

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ЦИТОЛОГИИ И ГИСТОЛОГИИ

Едоменко Никита Витальевич

Магистерская диссертация

Регенеративный потенциал клеток кожи

Научный руководитель:

д.б.н. проф. Подгорная О.И.

Научный консультант:

н.с. Александер-Синклер Э.И.

Санкт-Петербург

2022

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ	7
ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	8
1.1 Морфофункциональная характеристика кожи человека.	8
1.2 Физиологическая и репаративная регенерация кожи. Стволовые ниши.	19
1.3 Фенотипическая характеристика фибробластов (ФБ) и кератиноцитов (КЦ)	26
1.4 Кожные раны.....	29
1.5 Методы лечения кожных ран.	31
1.6 Раневые покрытия (РП) в лечении кожных ран.	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
2.1 Получение первичных культур ФБ и КЦ кожи человека	39
2.2 Стандартные условия культивирования.....	40
2.3 Оценка морфологического состояния культивируемых клеток	40
2.4 Оценка пролиферативной активности по индексу пролиферации	40
2.5 Анализ эффективности колониеобразования	41
2.6 Анализ репликативного старения	41
2.7 Иммуноцитохимический анализ	42
2.8 Цитогенетический анализ полученных линий ФБ	43
2.9 Моделирование мезенхимально-эпителиального перехода КЦ (эпителиальная дифференцировка).....	44
2.10 Криоконсервация и реконсервация ФБ и КЦ	45
2.11 Приготовление дермального и эпидермального эквивалентов кожи на основе коллагенового геля	45
2.12 Колориметрические методы оценки пролиферативной активности клеток в составе эквивалентов кожи на основе коллагенового геля.....	46
2.12.1 МТТ-тест	46
2.12.2 Резазурин-тест.....	47
2.13 Анализ биосовместимости коммерческих раневых покрытий с дермальным эквивалентом на основе коллагенового геля	48
2.14 Гистологическое исследование тонкой кожи человека.....	49
2.15 Клинические исследования применения дермального и эпидермального эквивалентов кожи при терапии кожных ран	50

2.16 Обработка полученных данных	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	52
3.1 Гистологическое исследование тонкой кожи человека	52
3.2 Получение клеточных культур ФБ и КЦ кожи человека	53
3.3 Оценка пролиферативной активности ФБ и КЦ на основании данных по способности к колониобразованию и индексу пролиферации	55
3.4 Репликативное клеточное старение ФБ и КЦ.....	56
3.5 Цитогенетический анализ полученных линий ФБ кожи человека	57
3.6 Маркерный профиль выделенных культур ФБ и КЦ.....	64
3.7 Моделирование мезенхимально-эпителиального перехода КЦ <i>in vitro</i>	68
3.8 Исследование жизнеспособности клеточной составляющей эквивалентов кожи на основе коллагенового геля.....	69
3.9 Анализ биосовместимости коммерческих раневых покрытий с ТБП «Эквивалент дермальный ЭД».....	73
3.10 Клинические исследования применения дермального и эпидермального эквивалентов кожи при терапии кожных ран	75
Выводы	79
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	80
БЛАГОДАРНОСТИ	92

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСК – жировая стволовая клетка

АЦ – адипоцит

БМКП – биомедицинский клеточный продукт

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВФ – волосяной фолликул

ДМСО – диметилсульфоксид

ДСК – дермальная стволовая клетка

К – кератин

КГ – коллагеновый гель

КЛ – клетка Лангерганса

КМ – клетка Меркеля

КЦ – кератиноцит

МЛ – масштабная линейка

МФ – миофибробласт

МЦ – меланоцит

РП – раневое покрытие

СК – стволовая клетка

СПХ – структурная перестройка хромосомы

ТБП – тканеинженерное биологическое покрытие

ФБ – фибробласт

ЭД – эквивалент дермальный

ЭК – эквивалент кожи

ЭПЕ – эпидермальная пролиферативная единица

ЭпСК – эпидермальная стволовая клетка

ЭЭП – эквивалент эпидермальный

FBS – fetal bovine serum (эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота)

PBS – phosphate buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

KDF12 – Keratinocyte-SFM и Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12

ВВЕДЕНИЕ

Кожа – самый большой и тяжелый орган в организме человека. Она представляет собой непрерывный комплексный покров тела, образованный тремя различными по происхождению, строению и функциям слоями: эпидермисом, дермой и гиподермой, находящимися в морфофункциональном единстве (Афанасьев и др., 2018; Кузнецов и Мушкамбаров, 2007; Быков, 1997; Мяделец, 2016; Боровик и др., 2010; Mescher, 2018). Кожа является сложной многофункциональной структурой, функции которой связаны с поддержанием внутреннего баланса и защитой от факторов внешней среды. Находясь на границе между системой внутренних органов и внешней средой, она подвергается постоянной нагрузке и нуждается в обновлении и восстановлении.

В коже были идентифицированы многочисленные популяции стволовых клеток (СК), которые играют жизненно важную роль в ее развитии. В настоящее время в коже человека выделяют несколько ниш СК: эпителиальная (эпидермальная), дермальная и жировая (Волкова и др., 2014; Shevchenko et al., 2010; Shpichka et al., 2019). В гомеостатических условиях каждая популяция СК действует однонаправленно – поддерживая соответствующую территорию. После травмы, когда системная и локальная среды резко меняются, популяции СК демонстрируют высокую пластичность (Adam et al., 2015; Ge et al., 2017). Даже если их собственная ниша не нарушена, близлежащие СК реагируют на вызванные раной стимулы, выходя из своей ниши и участвуя в реэпителизации поврежденной ткани (Ito et al., 2005; Levy et al., 2005; Lu et al., 2012; Nowak et al., 2008).

Однако в процессе заживления кожной раны могут возникнуть осложнения, в следствии которых на месте острой раны может возникнуть хроническая рана или чрезмерное рубцевание; кроме того, сложности вызывают обширные ожоговые повреждения кожи. На данный момент самыми распространенными и экономически затратными в лечении являются термические и трофические кожные раны (Fife & Carter, 2012; Sen et al., 2009).

Лечение кожной раны в основном включает её быстрое закрытие для восстановления барьерной функции кожи и предотвращения инфекции, а также подавление боли и функциональное восстановление. В настоящее время выделяют оперативный, консервативный и комбинированный методы лечения кожных ран, а современные методики варьируют от традиционных до альтернативных. Однако, независимо от вида кожной раны основным подходом в её лечении является использование перевязочных материалов и раневых покрытий (РП), которые защитят рану от пересыхания и инфекции, обеспечат обезболивание и ускорят заживление (Atiyeh et al., 2005; Shi et al., 2020; Weller et al., 2020). РП являются относительно новыми биомедицинскими продуктами, и в настоящее время не существует общепринятой классификации раневых покрытий. Множество современных РП можно

разделить на 3 большие группы: влагоудерживающие РП (представляют собой пленки, гидрогели, гидроколлоиды, пены, альгинаты), антимикробные РП (содержат серебро, мед, йод) и тканеинженерные биологические покрытия (ТБП). ТБП – это заменители, или эквиваленты кожи (ЭК), компенсирующие функциональные и физиологические нарушения, присутствующие в поврежденных тканях (Broussard & Powers, 2013). Тканеинженерные биологические покрытия представляют собой биомедицинский клеточный продукт (БМКП). При их создании, как правило, используют фибробласты кожи (ФБ) и/или кератиноциты (КЦ), заселенные на различные носители (Shevchenko et al., 2010; Shpichka et al., 2019). КЦ, являясь основным клеточным компонентом эпидермиса, отвечают за его стратифицированную структуру и образуют многочисленные узкие межклеточные соединения. ФБ, являясь основным клеточным типом дермы, производят компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) и выделяют различные факторы роста, цитокины и матричные металлопротеиназы, которые обеспечивают образование ВКМ, а также пролиферацию и дифференциацию КЦ (Wang et al., 2007). Трансплантация ФБ и КЦ в составе ТБП может способствовать сокращению сроков лечения обширных и хронических ран за счет более раннего восстановления кожного покрова, что позволит снизить длительность системной антибактериальной терапии и необходимость назначения аутодермопластики. Это позволит повысить выживаемость пациентов в тяжёлых случаях и улучшить качество жизни (Boateng et al., 2008; Nicholas & Yeung, 2017; Oryan et al., 2017). Одним из перспективных ТБП является разработанный в Институте цитологии РАН БМКП «Эквивалент дермальный ЭД», состоящий из коллагенового геля (КГ) с заключёнными в него ФБ. Использование КЦ при разработках ТБП ограничено сложностями выращивания в условиях *in vitro* многослойного пласта.

Следует отметить, что применение ТБП в клинической практике сопряжено с применением различных перевязочных материалов и РП в качестве вторичного покрытия. Выбор вторичных РП является актуальной проблемой и должен основываться не только на особенностях раны, но и на биосовместимости с ТБП.

Рациональный подход заключается как в разработке различных ТБП (эквивалентов кожи), так и методик их применения в клинике. Несмотря на почти полувековую историю разработок эквивалентов кожи, к настоящему времени остается много вопросов, связанных как с требованиями к компонентам ЭК при их приготовлении, так и с технологией их применения. Отсутствие на сегодняшний день оптимальных протоколов приготовления различных эквивалентов кожи и их применения отдельно и совместно с другими раневыми покрытиями побудило нас на это исследование.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение и характеристика в культуре *in vitro* клеток кожи человека (кератиноцитов и фибробластов), изучение их свойств в составе тканеинженерных биологических покрытий (эквивалентов кожи) на основе коллагенового геля, предназначенных для терапии кожных ран.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Исследовать гистологическое строение биоптатов кожи век человека; провести ферментативное разделение биоптатов на эпидермис и дерму, выделить из них кератиноциты и фибробласты и перевести их в культуры *in vitro*. Провести анализ морфологии и ростовых характеристик полученных клеточных линий кожи человека, а также их идентификацию.
2. Оценить влияние сроков культивирования и криоконсервации на стабильность кариотипа клеток дермы человека (фибробластов).
3. Оценить способность клеток эпидермиса (кератиноцитов), предположительно претерпевших при культивировании эпителио-мезенхимальный переход, к обратному мезенхимально-эпителиальному переходу.
4. Создать на основе полученных клеток и коллагенового геля эквиваленты кожи (тканеинженерные биологические покрытия) и оценить потенциальную возможность их использования их в качестве биомедицинских клеточных продуктов для терапии кожных ран.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1 Морфофункциональная характеристика кожи человека.

Кожа (от лат. cutis) – это самый большой и тяжелый орган в организме человека, его площадь составляет от 1,5 до 2,5 м², что соответствует примерно 10% от всей площади тела, а масса – до 20% от общей массы тела (Афанасьев и др., 2018). Этот сложный орган представляет собой непрерывный комплексный покров тела и теснейшим образом связан со всеми внутренними органами. В ходе эволюции кожа развивалась и усложнялась, а ее значение для организма, возможно, до конца еще не выяснено и не оценено. Долгое время считалось, что кожа выполняет пассивную роль защитной оболочки тела. Однако за последние полвека появилось много достоверных данных для признания за кожей функций, не ограничивающихся сильно развитой барьерно-защитной функцией. В настоящее время известно, что кожа участвует в регуляции тепла, обмене веществ, дыхании и очищении организма от шлаков и избыточного накопления воды, выработке ферментов и медиаторов (Мяделец, 2016).

Специфические функции кожи делятся на несколько широких категорий (Афанасьев и др., 2018; Кузнецов и Мушкамбаров, 2007; Быков, 1997; Мяделец, 2016; Боровик и др., 2010; Mescher, 2018):

- ***Барьерно-защитная***

Кожа – это главный барьер между телом и окружающей средой, защищающий внутренние органы и ткани от микробных патогенов, а также физических и химических агентов. Неповрежденная кожа не проницаема для микроорганизмов и токсических соединений, за исключением жирорастворимых. Целостность кожи требует активных защитных механизмов, обеспечиваемых дендритными клетками, членами иммунной системы, и резидентными КЦ, чтобы различать безвредные комменсальные организмы и вредные патогены.

- ***Терморегуляторная***

Постоянная температура тела обычно поддерживается благодаря изолирующим компонентам кожи (например, жировому слою и волосам на голове) и ее механизмам ускорения потери тепла (выделение пота и плотная поверхностная микрососудистая сеть). Через кожные покровы происходит испарение около 80 % тепла.

- ***Экскреторная***

С потом из организма человека выводятся токсины: мочевина, мочевая кислота, желчные кислоты, продукты азотного обмена (остаточный азот/аммиак). В норме данная функция выражена слабо.

- ***Дыхательная***

Около 2% газообмена организма осуществляется через кожу. Кожное дыхание усиливается при физических нагрузках, при острых воспалительных процессах в коже, а также при повышении температуры тела или окружающей среды.

