 181–6.
124. Nanchahal J., Otto W.R., Dover R, Dhital S.K. Cultured composite skin grafts: biological skin equivalents permitting massive expansion. *Lancet* 1989; 2(8656): 191–3.
125. Dvorankova V., Holikova Z., Vacik J. et al. Reconstruction of epidermis by grafting of keratinocytes cultured on polymer support — clinical study. *Int. J. Dermatol.* 2003; 42(3): 219–23.
126. Туманов В. Современные клеточные технологии в хирургии. *Эстетическая медицина: научно-практический журнал* 2003; 2(1): 65–75.
127. Вин Ф. Трофические язвы нижних конечностей. *Флебология* 1998; 7: 10–2.
128. Archambeau J.O., Ines A, Fajardo L.F. Correlation of the dermal microvasculature morphology with the epidermal and the endothelial population changes produced by single X ray fractions of 1649, 2231 and 2619 rad in swine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1985; 11(9): 1639–46.
129. Hopewell J.W. Radiation Effects on vascular tissue. In: Potten C. S., editor. *Cytotoxic Insult to Tissue: Effects on Cell Lineages.* Edinburgh: Churchill Livingstone; 1983: 228–57.
130. Lewis T., Zotterman Y. Vascular reactions of the skin to injury: Part VIII. The resistance of the human skin to constant currents, in relation to injury and vascular response. *J. Physiol.* 1927; 62(3): 280–8.
131. Барабанова А.В., Гуськова А.К. Значение распределения поглощенных доз в объеме в исходе лучевого поражения. *Мед. радиология.* 1982; 11: 53–7.
132. Кириенко А.И., Григорян Р.А., Богачев В.Ю., Богданец Л.И. Фармакотерапия хронической венозной недостаточности нижних конечностей. *Consilium medicum* 2000; 2(4): 16–22.
133. Яблоков Е.Г., Кириенко А.И., Богачев В.Ю. Хроническая венозная недостаточность. М.: Берг. 1999.
134. Бардычев М.С., Цыб А.Ф. Местные лучевые повреждения. М.: Медицина, 1985.
135. Stanley A.C., Park H.Y., Phillips T.J. et al. Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors. *J. Vasc. Surg.* 1997; 26(6): 994–9.
136. Kim B.C., Kim H.T., Park S.H. et al. Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF-beta-signaling and decreased TGF-beta Type II receptor expression. *J. Cell Physiol.* 2003; 195(3): 331–6.
137. Loots M.A., Lamme E.N., Mekkes J.R. et al. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. *Arch. Dermatol. Res.* 1999; 291(2-3): 93–9.
138. Riedel K., Koellensperger E., Ryssel H. et al. Abrogation of TGF-beta by antisense oligonucleotides modulates expression of VEGF and increases angiogenic potential in isolated fibroblasts from radiated skin. *Int. J. Mol. Med.* 2008; 22(4): 473–80.
139. Tattini C., Manchio J., Zaporozhan V. et al. Role of TGF-beta and FGF in the treatment of radiation-impaired wounds using a novel drug delivery system. *Plast. Reconstr. Surg.* 2008; 122(4): 1036–45.
140. Motomura K., Hagiwara A., Komi-Kuramochi A. et al. An FGF1:FGF2 chimeric growth factor exhibits universal FGF receptor specificity, enhanced stability and augmented activity useful for epithelial proliferation and radioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008; 1780: 1432–40.
141. Shi C., Cheng T., Su Y. et al. Transplantation of dermal multipotent cells promotes survival and wound healing in rats with combined radiation and wound injury. *Radiat Res.* 2004; 162(1): 56–63.
142. Chunmeng S., Tianmin C., Yongping S. et al. Effects of dermal multipotent cell transplantation on skin wound healing. *J. Surg. Res.* 2004; 121(1): 13–9.
143. Falanga V. Apligraf treatment of venous ulcers and other chronic wounds. *J. Dermatol.* 1998; 25(12): 812–7.
144. Yonezawa M., Tanizaki H., Inoguchi N. et al. Clinical study with allogeneic cultured dermal substitutes for chronic leg ulcers. *Int. J. Dermatol.* 2007; 46(1): 36–42.
145. Wieman T.J. Introduction to care of chronic wounds. *Am. J. Surg.* 1998; 176(2A): 1S–2S.
146. Marston W.A., Hanft J., Norwood P., Pollak R. Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study Group. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care.* 2003; 26(6): 1701–5.
147. Veves A., Falanga V., Armstrong D.G., Sabolinski M.L. Apligraf Diabetic Foot Ulcer Study. Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care.* 2001; 24(2): 290–5.
148. Caravaggi C., De Giglio R., Pritelli C. et al. HYAFF 11-based autologous dermal and epidermal grafts in the treatment of noninfected diabetic plantar and dorsal foot ulcers: a prospective, multicenter, controlled, randomized clinical trial. *Diabetes Care.* 2003; 26(10): 2853–9.
149. Cavallini M. Autologous fibroblasts to treat deep and complicated leg ulcers in diabetic patients. *Wound Repair Regen.* 2007; 15(1): 35–8.
150. de Imus G., Golomb C., Wilkel C. et al. Accelerated healing of pyoderma gangrenosum treated with bioengineered skin and concomitant immunosuppression. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2001; 45(1): 76.
151. Flores F., Eaglstein W.A., Kirsner R.S. Hydroxyurea-induced leg ulcers treated with Apligraf. *Ann. Intern. Med.* 2000; 132(5): 417–8.
152. Martin L.K., Kirsner R.S. Ulcers caused by bullous morphea treated with tissue-engineered skin. *Int. J. Dermatol.* 2003; 42(5): 402–4.
153. Streit M., Bohlen L.M., Braathen L.R. Ulcerative sarcoidosis successfully treated with apligraf. *Dermatology* 2001; 202(4): 367–70.
154. Eisenberg M., Llewelyn D. Surgical management of hands in children with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: use of allogeneic composite cultured skin grafts. *Br. J. Plast. Surg.* 1998; 51(8): 608–13.
155. Fivenson D.P., Scherschun L, Cohen L.V. Apligraf in the treatment of severe mitten deformity associated with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003; 112(2): 584–8.
156. Woodley D.T., Krueger G.G., Jorgensen C.M. et al. Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. *J. Invest. Dermatol.* 2003; 121(5): 1021–8.
157. Wong T., Gammon L, Liu L. et al. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* 2008; 128(9): 2179–89.
158. Ortiz-Urda S., Lin Q, Green C.L. et al. Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue. *J. Clin. Invest.* 2003; 111(2): 251–5.

Поступила 17.09.2009