- ***Синтетическо-метаболическая***

В клетках кожи из провитамина бета-каротин синтезируется витамин А, участвующий в регуляции обмена белков и жиров, а из эргостерина - витамин D, участвующий в регуляции кальций-фосфорного обмена и метаболизме многих биологически активных макромолекул. В коже также синтезируются особые белки кератины. Подкожный слой сохраняет значительное количество энергии в виде жира. Сальные железы выделяют являющееся смазкой для верхних слоев кожи кожное сало, в состав которого входят свободные высшие и низшие, а также связанные жирные кислоты в виде эфиров холестерина и других стероидов, свободный холестерин, небольшие количества углеводов, следы азотистых и фосфорных соединений.

- ***Сенсорная***

Кожа представляет собой обширное рецепторное поле, где осуществляются различные виды рецепции: температурная (тепло, холод), болевая, тактильная (осязание, давление, вибрация). Барорецепторы, терморецепторы, болевые рецепторы позволяют коже постоянно контролировать окружающую среду, а различные кожные механорецепторы помогают регулировать взаимодействие организма с физическими объектами. На коже также имеются активные точки, проецирующие функциональное состояние внутренних органов, эндокринной, иммунной и нервной систем.

- ***Эндокринная***

Кожа является самым большим эндокринным органом. ККЦ вырабатывают эпидермальный тимоцитактивирующий фактор, подобный гормону тимуса тимопоэтину, осуществляющий в коже антигеннезависимую дифференцировку Т-лимфоцитов, происходит частичный синтез половых гормонов. ККЦ вырабатывают медиаторы воспаления и иммунитета (IL-2 и 3). Клетки Меркеля продуцируют ряд нейропептидов: эндорфины, мет-энкефалин, вазоинтестинальный полипептид, вещество P, пептиды, относящиеся к кальцитониновому гену и другие. Гиподерма содержит крупные скопления жировой ткани, которая продуцирует гормоны эстрогены и лептин.

- ***Иммунная***

Кожу можно рассматривать, как орган иммунной системы. Эта функция обеспечивается сложной иммунореактивной системой всех слоев кожи, препятствующей проникновению и распространению чужеродных антигенов в организме. В коже содержится большое

количество иммунокомпетентных клеток, могут протекать многочисленные иммунные реакции.

Многообразие и сложность функций кожи напрямую связаны с особенностями ее строения. В норме кожа образована тремя различными по происхождению, строению и функциям слоями: эпидермисом, дермой и гиподермой (подкожно – жировой клетчаткой), находящимися в морфофункциональном единстве (Афанасьев и др., 2018; Быков, 1997; Кузнецов и Мушкамбаров, 2007). (Рис.1).

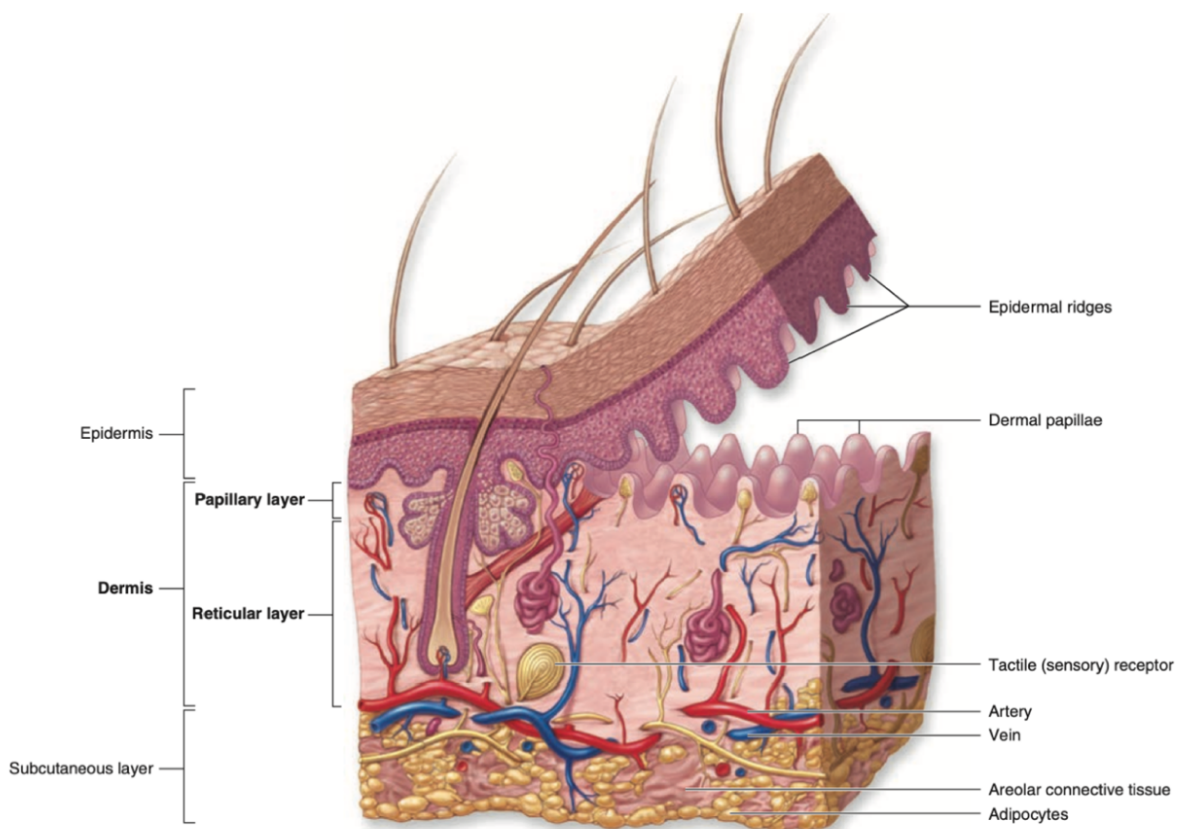


Рисунок 1. Строение кожи человека (по Mescher, 2018).

Наружный слой кожи, эпидермис, является производным эктодермы и представлен многослойным плоским ороговевающим эпителием, который осуществляет защиту нижележащих слоев кожи и организма в целом от воздействия факторов окружающей среды. Эпидермис не содержит сосудов и получает питание посредством обмена тканевой жидкости, поступающей из расположенного глубже внутреннего слоя кожи, дермы, содержащего сосуды.

Дерма является производным мезодермы и представляет собой плотную соединительнотканную часть кожи. Дерма и эпидермис разделены базальной мембраной, принимающей участие в регуляции обмена веществ между этими слоями кожи и выполняющей функцию опоры для эпидермиса. На неровном стыке между дермой и эпидермисом выступы, называемые дермальными сосочками, пересекаются с

инвагинированными эпидермальными гребнями, чтобы усилить адгезию двух слоев (Афанасьев и др., 2018; Кузнецов и Мушкамбаров, 2007).

Под дермой расположена подкожно-жировая клетчатка, или гиподерма, как и дерма, являющаяся производным мезодермы. Она состоит из рыхлой соединительной ткани, перемежающейся с жиром, и пронизана развитой сетью кровеносных и лимфатических сосудов, а также нервов. Пучки волокон коллагена распространяются из дермы в гиподерму, обеспечивая механическую прочность кожи, в то время как подкожная жировая ткань создает ее относительную подвижность. Подкожно – жировая клетчатка является механической опорой для кожи, участвует в ее трофике и обеспечивает терморегуляцию (Зорина и др., 2011; Быков, 1997). Следует отметить, что ряд авторов не считают гиподерму частью кожного покрова (Афанасьев и др., 2018; Гелашвили и др., 2013; Кузнецов и Мушкамбаров, 2007; Mescher, 2018).

Эпидермис структурно состоит из нескольких рядов клеток, организованных в 5 клеточных слоев (Быков, 1997; Кузнецов и Мушкамбаров, 2007; Афанасьев и др., 2018):

- базальный слой (stratum basale);
- остистый (шиповатый) слой (stratum spinosum);
- зернистый слой (stratum granulosum);
- блестящий слой (stratum lucidum);
- роговой слой (stratum corneum).

Слои эпидермиса различаются степенью дифференцировки основной клеточной популяции эпидермиса – КЦ, входящих в состав всех его слоев (Ter Horst et al., 2018). Дифференцировка КЦ в эпидермисе сопровождается экспрессией маркеров стратификации. Базальные КЦ экспрессируют кератины (К) К5, К14 и К15. Когда КЦ дифференцируются, они перемещаются вверх в супрабазальные слои: остистый слой, зернистый слой и, наконец, роговой слой. Дифференцирующиеся КЦ экспрессируют специфические маркеры в каждом слое эпидермиса. (Рис. 2)

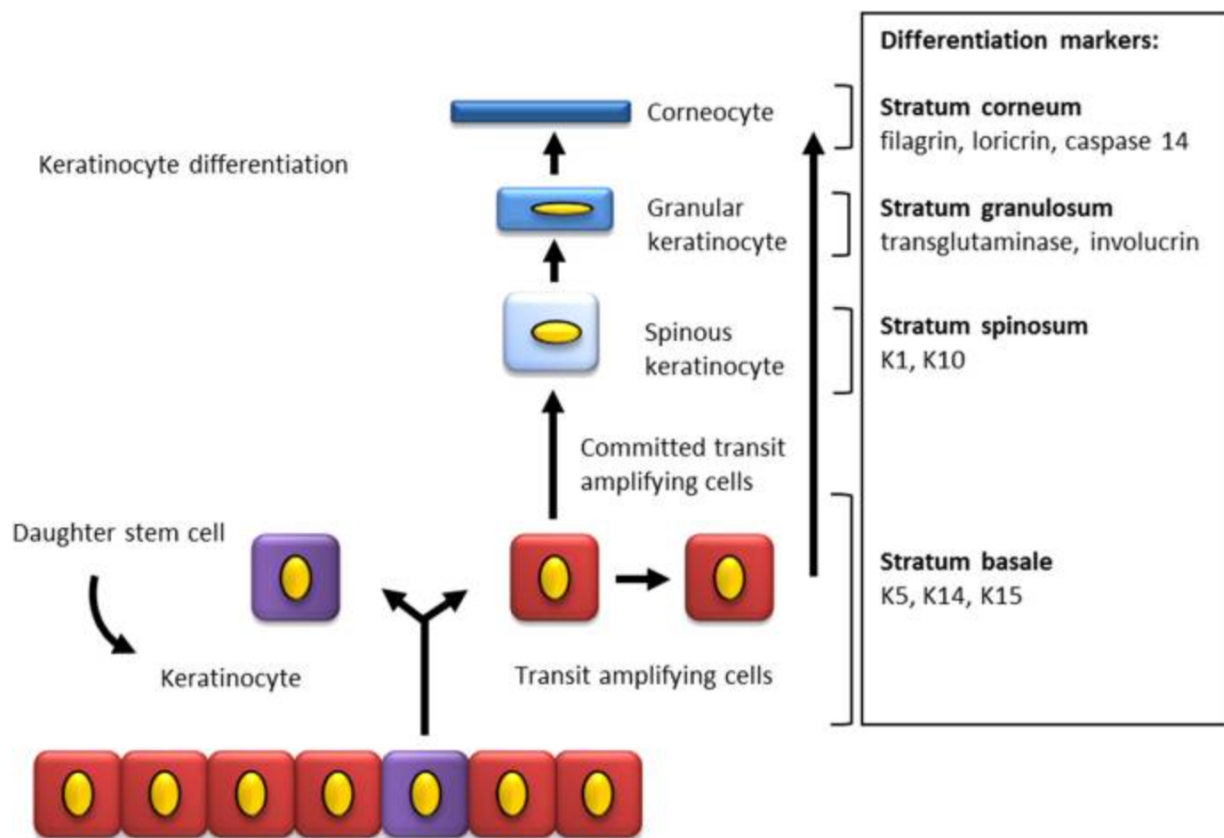


Рисунок 2. Терминальная дифференцировка КЦ (по Ter Horst et al., 2018).

Базальный слой самый глубокий слой в структуре эпидермиса, состоящий из одного ряда базофильных КЦ от низко-столбчатой до кубовидной формы с крупными ядрами, которые соединяются десмосомами друг с другом и с клетками вышележащих слоев.

Клетки базального слоя являются родоначальником всего эпидермиса. Именно здесь находятся базальные (стволовые) КЦ, которые пролиферируют и поддерживают популяцию КЦ. В базальном слое кроме стволовых базальных клеток, функция которых заключается в постоянном поддержании популяции КЦ, присутствует часть базальных КЦ (прогениторные или коммитированные клетки), уже способных к дальнейшей дифференцировке, в результате которой и формируются весь эпидермис. Здесь также находятся пигментные клетки кожи (меланоциты), антигенпрезентирующие дендритные клетки (клетки Лангерганса) и осязательные клетки (клетки Меркеля) (Mescher, 2018).

Меланоциты (МЦ) составляют от 10 до 25% клеток базального слоя эпидермиса. Данный тип клеток имеет нейрональное происхождение и многоотростчатую форму, их предшественниками являются меланобласты – клетки, мигрирующие в состав эпителия из нервного гребня и встраивающиеся среди клеток базального слоя. Главной их особенностью является наличие в их теле и отростках специфических мембранных органелл — меланосом, содержащих пигмент меланин, который они синтезируют. В клетках содержится ферменты ДОФА-оксидаза и тирозиназа, с помощью которых из тирозина образуется меланин.

Полностью зрелые меланосомы отделяются от кончиков дендритных отростков МЦ и передают меланин базальным КЦ.

Клетки Лангерганса (КЛ) составляют от 5 до 10% от всех клеток эпидермиса и происходят из костного мозга. КЛ присутствуют в эпидермисе в качестве иммунологических индикаторов, участвующих в иммунных ответах, в частности, в представлении антигенов Т-клеткам. Клетки многоотростчатой формы, в эпидермисе отростки доходят до зернистого слоя, а ядро – многолопастное (Кузнецов и Мушкамбаров 2007).

В эпидермисе КЛ выполняют две функции (Кузнецов и Мушкамбаров 2007; Gartner, 2019):

1. КЛ экспрессируют на своих плазмалеммах различные иммунные белки – CD1a; МНС I и МНС II; и рецепторы C3b, а также рецепторы IgG. Белок CD1a в сочетании с лангерином в мембране гранул Бирбека защищает организм от возбудителя лепры, *Mycobacterium leprae*.
2. КЛ функционируют как антигенпрезентирующие клетки в иммунных реакциях на контактные антигены (контактная аллергия) и некоторые кожные трансплантаты. Как только КЛ фагоцитируют антигены, эти чужеродные белки поглощаются гранулой Бирбека, где они перерабатываются в эпитопы, и КЛ покидают эпидермис, перемещаются в лимфатический узел, где они представляют эпитоп Т-клеткам и тем самым инициируют реакцию гиперчувствительности замедленного типа.

Клетки Меркеля (КМ) составляют наименьшую часть клеток эпидермиса и располагаются рядом с участками хорошо васкуляризованной, богато иннервируемой соединительной ткани. Считается, что они происходят из клеток нервного гребня, но, поскольку они обладают десмосомами и кератиновыми волокнами, предполагается также эпидермальное происхождение. КМ крупнее КЦ, они имеют хорошо выраженные органеллы белкового синтеза, а также содержат секреторные гранулы. В этих гранулах обнаруживаются эндорфины, мет-энкефалин, вазоинтестинальный полипептид, вещество Р, пептиды, относящиеся к кальцитониновому семейству и другие нейропептиды (Gartner, 2019). Каждая КМ находится в тесном контакте с расположенным на базолатеральной стороне немиелинизированным афферентным нервным окончанием (нервной пластинкой), которое обладает высокой тактильной чувствительностью к легким прикосновениям (Morrison et al., 2009; Hashimoto, 1972).

Шиповатый (остистый) слой, представляющий собой значительную область эпидермиса, образуют несколько рядов клеток (от 3-4 в тонкой коже и до 10 в толстой), которые имеют многогранную форму вблизи базального слоя, но становятся более плоскими по мере того, как клетки мигрируют от базальной мембраны (Кузнецов и Мушкамбаров, 2007;

Афанасьев и др., 2018). Непосредственно над базальным слоем некоторые клетки все еще могут делиться, и эту комбинированную зону, состоящую из клеток шиповатого и базального слоя, называют мальпигиевым, или ростковым слоем. В цитоплазме КЦ шиповатого слоя усиливается синтез кератинов, из которого образуется тонофиламент, которые соединяются в пучки – тонофибриллы, а также формируются новые структуры – ламеллярные тельца (гранулы Одланда) (Brody, 1960; Афанасьев и др., 2018). Это окруженные мембраной видоизмененные лизосомы, содержащие: липиды (например, глюкозилцерамиды), гидролитические ферменты (например, протеазы, кислые фосфатазы, глюкозидазы, липазы) и белки (например, корнеодесмозин) (Ishida-Yamamoto, et al. 2004). Совокупность ламеллярных телец приводит к образованию непроницаемой липидсодержащей мембраны, которая служит водным барьером и необходима для правильной функции кожного барьера, а их компоненты необходимы для шелушения кожи в самом верхнем эпидермальном слое, роговом слое. Помимо КЦ в шиповатом слое присутствуют КЛ.

Зернистый слой состоит из 3-5 рядов уплощенных клеток, которые проходят процесс терминальной дифференцировки. В КЦ данного слоя уменьшается количество органелл и увеличивается количество гранул кератогиалина (обуславливая зернистость цитоплазмы), толстых пучков кератиновых тонофибрилл, гранул Одланда. В клетках зернистого слоя начинается синтез белков кератолинина и филаггринов, входящих в состав кератогиалина и играющих важную роль в кератинизации (Афанасьев и др., 2018).

Блестящий слой локализуется только в толстой коже; состоит из 3-4 рядов ещё более уплощенных клеток, под действием лизосомальных ферментов они лишаются ядер и почти всех органелл. На этой стадии в КЦ блестящего слоя содержатся белки филаггрин, распределенный по всей клетке, агрегирующий кератиновые тонофиламенты, которые образуют продольно расположенные пучки, и кератолинин укрепляющий оболочку клеток, предохраняя её от разрушения ферментами лизосом, активирующимися при кератинизации.

Роговой слой – самый поверхностный слой, состоящий из рядов безъядерных мертвых «клеток» (корнеоцитов), заполненных кератогиалин-кератиновым комплексом. Клетки рогового слоя организованы в виде пластинчатых липидных слоев и погружены в обогащенный неполярными липидами межклеточный матрикс (Goldsmith et al., 2012). Это позволяет им более тесно прилегать друг к другу и укладываться в виде столбиков: по 3-4 ряда в тонкой коже или 15-20 — в толстой (Кузнецов и Мушкамбаров, 2007; Mescher, 2018). Корнеоциты окружены внутренними белковыми и наружными липидными конвертами, благодаря такой ороговевшей клеточной оболочке, роговой слой служит основным барьером для контактирующих с кожей химических веществ, микробов, а также выдерживать механическую нагрузку (Goldsmith et al., 2012). Самый внешний слой корнеоцитов постоянно

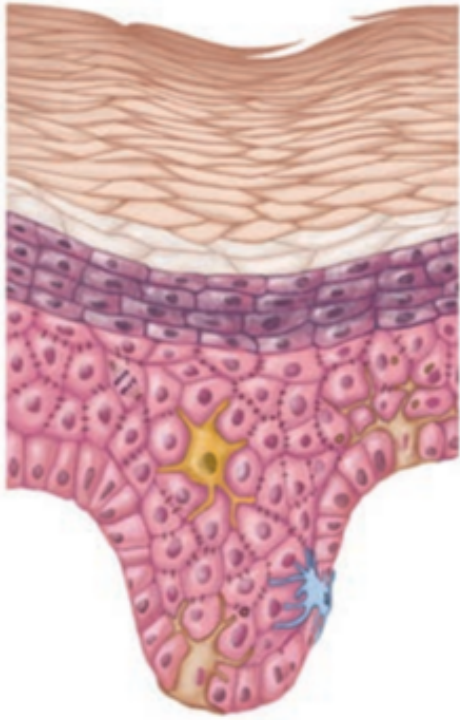
сбрасывается шелушением. Скорость шелушения совпадает со скоростью обновления клеток в базальном и шиповидном слоях, таким образом поддерживая толщину эпидермиса, а также структурную стабильность ороговевшей клеточной оболочки.

Толщина эпидермиса колеблется в диапазоне от 0,03 до 1,5 мм и более. По толщине эпидермиса различают два типа кожи: «тонкую» и «толстую». Самый тонкий эпидермис расположен на веках и половых органах, самый толстый – на подошвах. Особенностью строения «тонкой» кожи является отсутствие в структуре эпидермиса блестящего слоя и меньшая толщина рогового слоя, состоящего из 3-4 рядов ороговевших чешуек в то время, как в «толстой» коже он представлен несколькими десятками рядов клеток. Помимо толщины важным отличием «тонкой» кожи от «толстой» является наличие в первой волос и связанных с ними сальных желез (Ter Horst et al., 2018).

Таким образом, эпидермис у человека, являющийся наружным слоем кожи, состоит из многослойного плоского ороговевающего эпителия. Эпидермис не однороден по толщине на различных участках тела, его слои различаются по структуре и функциям. Помимо КЦ в состав различных слоев эпидермиса также входят МЦ, КЛ и контактирующие с их отростками Т-лимфоциты, тактильные КМ (Быков, 1997; Афанасьев и др., 2018). (Табл. 1).

Таблица 1. Строение и функции эпидермиса (Изображение взято у Mescher, 2018).

Эпидермис	Структура и функции слоев эпидермиса
	<p><i>Роговой</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Самый верхний слой • Состоит из 4-5 (в тонкой коже) до 15-20 и более (в толстой коже) рядов безъядерных мертвых КЦ (корнеоцитов) в виде роговых черепицеобразных чешуек, соединенных редуцированными десмосомами • Обеспечивает защитную функцию.
	<p><i>Блестящий</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Слой локализован только в толстой коже • Состоит из 3-4 рядов не имеющих выраженных границ КЦ с разрушенными ядрами и органеллами. • Обеспечивает защитную функцию.
	<p><i>Зернистый</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Состоит из 1-5 рядов уплощенных ромбовидных КЦ с отчетливыми кератогиалиновыми гранулами, что придает клеткам отчетливую зернистость



- Высокая синтетическая активность.
- Обеспечивает процесс кератинизации, за счет синтеза кератолина и филагрина, входящие в состав кератогиалина.

Шиповатый (остистый)

- Состоит из 3-4 (в тонкой коже) до 10 (в толстой коже) рядов слабобазофильных КЦ многогранной (в верхних рядах более уплощенной) формы с многочисленными цитоплазматическими выростами (шипами).
- Присутствуют КЛ.
- Обеспечивает образование ламеллярных телец (гранулы Одланда), их содержимое высвобождается в межклеточное пространство и формируют гидрофобный водонепроницаемый слой кожи (обеспечивая водоустойчивость).

Базальный

- Самый нижний слой.
- Состоит из 1-го ряда базофильных КЦ от низкостолбчатой до кубовидной формы с крупными ядрами.
- Высокая митотическая активность клеток.
- Присутствуют КМ, КЛ и МЦ.
- Обеспечивает физиологическую регенерацию эпидермиса.

Собственно кожа (corium), или дерма, поддерживающая эпидермис и связывающая его с гиподермой, структурно организована в 2 слоя (Быков, 1997; Mescher, 2018):

- сосочковый слой (stratum papillare);
- сетчатый слой (stratum reticulare).

Прилегающий к эпидермису более тонкий верхний слой дермы, **сосочковый**, или **папиллярный**, имеет множество выступов (дермальных сосочков), залегающих между эпидермальными гребнями шиповатых клеток. Этот слой состоит из рыхлой неоформленной соединительной ткани, состоящей из тонких волокон коллагена, ретикулярных волокон (из коллагена III типа) и эластина, между которыми расположены сосуды, нервные окончания. Клеточные элементы, представлены преобладающими по количеству ФБ и фиброцитами, помимо них присутствуют макрофаги, тучные клетки, МЦ, лимфоциты. Тут же, встречаются

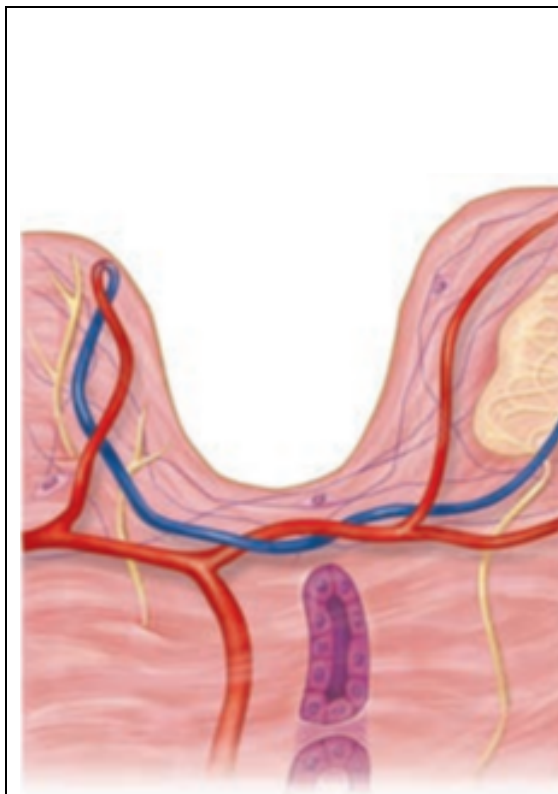
гладкомышечные клетки, формирующие небольшие пучки, связанные с корнем волоса – мышца, поднимающая волосы; кроме того, имеются мышечные пучки, не связанные с ними.

Основную часть дермы составляет **сетчатый**, или **ретикулярный**, слой дермы, расположенный под папиллярным. Этот слой состоит из плотноупакованных коллагеновых волокон и сети эластических волокон. Здесь расположены волосяные фолликулы, сальные, потовые и апокринные железы, рецепторы, лимфатические и кровеносные сосуды. Клеточные элементы в сетчатом слое дермы не столь многочисленны, как в сосочковом. Основными клетками в дерме являются ФБ, которые представляют собой гетерогенную популяцию клеток, специфичность которых определяется главным образом их расположением относительно слоев дермы (Mescher, 2018). Существенные различия между ними наблюдаются в экспрессии специфических компонентов ВКМ и маркеров, как в организме, так и в культуре (Philippeos et al., 2018; Driskell & Watt, 2015) ФБ ретикулярного слоя дермы продуцируют фибриллярные компоненты ВКМ, характерные для плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани. Это коллагены (I, III, VI, XIV), обладающие большим диаметром и образующие сложную трехмерную сеть, эластин и аморфное вещество ВКМ: гликозаминогликаны, протеоглики (версикан, декорин, тенасцин-Х), ферменты (матричные металлопротеиназы) (Sorrell & Caplan, 2004, 2009; Varani et al., 2000) ФБ папиллярного слоя дермы продуцируют большее количество коллагена III типа, нежели клетки ретикулярного слоя (Sorrell & Caplan, 2009). Также показана более высокая скорость удвоения популяций ФБ папиллярного слоя по сравнению с ФБ ретикулярного слоя, при условии получения из одного и того же участка кожи (Mine et al., 2008), что может быть связано с преобладанием в папиллярном слое малодифференцированных предшественников (Quan et al., 2011). Стабильность различий функциональных особенностей ФБ папиллярного и ретикулярного слоев сохраняется и при культивировании их *in vitro* (Зорина и др., 2011).

Таким образом, дерма кожи человека, расположенная под эпидермисом, представляет собой сложный соединительно-тканый комплекс, состоящий из двух слоев. Слои дермы, разделенные между собой капиллярным сплетением (*rete subpapillare*), различаются по толщине, строению клеточному составу и функциям (Табл. 2).

Таблица 2. Строение и функции дермы (Изображение взято у Mescher, 2018).

Дерма	Структура и функции слоев дермы
	<p><i>Сосочковый (папиллярный)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Рыхлая волокнистая соединительная ткань • Состоит из тонких коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон.



- Клеточные элементы: ФБ и фиброциты (самые многочисленные), макрофаги, тучные клетки и МЦ (в некоторых участках кожи), гладкие мышечные клетки, лимфоциты (в основном Т-лимфоциты), В-лимфоциты и плазмоциты (единичны)
- Расположены пучки гладких миоцитов поднимающие волос и не связанные с волосом, выводные протоки желёз, корни волос.
- Выполняет трофическую функцию

Сетчатый (ретикулярный)

- Плотная неоформленная соединительная ткань
- Состоит из толстых пучков коллагеновых волокон, образующие трехмерную сеть, и сети эластических волокон
- Клеточные элементы: ФБ
- Расположены концевые отделы сальных и потовых желез, волосяные фолликулы и корни волос
- Обеспечивает прочность кожи

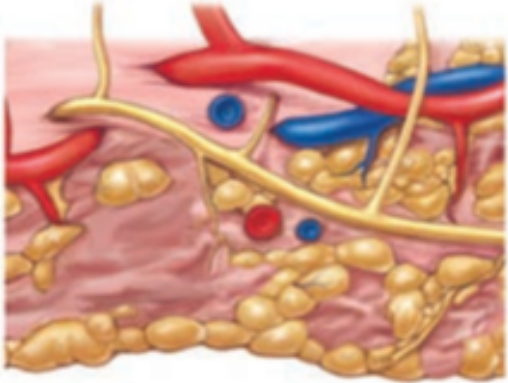
Гиподерма, или подкожно – жировая клетчатка (*tela subcutanea*), образована жировой тканью, формирующей жировые дольки, образованные гипертрофированными адипоцитами. Дольки разделены рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью с характерным для нее клеточным составом и обилием кровеносных сосудов (Быков, 1997; Афанасьев и др., 2018; Мяделец, 2016). Жировые дольки образованы скоплением адипоцитов (АЦ) – основных клеток гиподермы, которые имеют мезодермальное происхождение. АЦ представляют собой крупные (от 50 до 150 мкм) клетки сферической формы, содержащие в цитоплазме жировые капли.

Несмотря на наличие между гиподермой и дермой условной границы (т.н. переходной зоны), они функционально и структурно тесно объединены сетью сосудов, нервных окончаний и многочисленными придатками кожи. В гиподерме располагаются концевые отделы потовых желез и луковицы волосяных фолликулов.

Толщина гиподермы зависит от участка тела и может варьировать от нескольких миллиметров в области лба до 3 см в области передней брюшной стенки и 10 см на бедрах и ягодицах (Gawkrödger, 1997). Кроме того, она зависит от пола, возраста, питания и образа жизни (Khavkin & Ellis, 2011).

Таким образом, гиподерма, расположенная под дермой, является продолжением ее сетчатого слоя. Она состоит в основном из жировых клеток, соединительнотканной стромы и сосудов. Гиподерма подвижно соединяет кожу с подлежащими тканями и выполняет ряд важных функций. (Табл. 3).

Таблица 3. Строение и функции гиподермы (Изображение взято у *Mescher, 2018*).

Гиподерма	Структура и функции гиподермы
	<ul style="list-style-type: none"> • Специализированные слои отсутствуют • Обширная сеть кровеносных и лимфатических сосудов • Клеточные элементы: пре-АЦ и АЦ • Концевые отделы потовых желёз • Функции: соединяет дерму с подлежащими тканями, выполняет трофическую (депо жира), терморегуляционную, термоизоляционную, защитно-механическую функции и т.д.

Таким образом, кожа представляет собой сложную многофункциональную структуру, функции которой связаны с поддержанием внутреннего баланса и защитой от факторов внешней среды. Находясь на границе между системой внутренних органов и внешней средой, она подвергается постоянной нагрузке и нуждается в обновлении и восстановлении.

1.2 Физиологическая и репаративная регенерация кожи. Стволовые ниши.

В любых организмах в процессе их жизнедеятельности постоянно происходят процессы обновления и восстановления, объединяемые понятием физиологической регенерации. В основе регенерации лежат клеточные и внутриклеточные пластические процессы (Целуйко, 2019).

Физиологическая регенерация кожи происходит за счет наличия в её слоях стволовых клеточных ниш. В стационарных условиях каждая дискретная ниша сохраняет свой соответствующий тканевой «отсек» унипотентным образом (Schepeler et al., 2014).

Что касается эпидермиса кожи, существуют разные теории, объясняющие поддержание эпидермального гомеостаза. Классическая иерархическая модель предполагает, что медленно циркулирующие СК делятся в базальном слое и дают дочерние амплифицирующие клетки, которые увеличивают количество клеток для пополнения ткани. Они претерпевают конечное число клеточных делений, прежде чем становятся окончательно дифференцированными, когда они проходят вверх через надбазальные слои. Согласно этой модели, в эпидермисе СК и их окружение организованы в эпидермальную пролиферативную единицу (ЭПЕ), где медленно циркулирующие СК находятся в центре ЭПЕ, а более пролиферативные, дочерние амплифицирующие клетки, локализируются на периферии ЭПЕ (Potten, 1981). Стохастическая модель предполагает, что базальный эпидермис состоит из одного типа пролиферативных предшественников, чьи дочерние клетки случайным образом выбирают путь: для дифференцировки или остаются в качестве предшественников. Результаты недавних исследований подтверждают обе модели (Hsu et al., 2014); это может быть связано с изменчивостью эпидермиса в разных анатомических точках (Clayton et al., 2007).

На данный момент в коже выделяют, следующие стволовые клеточные ниши: эпителиальная (эпидермальная), дермальная и жировая ниши (Мяделец, 2016; Волкова, 2014; Díaz-García et.al, 2021) (Рис. 3).

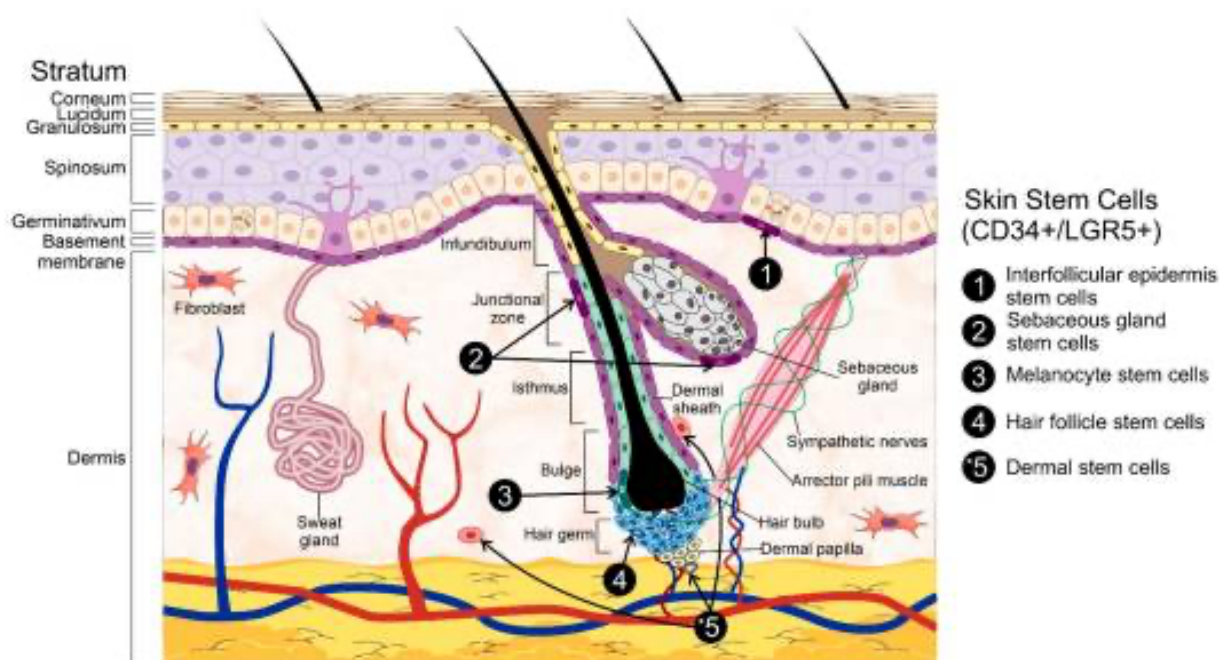


Рисунок 3. Популяции СК в коже человека (по Díaz-García et.al, 2021).

Эпидермальные стволовые клетки (ЭпСК) кожи во взрослой коже локализируются в трех местах: в базальном слое эпидермиса кожи, в выпячивании наружной оболочки (наружного эпителиального влагалища) волосяного фолликула (ВФ) и вблизи сальных желез.

Первая стволовая клеточная ниша эпидермиса, локализованная в его базальном слое, самообновляется в процессе ороговения, когда базальные клетки эпидермиса отслаиваются,

прекращая размножаться и вступают на восходящий путь дифференцировки, давая начало остальным слоям эпидермиса. СК базального слоя эпидермиса расположены неслучайным образом, а объединены в ЭПЕ, содержащие пролиферирующие и дифференцирующие клетки (Potten, 1974). Количество базальных клеток в ЭПЕ в среднем составляет 10 клеток, но только чуть больше половины из них способны к пролиферации. Оставшимися клетками ЭПЕ вероятно являются КЛ и постмитотические клетки.

Вторая стволовая клеточная ниша эпидермиса, локализованная в наружном эпителиальном влагалище ВФ, участвуют в процессе самообновления ВФ. Данный процесс назван циклом роста волос/волосяным циклом (Blanpain & Fuchs, 2014). У мышей в ВФ был выявлен весьма разнообразный пул СК, варьирующий от нижней части ВФ (Lgr5+ и CD34+/Krt15+) до области воронки (Gli1+ и Lgr6+) и перешейка (Lrig1+) (Rognoni & Watt, 2018). Волосяной цикл включает три последовательные фазы: анаген (длительный период митотической активности и роста), катаген (кратковременный период задержки роста и регрессии волосяной луковицы) и телоген (длительный период бездействия, во время которого волосы могут выпадать). В начале следующей фазы анагена ЭпСК, расположенные в выпячивании наружной оболочки ВФ возле мышцы, *agrestor pili*, продуцируют клетки-предшественники для матрицы новой волосяной луковицы. Дальнейшее деление клеток матрицы ведет к образованию нового волоса и внутреннего корневого влагалища. Растущий волос постепенно вытесняет старый, который выпадает (экзоген) (Пальцев, 2009; Мяделец, 2016). В отличие от унипотентных СК базального слоя эпидермиса, данная ниша способна дифференцироваться в несколько направлений – в ороговевающие КЦ и в клетки всех эпителиальных структур волосяного комплекса, что свидетельствует о их мультилинейном дифференцировочном потенциале (Ito et al., 2005; Волкова, 2014).

Третья стволовая клеточная ниша эпидермиса располагается вблизи или в основании сальной железы, эти клетки поддерживают клеточный состав концевых отделов сальных желез дифференцируясь в клетки жирового происхождения – себоциты (Magnúsdóttir et al., 2007; Cottle et al., 2013; Lo Celso et al., 2008).

Помимо перечисленных стволовых клеточных ниш в эпидермисе присутствуют СК МЦ. Они были впервые идентифицированы в волосяном фолликуле и расположены в области выпуклости, которая является их нишей. Волосяные МЦ образуются в выпуклости волос в начале волосяного цикла (анагеновая фаза) и умирают от апоптоза в конце (катагеновая фаза). Меланобласты, локализованные в выпуклой области волосяного фолликула, могут трансформироваться в СК МЦ или дифференцированные МЦ, которые производят пигмент меланина (Sarin & Artand, 2007; Robinson & Fisher, 2009).

Дермальные стволовые клетки (ДСК) изучены гораздо меньше, чем ЭпСК. Обзор Зориной и соавторов, собравший последние публикации на тему дермальных клеток, демонстрирует ряд полипотентных клеток, полученных из дермы и соответствующих по своему дифференцировочному и пролиферативному потенциалу мультипотентным мезенхимальным клеткам костного мозга (Зорина и др., 2011). Все описанные типы клеток-предшественниц, идентифицированных в дерме в упомянутом обзоре, свидетельствуют о том, что дерма человека содержит значительный камбиальный резерв, что даёт ей право считаться альтернативным источником СК для использования в области регенеративной медицины.

В гиподерме есть своя ниша СК жирового происхождения (АСК) – одна из популяций клеток стромальной сосудистой фракции жировой ткани. На данный момент АСК являются перспективным объектом исследований в регенеративной медицине, так как их относительно легко выделить в ходе косметических операций и по сравнению с другими резервуарами СК, при выделении СК жировой ткани их количество больше, чем в других источниках. Однако, до сих пор нет точной фенотипической характеристики АСК, так как данный тип СК имеет много схожих маркеров с другими клетками находящиеся в выделенной фракции (Mizuno et al., 2012).

В межфолликулярном эпидермисе и ВФ поддержание различных популяций СК зависит от тесного взаимодействия внутренних и внешних факторов, которые определяют клеточную нишу (Рис. 4). В состав стволовых ниш входят: окружающие клетки, ВКМ, ростовые факторы. Регуляторами являются сигнальные пути, к ним относятся: WNT/ β -катенин, TGF- β (BMP/bone morphogenetic proteins), фактор роста ФБ (bFGF), SHH и Notch, которые могут действовать аутокринным и паракринным образом.

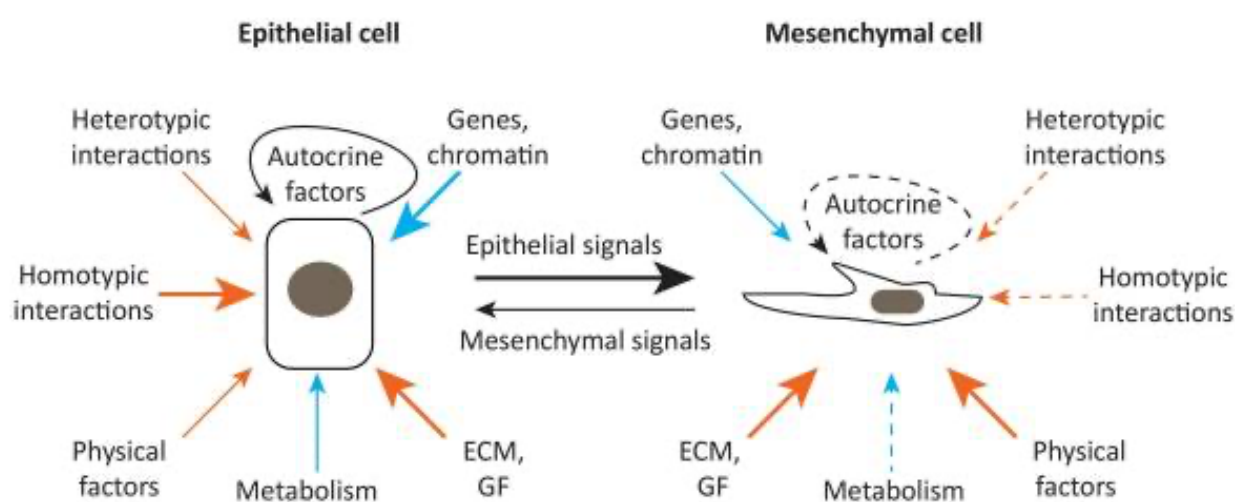


Рисунок 4. Влияние внешних и внутренних регуляторных факторов на эпителиальные и мезенхимальные клетки кожи (по Rognoni & Watt, 2018). Оранжевыми стрелками обозначены внешние факторы, синими стрелками обозначены внутренние факторы, разная

толщина стрелок обозначает степень воздействия, пунктирные стрелки обозначают слабое/неизвестное воздействие.

При различных повреждениях кожи начинаются активные процессы репаративной регенерации. Процесс ранозаживления состоит из трех этапов: воспалительного, пролиферативного и ремоделирующего (Рис 5.), включающие четыре перекрывающиеся фазы: гемостаз, воспаление, пролиферация и ремоделирование (Gurtner et al., 2008; Hunt et al., 2000; Li et al., 2007; Завражнов и др., 2016;).

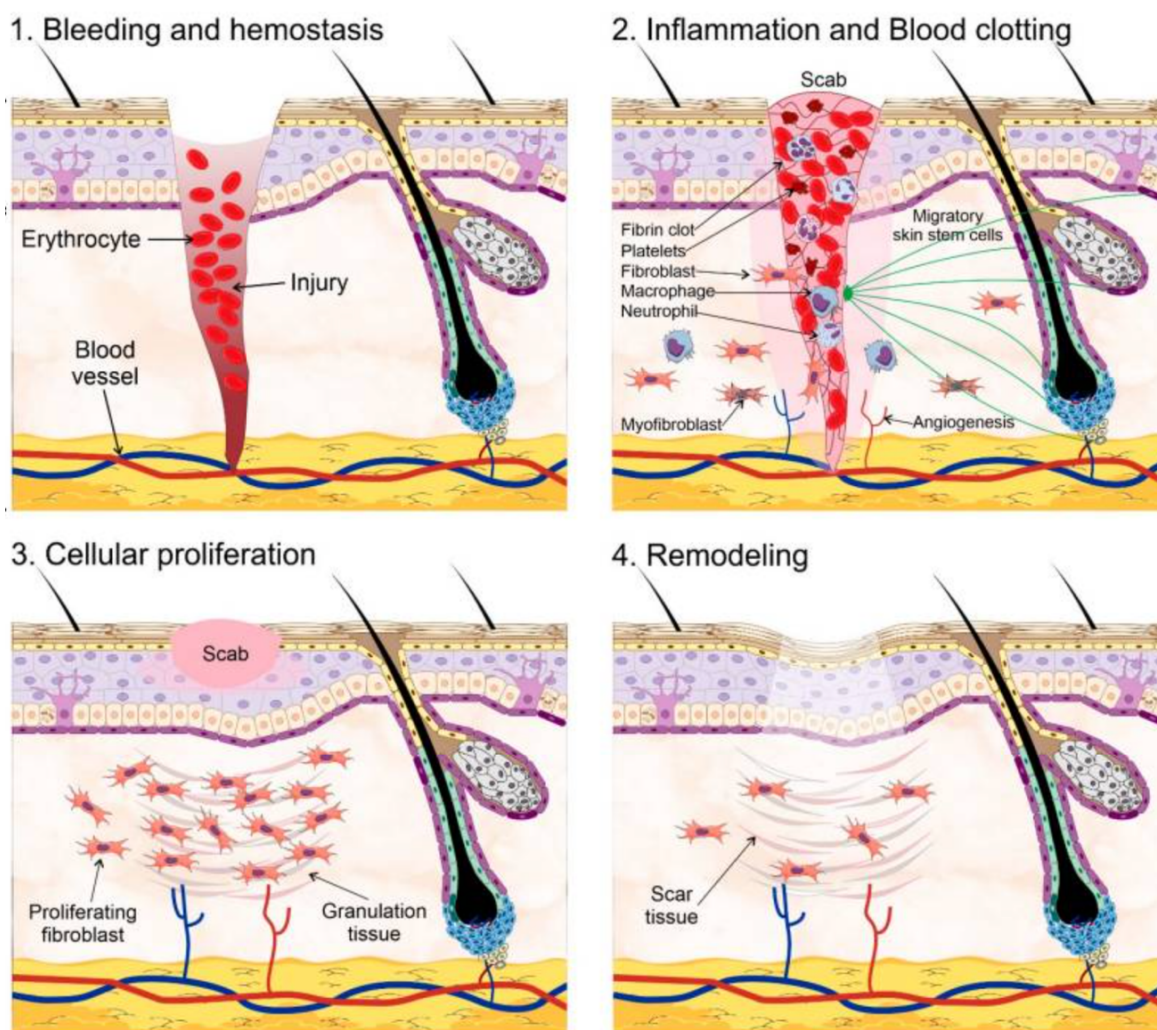


Рисунок 5. Процесс заживления ран (по Díaz-García et al., 2021). Данный процесс включает такие процессы, как: (1) кровотечение и гемостаз, при которых кровоток замедляется и образуется сгусток, предотвращающий потерю крови во время травмы. (2) Воспаление и свертывание крови, при которых рана закрывается фибрином, который образует временную матрицу, где располагаются иммунные клетки, которые удаляют мертвую ткань, после чего ФБ рекрутируются в место повреждения и способствуют ангиогенезу и привлечению МФ, происходящих из ФБ, которые сокращают область раны. На этом этапе СК, находящиеся в нишах, мобилизуются в место повреждения, чтобы начать процесс реэпителизации, начиная с края раны. (3) Клеточная пролиферация, при которой привлеченные ФБ секретируют коллаген

и образуют грануляционную ткань, на месте повреждения образуется струп. (4) Ремоделирование ВКМ, при котором новые компоненты ВКМ секретируются как ФБ, так и КЦ, которые ремоделируют матрикс посредством экспрессии матриксных металлопротеиназ.

Процесс заживления начинается с вовлечения многочисленных специализированных и взаимодействующих клеток, молекул и путей. Клеточный ответ включает макрофаги, тромбоциты, ФБ, эпителиальные и эндотелиальные клетки (Рис.6).

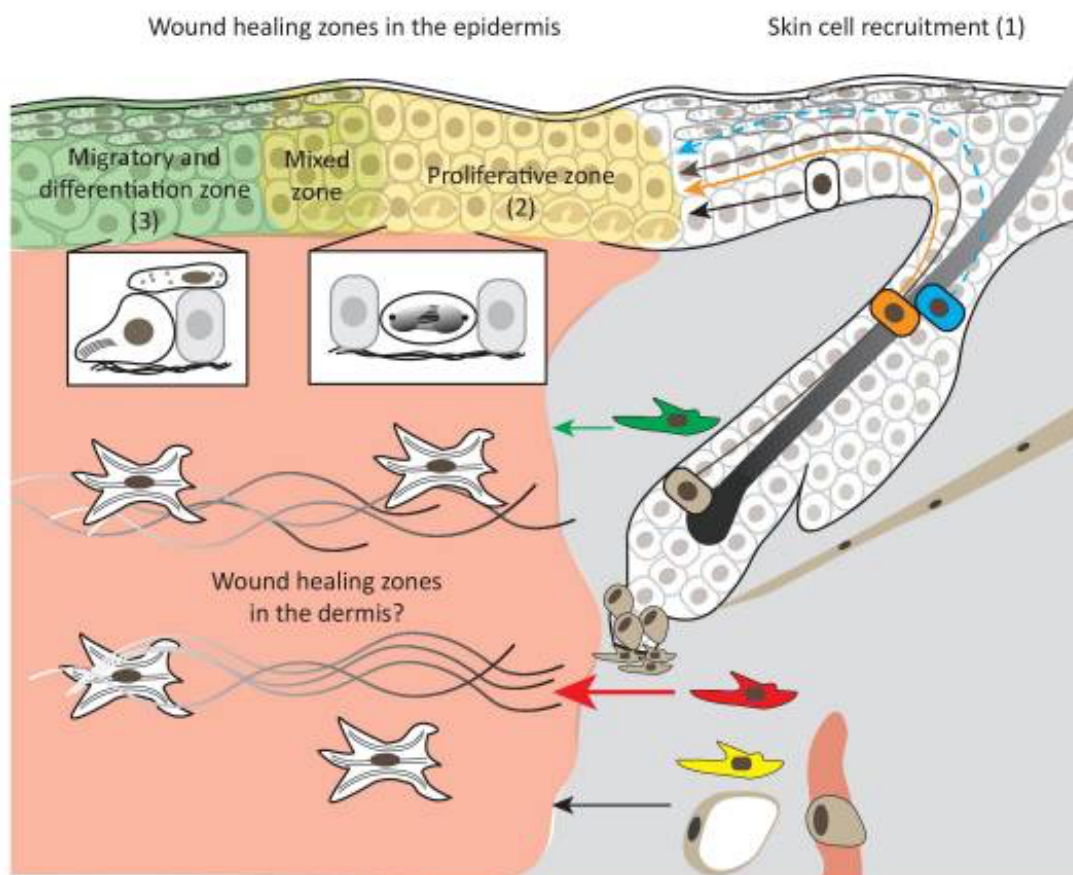


Рисунок 6. Участие клеточных субпопуляций в ранозаживлении (по Rognoni & Watt, 2018). На рисунке оранжевым и серым цветами обозначены клетки ВФ, синим – клетки сальных желез, белым – клетки базального слоя эпидермиса, зеленым – папиллярные ФБ, красным – ретикулярные ФБ, желтым – пре-АЦ, другими рядом расположенными клетками с пре-АЦ являются АЦ и перициты.

В дополнение к различным клеточным взаимодействиям белки и гликопротеины, такие как факторы роста, цитокины, хемокины, ингибиторы и их рецепторы, также могут влиять на заживление. ФБ и КЦ играют важную роль в пролиферативной фазе, которая сосредоточена на замене поврежденного ВКМ и восстановлении структуры и функции тканей. Активация ФБ и КЦ макрофагами через цитокины и высвобождение факторов роста вызывает ангиогенез, выработку коллагена, выработку ВКМ и эпителиализацию (Rowan et al., 2015; Gurtner et al., 2008; Rognoni & Watt, 2018; Li et al., 2007).

Воспалительный процесс наступает сразу после травмы. После агрегации тромбоцитов в место раны рекрутируются различные виды лейкоцитов, включая нейтрофилов, макрофаги, тучные клетки и Т-клетки. Помимо элиминации мертвых клеток и борьбы с инфекцией, эти лейкоциты выделяют цитокины и факторы роста, такие как TGF- β , IGF и FGF, которые способствуют ангиогенезу, миграции и пролиферации ФБ и КЦ, синтезу ВКМ. Во время формирования тканей грануляционная ткань, состоящая из вновь сформированных кровеносных сосудов, макрофагов и ФБ, начинает покрывать рану. Затем эпидермальные клетки мигрируют по грануляционной ткани, чтобы реэпителиализовать рану. Клетки-предшественники АЦ также активируются на этом этапе для генерации зрелых АЦ, важных для рекрутирования ФБ (Rognoni & Watt, 2018). Во время ремоделирования тканей ФБ и КЦ откладывают новые белки ВКМ для укрепления восстановленной ткани (Gravante et al., 2007). Итогом ранозаживления является формирование раневого шрама, за счет последовательного откладывания коллагена и эластина, а также преобразования ФБ в миофибробласты (МФ). Показано, что именно КЦ регулируют дифференцировку ФБ в миофибробластный тип (Ter Horst et al., 2018; Werner et al., 2007). МФ секретируют коллаген и пучки микрофиламентов, продуцируют различные белки ВКМ (включая фибронектин и гиалуроновую кислоту). Переход ФБ в МФ контролирует баланс между сокращением и реэпителизацией, что частично определяет податливость заживленной раны. Помимо конверсии ФБ, апоптоз КЦ и воспалительных клеток являются ключевыми процессами в прекращении заживления раны и общем окончательном внешнем виде раны (Ter Horst et al., 2018; Snowden, 1984). Однако, устойчивая активация МФ приводит к фиброзной патологии кожи и внутренних органов, а недостаточная активация МФ может наблюдаться при хронических ранах. Чрезмерная и длительная активация МФ приводит к фиброзу ткани. При фиброзе наблюдается устойчивая связь воспалительных макрофагов и МФ, ремоделирующих ВКМ. Временная и пространственная координация деятельности этих двух клеточных популяций имеет решающее значение для контролируемого процесса заживления ран. ВКМ выполняет функцию координатора репарации – регулируя обмен профибротическими сигналами между макрофагами и МФ (Pakshir & Hinz., 2018).

Таким образом каждый слой кожи гетерогенен по своему составу, каждый тип клеток так или иначе влияет на процессы ранозаживления и образования рубца. Обычно этих процессов достаточно, чтобы позволить коже восстановиться после незначительной травмы. Однако обширная потеря кожи, например, вследствие обширных и глубоких ожогов, требует медицинского вмешательства, направленного на восстановление утраченной ткани. Для лучшего понимания процессов регенерации кожи и возможности контролировать их важно глубокое понимание роли каждого типа клеток, участвующих в этих процессах. Для лучшего

понимания этих процессов и возможности контролировать их важно глубокое понимание роли каждого типа клеток, участвующих в процессах регенерации кожи. Этому способствует идентификация клеток по экспрессии определенного набора поверхностных и внутриклеточных маркеров.

1.3 Фенотипическая характеристика фибробластов (ФБ) и кератиноцитов (КЦ)

КЦ в ходе кератинизации экспрессируют несколько специфических белков, включая кератины (К), которые являются основными белками промежуточных филаментов в эпителиальных клетках.

Кератины выполняют множество важных функций, включая обеспечение структурной поддержки, защиту эпителиальных клеток от механических и немеханических нагрузок, а также регулирование апоптоза и синтеза белка (Gu & Coulombe, 2007). Они классифицируются на К I и II типов в зависимости от их геномной структуры и гомологии нуклеотидных последовательностей (Coulombe, 1997). К I типа, помеченные К 9-20, являются кислыми и имеют низкую молекулярную массу, в то время как К II типа, помеченные К 1-8, являются основными и имеют высокую молекулярную массу (O'Guin et al., 1987).

Экспрессию кератинов часто используют в качестве маркера для эпидермальной пролиферации и дифференциации в культуре клеток. Известно, что базальные КЦ экспрессируют К5, К14 и небольшое количество К15 (Wang et al., 2016), тогда как супрабазальные дифференцирующиеся КЦ экспрессируют К1, К2 и К10 (Damon & Blumenberg, 2012). Однако по мере дифференцировки, экспрессия К1 и К10 подавляется и замещается экспрессией К6 и К16. Таким образом, экспрессия К6 и К16 маркирует активацию КЦ (Evora et al., 2021).

Помимо набора К, эпидермальные КЦ кожи человека можно идентифицировать по экспрессии, следующих маркеров:

Кадгерин

Кадгерин составляет суперсемейство кальций-зависимых молекул адгезии, которые играют важную роль в специфической межклеточной адгезии и других биологических процессах, таких как распознавание клеток, сигнализация клеток, клеточная коммуникация, клеточный рост и морфогенез. Их экспрессия, по-видимому, жестко регулируется в процессе развития, и каждый тип ткани или клетки демонстрирует характерный паттерн молекул кадгерина. Большинство белков кадгерина содержат несколько гомологичных внеклеточных повторов кадгерина, трансмембранную область и цитоплазматическую область. Цитоплазматические домены играют решающую роль во взаимодействии цитоскелета и

полных адгезивных свойствах молекул кадгерина (Nagafuchi & Takeichi, 1988; Stappert & Kemler, 1994). КЦ, покидающие базальный слой, подвергаются терминальной дифференцировке по мере продвижения к поверхности. Известно, что классические кадгерины, E- и P-кадгерины, являются основными компонентами межклеточных адгезионных соединений эпидермиса, а также участвуют в морфогенезе и поддержании структуры кожи.

14-3-3σ (стратифин)

Белки 14-3-3 – это семейство регуляторных молекул, которые функционируют как класс высоко консервативных молекулярных шаперонов. Существует семь известных изоформ млекопитающих: $\alpha/\beta/\gamma$, ϵ , π , σ , τ , θ и ζ . Так, было показано, что изоформа 14-3-3 σ регулируют активность белков SSH, которые являются ключевыми регуляторами формирования полярности клеток и сборки матрикса, приводя к специфическому поведению миграции эпидермальных КЦ (Kligys et al., 2009). Помимо этого, выделяемый КЦ стратифин оказывает сильное коллагеназно-стимулирующее действие на дермальные ФБ (Ghahary et al., 2004). Учитывая тот факт, что 80% общего белка в коже составляет коллаген I типа, и в физиологических условиях деградация интерстициального коллагена (типа I, II и III) специфически инициируется коллагеназой, для целостности кожной архитектуры необходим жесткий баланс между синтезом и деградацией коллагенов (Johnson-Wint & Gross, 1994).

Интегрины

Интегрины являются гетеродимерными рецепторами ВКМ и контррецепторами клеточной поверхности, которые играют важную роль в эмбриональном развитии, воспалении, заживлении ран и онкогенезе. В неповрежденном эпидермисе экспрессия интегрин ограничена базальными КЦ, которые прикреплены к базальной мембране, и она подавляется, поскольку дифференцирующиеся КЦ отделяются от базальной мембраны и смещаются вверх в супрабазальные слои. В эпидермисе заживающей раны, КЦ приобретают новые свойства адгезии/миграции в результате либо изменений в экспрессии интегрин, либо изменения адгезионных/сигнальных функций интегринов, которые уже были экспрессированы до ранения. Конститутивно экспрессируемые интегрины, которые сохраняются или активируются в эпидермисе раны, включают $\alpha3\beta1$ и $\alpha6\beta4$ (оба рецептора ламинина-332), $\alpha2\beta1$ (рецептор коллагена), $\alpha9\beta1$ (рецептор клеточного фибронектина, тенасцина и других лигандов) и $\alpha\nu\beta5$ (рецептор витронектина) (Watt & Jones, 1993).

Интегрины, которые экспрессируются *de novo* в заживающих ранах, включают $\alpha5\beta1$ (рецептор фибронектина) и $\alpha\nu\beta6$ (рецептор фибронектина и тенасцина). Эти эпидермальные интегрины могут связываться с многочисленными лигандами, присутствующими во временном внеклеточном матриксе раны, включая фибронектин ($\alpha5\beta1$, $\alpha9\beta1$, $\alpha\nu\beta6$), витронектин ($\alpha\nu\beta5$) и

тенасцин ($\alpha 9\beta 1$, $\alpha \nu\beta 6$), а также ламинин-332 ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$), который откладывается мигрирующими КЦ.

Так, интегрин $\alpha 9\beta 1$ широко экспрессируется на гладкомышечных и эпителиальных клетках и опосредует адгезию к белкам ВКМ остеопонтина и тенасцина-С. По сравнению с другими эпидермальными интегринами $\alpha 9\beta 1$ изучен менее широко, чем другие интегрины, его роль, вероятно, будет многофункциональной, учитывая широкий спектр потенциальных лигандов для этого интегрин, присутствующих в ранах. Генетические исследования выявили важную роль $\alpha 9\beta 1$ в реэпителизации ран. Пролиферация КЦ была значительно нарушена в ранах мышей с эпидермис-специфичной делецией $\alpha 9\beta 1$, в то время как скорость реэпителизации не была затронута, что привело к уменьшению толщины неоэпидермиса, что, по-видимому, было связано с уменьшением числа мигрирующих КЦ (Singh et al., 2009). Таким образом, $\alpha 9\beta 1$ способствует установлению целостности неоэпидермиса, способствуя пролиферации раневых КЦ, а не стимулируя эпидермальную миграцию (Longmate & Dipersio, 2014).

p63 α

Ген p63 играет важную роль в развитии многослойного плоского эпителия, регулируя эпидермальную стратификацию и пролиферативный потенциал СК, а изоформа этого белка $\Delta Np63\alpha$ контролирует скорость пролиферации клеток базального эпителия, тем самым поддерживая критическое количество базальных СК (Mills et al., 1999; Parsa et al., 1999).

ABC5

АТФ-связывающий транспортер, обнаруженный во многих СК из самых разных источников, в том числе и в коже. Имеет множество функций и участвует в таких биологических процессах, как транспорт, альтернативный сплайсинг, дифференциация клеток (в клетках-предшественниках кожи) (Frank et al., 2003; Zhou et al., 2001).

Ламинины

Ламинины – это белки ВКМ, состоящие из α -, β -и γ -цепей с молекулярной массой 140-400 кДа (Aumailley, 2013). На данный момент выделяют восемь генетически различных цепей ламинина (α -1, α -2, α -3, β -1, β -2, β -3, γ -1, γ -2) и семь различных форм сборки (ламинины от 1 до 7). Ламинин, является наиболее распространенным структурным и биологически активным компонентом, присутствующим в базальных мембранах. Он представляет собой адгезионный белок клеточного субстрата и, таким образом, играет решающую роль в стимулировании регенерации нейритов и модуляции клеточных функций, таких как дифференцировка, форма клетки и движение клеток.

Инволюкрин

Инволюкрин, является маркером, который сигнализирует о начале пути терминальной дифференцировки эпидермальных КЦ от базальной мембраны к вышележащим слоям (Watt & Jones, 1993; Rheinwald & Green, 1975).

В свою очередь, для ФБ было показано, что данный тип клеток экспрессирует *виментин* и *десмин* (структурные белки промежуточных филаментов цитоскелета), однако данные белки экспрессируются и другими фибробластоподобными клетками. На сегодняшний день два маркера – белки *FSP1* (член семейства внутриклеточных белков S100) и *FAPα* (белок активации ФБ) считаются наиболее специфичными для идентификации ФБ, хотя они также не являются эксклюзивными. Помимо этого, дермальные ФБ экспрессируют белки *Snail*, *β-catenin*, *fibronectin*, *N-кадгерин* (Kalluri & Zeisberg, 2006; Covas et al., 2008; Sorrell & Caplan, 2009; Strutz et al., 1995).

В этой связи идентификация дермальных ФБ и эпидермальных КЦ основывается на комплексе функциональных и иммунофенотипических параметров, конкретный перечень которых требует уточнения и унификации. Кроме того, одной из переменных, которая вносит свои сложности в решение этого вопроса является биологическое состояние в культуре *in vitro* эпидермальных СК, освобождённых от механизмов контроля ниши СК *in vivo*. СК в культуре, возможно, приобретают свойства, связанные с заживлением ран *in vivo* (Lavker & Sun, 2000).

1.4 Кожные раны

Рана (от лат. *Vulnus* - рана) – это повреждение различного генеза, сопровождающиеся нарушением целостности кожных и слизистых покровов (Завражнов и др., 2016).

Кожные раны классифицируют по глубине повреждения, времени заживления, этиологии возникновения, месторасположению. Однако временной показатель является основным в лечении и заживлении ран, таким образом, клинически раны в зависимости от сроков их заживления можно разделить на острые и хронические (Korting et al., 2011).

Острые раны существуют до 6 недель. Их отличительной особенностью является самопроизвольное закрытие. Примерами острых ран являются термические раны, хирургические разрезы, ссадины и рваные раны. Хронические раны существуют более 12 недель. Они требуют периодического осмотра и надлежащих хирургических манипуляций, препятствующих возникновению патологических процессов (Lazarus, et al., 1994; Li et al., 2007; Sen et al., 2009). Хронические раны возникают как осложнения других болезненных процессов, таких как язвы стопы, диабета, пролежни в результате травм спинного мозга и нейродегенеративных процессов (болезнь Пика) (Sen et al., 2009).

На данный момент самыми распространенными и экономически затратными являются термические и трофические кожные раны (Fife & Carter, 2012; Sen et al., 2009).

Термическая, или ожоговая рана (от лат. *Combustio* - ожог) – это комплексная травма вследствие высокотемпературного, химического, электрического или радиационного воздействия на тело, которое разрушает и/или повреждает кожу и подлежащие ткани (Korting et al., 2011).

Ожоговый травматизм занимает четвертое место среди наиболее распространенных видов травмы. По данным ВОЗ ежегодно обращается за медицинской помощью с ожогами примерно 6 миллионов человек.

В Российской Федерации для клинической и экспертной интерпретации термических ожогов используется классификация глубины термических ожогов, принятой в 1961 г. на XXVII Всесоюзном съезде хирургов СССР (Шаповалов и др., 2014), где ожоги подразделяют на 4 степени (Рис 7.): ожоги первой степени, когда поврежден только эпидермис; ожоги второй степени, когда повреждены эпидермис и часть дермы; ожоги третьей степени – поражение всех слоев кожи вплоть до собственной фасции; ожоги четвертой степени характеризуется полным некрозом кожи и глубжележащих тканей (клетчатка, фасция и т.д.) до тотального обугливания (Hermans, 2005).



Рисунок 7. Виды степеней ожогов (по Манакову, 2019).

Трофическая рана (язва) (от лат. *Ulcus* - язва, нарыв) – это полиэтиологическая рана, которая не проходит через нормальную, упорядоченную и своевременную последовательность процесса ранозаживления в течении 12 недель (Рис. 8) (Bowers & Franco, 2020; Lazarus, 1994).

Систематический обзор и метаанализ обсервационных (наблюдательных) исследований, проведенных в 13 разных странах в период с 2000 по 2017 год, выявил значительную распространенность хронических ран. Общая популяция, охваченная исследованиями, составляла 15 748 658 человек, где количество случаев хронических ран составило 141 311 и наиболее частым типом хронических ран были язвы ног (Martinengo et al., 2019).

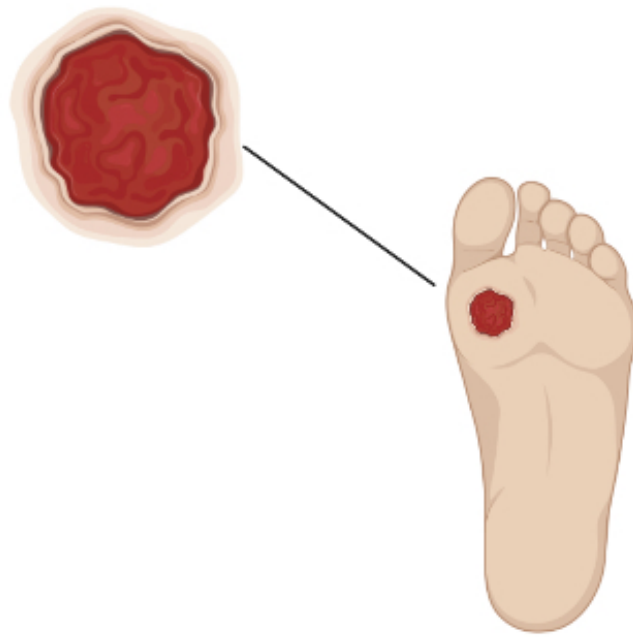


Рисунок 8. Трофическая язва (Изображение сделано при помощи сайта <https://biorender.com>)

Трофические раны в зависимости от этиологических признаков делятся на три типа: пролежни, диабетические и венозные язвы. Несмотря на различную этиологию, выявлены четыре общих фактора, повышающих вероятность хронизации ран: ишемия, пожилой возраст пациентов, синдром ишемии-реперфузии и бактериальная контаминация (Bowers & Franco, 2020; Frykberg & Banks, 2015).

При любых повреждениях кожи важно быстро и качественно восстановить ее целостность.

1.5 Методы лечения кожных ран.

Лечение кожной раны в основном включает быстрое закрытие раны для восстановления барьерной функции кожи и предотвращения инфекции, а также подавление боли и функциональное восстановление. История разработки методов лечения ран насчитывает несколько тысячелетий и арсенал методик и средств лечения ран обширнее, чем в любой другой отрасли медицины. Современные методики лечения кожных ран (острых и хронических) варьируют от традиционных до альтернативных и зависят от множества факторов. В настоящее время в лечении ран выделяют оперативный (хирургический), консервативный и комбинированный методы.

Оперативный метод основан на хирургической обработке раны и направлен на остановку кровотечения, предупреждение (или лечение) раневой инфекции и восстановление

анатомических соотношений поврежденных тканей. Наиболее часто применяемыми хирургическими методами являются: некрэктомия, ранняя некрэктомия, отсроченная кожная пластика.

Консервативный метод основан на уходе за раной или, другими словами, лечение с использованием раневых покрытий. Причем список применяемых средств с каждым годом все больше расширяется. Это различные виды растворов, мазей, паст, а также покрытий (повязок).

Комбинированный метод лечения включает в себя элементы оперативного и консервативного методов. Это наиболее распространенный и наиболее эффективный метод. В одних случаях оперативный метод применяется в начале лечения, а потом назначается консервативная терапия. В других случаях в начале лечения применяется консервативный метод, затем на каком-то этапе назначается оперативное лечение, и на завершающем этапе снова консервативное лечение.

Таким образом, после повреждения кожи в целях предотвращения риска осложнений следует предпринять своевременные и грамотные меры, к которым относится обработка раны с применением специальных антисептических и восстанавливающих кожный покров лекарственных средств и перевязочного материала.

1.6 Раневые покрытия (РП) в лечении кожных ран.

Независимо от вида кожной раны, основным требованием к ее лечению является экономичное, простое в применении, легкодоступное, эластичное и хорошо прилегающее к раневому ложу раневое покрытие (РП), которое обеспечит хорошее обезболивание, защитит рану от инфекции, предотвратит потерю тепла и жидкости, ускорит заживление, способствуя спонтанной эпителизации поверхностных ожогов частичной толщины в ожидании постоянного покрытия (Atiyeh et al., 2005; Shi et al., 2020; Weller et al., 2020).

Одна из основных задач РП заключается в сохранении влажной среды внутри раневого ложа. Труды И.Ф. Земмельвейса, Л. Пастера и Р. Коха, подтолкнули Д. Листера к разработке первой антисептической покрытием в 1867 году, которая состояла из пропитки ворса и марли карболовой кислотой. Влажная среда способствует нормальному регенеративному процессу: клетки базального слоя эпидермиса не могут расти через струп, и вместо этого им необходимо мигрировать глубже туда, где ткань влажная, что облегчает миграцию клеток. А такие временные ограничения могут увеличить риск инфицирования раны, боли и рубцевания (Broussard & Powers, 2013).

Наиболее доступные в настоящее время РП изготавливаются с использованием хитозана, гиалуроновой кислоты, коллагена и кремния (Turley & Torrance, 1985; Moczar & Robert, 1993; Kirwan, 1995; Malmquist et al., 2008; Kirichenko et al., 2013). Кроме того, другие

биоматериалы, которые в настоящее время используются для лечения ран, состоят из альгинатов, гепарина, целлюлозы, желатина и т.д. (Broussard & Powers, 2013; Dhivya, 2015; Mogoşanu & Grumezescu, 2013; Powell et al., 2008; Ong et al., 2008; Uppal et al., 2011). Несмотря на то, что биосовместимость с натуральными материалами очевидно очень высока, в некоторых случаях до сих пор остаются проблемы с потенциальной иммуногенностью.

РП являются относительно новыми биомедицинскими продуктами, и в настоящее время не существует общепринятой классификации раневых покрытий. Наиболее подробная описана в обзорной статье Broussard & Powers, которые разделили РП на 3 большие группы – влагоудерживающие покрытия (представляют собой пленки, гидрогели, гидроколлоиды, пены, альгинаты), антимикробные покрытия (содержат серебро, мед, йод), тканеинженерные биологические покрытия (Broussard & Powers, 2013).

Пленочные РП представляют собой однослойные покрытие, которые непосредственно контактируют с поверхностью раны (Walker, 2017). Имеют низкую адгезию к раневому ложу, что предотвращает риск повторного повреждения раневого ложа при удалении, а их материал проницаем для газов и водяного пара, но непроницаем для жидкости и бактерий. Врачи используют их в качестве первичного покрытия для возможности наблюдения за раной. Однако их непитывающие свойства могут привести к накоплению избыточного экссудата и мацерации краев раны.

Гидрогелевые РП состоят из сшитых нерастворимых полимеров, крахмала или карбоксиметилцеллюлозы и воды (до 96%). Предназначены для поглощения экссудата или для регидратации раны в зависимости от уровня ее влажности, кроме того, они обеспечивают охлаждающий эффект при нанесении, который может уменьшить воспаление (Broussard & Powers, 2013; Walker, 2017). В зависимости от типа/ формы раны гидрогели могут быть модифицированы, например служить в качестве тканевой матрицы, где важные компоненты неповрежденной ткани временно восстанавливаются до тех пор, пока не завершится регенерация и повторная регуляция поврежденной области (Landriscina et al., 2015; Hawthorne et al., 2021; Broussard & Powers, 2013). Гидрогели, как правило, обладают низкой поглощающей способностью из-за присущего им высокого содержания воды. Низкая поглощающая способность может облегчить накопление экссудата, что может привести к мацерации ран и пролиферации бактерий. Они имеют низкую прилипающую способность к раневому ложу, что требует использования вторичного покрытия, такой как пленка или пена. Гидрогели имеют небольшие размеры пор, которые могут препятствовать миграции клеток и диффузии белков, отходов, питательных веществ и кислорода. Используются для сухих хронических ран, некротических ран, язв под давлением и ожоговых ран (Dhivya et al., 2015)

Гидроколлоидные РП относятся к числу наиболее широко используемых интерактивных покрытий и состоят из двух слоев: внутреннего коллоидного слоя и наружного водонепроницаемого слоя (Walker, 2017). Эти покрытия состоят из комбинации гелеобразующих агентов (карбоксиметилцеллюлоза, желатин и пектин) с другими материалами, такими как эластомеры, клеи и т.д. (Boateng et al., 2008). Коллоидный слой образует гель, который обеспечивает влажную среду при контакте с поверхностью раны, которая помогает защитить грануляционную ткань, абсорбируя и удерживая экссудат. К недостаткам относится непрозрачность покрытия, что ограничивает способность наблюдения за раной, кроме того, образовавшийся гель также может быть принят за инфекцию, так как имеет желтый цвет и неприятный запах. Гидроколлоиды чаще всего используют для лечения ран над суставами, поскольку обычно обеспечивают мягкую амортизацию, кроме того, подходят для заживления ссадин, послеоперационных ран, поверхностных пролежней и неглубоких язв на ногах (Broussard & Powers, 2013; Dhivya et al., 2015).

Пенные РП представляют собой абсорбирующие покрытия, состоящие из гидрофобной и гидрофильной пены с клейкими границами (Walker, 2017). Пенные покрытия подходят для язв голени и ран с умеренной или сильной экссудацией, также показаны для гранулирующих ран. Они обычно используются в качестве первичных покрытий для абсорбции, а вторичные покрытия не требуются из-за их высокой впитывающей способности и паропроницаемости (Ramos-e-Silva, 2002). Недостатком пенных покрытий является необходимость частой перевязки, и она не подходит для ран с низкой экссудацией, сухих ран и сухих рубцов, поскольку их заживление зависит от экссудатов (Broussard & Powers, 2013; Dhivya et al., 2015).

Альгинатные РП состоят из полисахаридов на основе морских водорослей. Альгинат при контакте с раневой поверхностью образует гель, который можно снять при перевязке или смыть стерильным физиологическим раствором. Данный тип покрытий обладает высокой впитывающей способностью (Hawthorne et al., 2021). Высвобождаемый из покрытия кальций обладает кровоостанавливающими свойствами, которые способствуют каскаду свертывания крови (Broussard & Powers, 2013). Данный тип покрытий используют для средних и тяжелых дренажных ран, не рекомендуется применять для сухой раны, ожоговой раны III – IV степеней, так как это может привести к прилипанию покрытия к ране и дальнейшему болезненному удалению.

Для лечения поверхностно-инфицированных ран, могут быть использованы покрытия **с антимикробным покрытием**, содержащие: серебро, мед, йод. Эти покрытия могут убивать бактерии на поверхности раны или внутри покрытия в течение 7 дней. Однако до сих нет точных данных о длительном использовании таких покрытий (Broussard & Powers, 2013).

Особое место среди РП занимают *тканеинженерные биологические покрытия* (ТБП). ТБП – это заменители, или эквиваленты кожи (ЭК), компенсирующие функциональные и физиологические нарушения, присутствующие в поврежденных тканях. Их разработка и применение для лечения острых и хронических кожных ран напрямую связаны с развитием клеточных технологий и тканевой инженерии. ТБП могут состоять только из клеточного компонента, из клеточного компонента и подложки (матрицы), так и только из матрицы. Тканеинженерные биологические покрытия с клеточной составляющей представляют собой биомедицинский клеточный продукт (БМКП). При создании ЭК, как правило, используют ФБ и/или КЦ, заселенные на различные носители (Shevchenko et al., 2010; Shpichka et al., 2019).

Одним из первых ЭК был продукт, разработанный в 1975 Rheinwald & Green (Rheinwald & Green, 1975), которые описали методы выращивания эпидермиса кожи, начиная с биопсии кожи, взятой у пациента. КЦ, выделенные из биопсийного материала, могут быть размножены, таким образом увеличивая зону покрытия в несколько тысяч раз в течение нескольких недель. Этот технологический прорыв привел к созданию первого продукта на основе клеточной тканевой инженерии, Epicel, который продавался компанией Genzyme (Cambridge, Massachusetts). Epicel состоит из листов аутологичных (то есть полученных от реципиента) КЦ, которые используются для лечения пациентов, страдающих от катастрофических ожоговых травм кожи, у которых недостаточно жизнеспособной кожи для лечения традиционными методами аутотрансплантации. Продукт не имеет дермы и имеет толщину всего в несколько слоев клеток; поэтому он чрезвычайно хрупкий и не используется широко (в среднем всего около 60-70 пациентов в год).

Другой ранний продукт был разработан Burke и соавторами (Burke et al., 1981). Он состоит из смеси бычьего коллагена I типа и 6-сульфата акульего хондроитина, которая сшита и превращена в пористую матрицу путем контролируемой сублимационной сушки. Силиконовый лист, прикрепленный к одной стороне, действует как временный барьер, подобный эпидермису. Этот продукт, выпускаемый компанией Integra Life Sciences (Plainsboro, New Jersey) под названием Dermal Regeneration Template, используется для покрытия тяжелых ожоговых ран, повреждение которых распространяется глубоко в дерму. Продукт не содержит живых клеток, и его основная цель – направлять и стимулировать процессы восстановления и регенерации организма.

И наконец, Bell и соавторы разработали биомедицинский клеточный продукт для кожи, воссоздающий как дерму, так и эпидермис (Bell et al., 1981). Сначала создается дерма путем заселения коллагенового геля дермальными ФБ, которые заставляют гель полимеризоваться и образовывать неoderму. Затем на поверхности неoderмы выращивают КЦ. На первых этапах

их культивируют в условиях полного погружения в питательную среду, а затем на границе раздела «воздух – среда», что способствует дифференциации эпителиальных клеток и образованию ороговевшего слоя эпидермиса. Весь процесс занимает примерно три недели. В качестве источника клеток используют аллогенные клетки, выделенные из крайней плоти новорожденного человека, что обеспечивает потенциальную доступность в готовом виде, но с оговоркой, что аллогенный заменитель кожи является лишь временным покрытием. БМКП, основанный на этой технологии, Apligraf, продаваемый компанией Organogenesis, используется для стимуляции реакции заживления ран при стойких венозных язвах ног и диабетических язвах стопы. Аналогичные конструкции также используются для тестов *in vitro*, например, для оценки биосовместимости, измерения трансдермального транспорта и химических коррозионных свойств.

В Институте цитологии ИИЦ РАН уже много лет ведутся разработки различных эквивалентов кожи. В первую очередь, это БМКП «Эквивалент дермальный ЭД», представляющий собой гидрогель на основе коллагена I типа, в который в качестве клеточного компонента включены ФБ, выделенные из дермы кожи человека. Проведенные многочисленные клинические исследования показали эффективность использования этого эквивалента дермы для заживления всех типов кожных ран (Блинова и др., 2015)

Кроме того, был отработан метод выращивания многослойного пласта КЦ, который можно было трансплантировать на раневую поверхность и были выполнены все необходимые условия для получения разрешения Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ на производство и клиническое применение клеточного продукта «Пласт кератиноцитов многослойный аналог эпидермиса кожи для трансплантации на ожоговые поверхности, стерильный ПКМ-ЭК». Однако, этот ЭК не получил широкого распространения в клинической практике, хотя в целом ряде случаев оправдывал свое предназначение. В дальнейших исследованиях выяснилось, что несмотря на то, что процесс трансплантации на рану такого многослойного пласта КЦ в клинических условиях возможен, но является технически трудным (Блинова и др., 2022).

В начале развития тканевой инженерии исследователи предполагали, что созданные ими ЭК, которые были описаны выше, смогут заменить исходную, неповрежденную кожу. Однако теперь, на основании накопленных данных о ЭК, их не следует рассматривать как аналог ауто трансплантатов. ЭК стимулируют и усиливают естественный процесс заживления раны и подготовки раневого ложа за счет функционирующих привнесённых клеток. Кроме того, различные модификации ЭК позволяют использовать их как транспорт факторов роста, белков ВКМ, что способствует миграции ФБ, эндотелиальных клеток или стволовых КЦ.

На сегодняшний день создано достаточное количество ЭК, которые можно классифицировать исходя из основных параметров (Horch, 2005; Broussard & Powers, 2013; Lazic & Falanga, 2011; Shakespeare, 2005): (1) анатомическая структура (эпидермальная, дермальная или композитная; двухслойная или дермоэпидермальная); (2) время покрытия (временное, полупостоянное или постоянное); (3) клеточный состав (клеточный или бесклеточный); и (4) тип материала (биологический (состоящий из аутологических, аллогенных или ксеногенных клеток/материалов) или синтетический (биоразлагаемый или небiorазлагаемый)).

Согласно данным некоторых авторов (Shakespeare, 2005) ЭК могут выполнять следующие функции: (1) защита – путем создания механического барьера для микроорганизмов и осуществления газообмена; (2) барьер – путем обеспечения некоторого покрытия раны после ее ранней обработки до окончательного закрытия (заживления) раны путем трансплантации серийных трансплантатов кожи или культивируемых клеток, особенно при обширных ожогах; (3) питание – путем доставки в кожный матрикс раневого ложа компонентов, цитокинов и факторов роста, которые могут стимулировать и усиливать естественные реакции заживления ран; и (4) обеспечение новыми структурами, такими как коллаген или культивируемые клетки, которые включаются в рану и сохраняются во время заживления раны и/или после этого.

Учитывая вышеупомянутые сведения, создание идеального ТБП (эквивалента кожи) кажется очень сложным, трудоемким и дорогостоящим процессом. Кроме того, рынок коммерческих эквивалентов кожи до сих пор имеет некоторые ограничения (Powers et al., 2016).

Вместе с тем показано, что трансплантация ФБ и КЦ в составе ТБП может способствовать сокращению сроков лечения обширных и хронических ран за счет более раннего восстановления кожного покрова, что позволит снизить длительность системной антибактериальной терапии и необходимость назначения аутодермопластики. Это позволит повысить выживаемость пациентов в тяжелые случаи и улучшить качество жизни (Boateng et al., 2008; Nicholas & Yeung, 2017; Oryan & Alemzadeh, 2017).

Следует отметить, что применение ТБП в качестве БМКП в клинической практике сопряжено с применением других РП в качестве вторичного покрытия. Выбор вторичных РП является актуальной проблемой и должен основываться не только на особенностях раны, но и на биосовместимости с клеточной составляющей ТБП.

Таким образом, рациональный подход заключается как в разработке различных ТБП (эквивалентов кожи), так и методик их применения в клинике. Несмотря на почти полувековую историю разработок эквивалентов кожи, к настоящему времени остается много

вопросов, связанных как с требованиями к компонентам ТБП при их приготовлении, так и с технологией их применения, что и побудило нас на это исследование.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение первичных культур ФБ и КЦ кожи человека

В качестве источника клеток использовали биоптаты кожи век, полученные после корректирующих косметологических операций. Забор биоматериала был осуществлен с добровольного информированного согласия пациента и с соблюдением всех правил асептики и антисептики после проведения предварительного обязательного анализа крови на ВИЧ, RW и маркеры гепатита В и С и получения отрицательных анализов на инфицированность.

Полученные биоптаты помещали в стерильный контейнер с транспортной средой, содержащей антибиотик в рабочей концентрации, и хранили при температуре +4°C не более суток.

Все процедуры с биоматериалом проводили в стерильных условиях бокса микробиологической безопасности второго класса биологической защиты.

Подготовка биоматериала к выделению клеток

Биоптаты тщательно отмывали в растворе PBS (фосфатно-солевой буфер) с добавлением 1 % пенициллин-стрептомицина (Gibco by Life Technologies, США). Для отделения дермы от эпидермиса по линии базальной мембраны фрагменты кожи инкубировали при +4° С в течение ночи в растворе диспазы II и 0,2% коллагеназы I типа (Gibco, США) на PBS. По окончании срока инкубации механически (с использованием пинцетов) отделяли дерму от эпидермиса. Эпидермис использовали для выделения КЦ, а дерму – для выделения ФБ. Для выделения клеток использовали ферментативный метод.

Выделение КЦ из эпидермиса

Эпидермис помещали в 0,25% раствор Trypsin-EDTA (Invitrogen, США) и инкубировали в течение 5-7 мин при температуре 37 °С в условиях термощейкера (BIOSAN, Латвия). Далее фермент инактивировали добавлением 10% FBS (HyClone, США) и инкубировали еще в течение 20 мин. Полученную суспензию пропускали через сетчатый фильтр (Corning, США) и осаждали центрифугированием в режиме 1000 об/мин в течении 7 мин. Осадок ресуспендировали в питательной среде Keratinocyte-SFM (Gibco, США), содержащей 10 % FBS. Клетки высевали на ч. Петри (TPP, Швейцария) диаметром 5 см², дно которых было предварительно обработано 2% раствором желатины. Клетки культивировали при 37°С в CO₂-инкубаторе в газовой среде с 5% CO₂ до формирования клетками конфлюэнтного или субконфлюэнтного монослоя. После достижения клетками состояния монослоя проводили их пересев.

Выделение ФБ из дермы

Дерму механически измельчали и инкубировали в 1% р-ре коллагеназы I типа (Gibco, США) при +37°C в термошейкере (BIOSAN, Латвия) в течение 30 мин. По истечению времени инкубации фермент инактивировали добавлением 10% FBS (HyClone, США). Полученную суспензию пропускали через сетчатый фильтр (Corning, США) и осаждали центрифугированием в режиме 1000 об/мин в течении 7 мин. Осадок ресуспендировали в питательной среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % FBS (HyClone, США) и высевали клетки на ч. Петри (TPP, Швейцария) диаметром 5 см². Клетки культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в газовой среде с 5% CO₂ до формирования клетками конфлюэнтного или субконфлюэнтного монослоя. После достижения первичной культурой состояния монослоя проводили пассирование культуры.

В ходе исследования от пяти доноров было получено 10 биоптатов кожи век, из которых выделяли ФБ и КЦ. Полученные клеточные линии были криоконсервированы на различных пассажах для дальнейших исследований.

2.2 Стандартные условия культивирования

Клетки культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в газовой среде с 5% CO₂ в соответствующих средах, содержащих 10 % FBS (HyClone, США), 2 ммоль/л глутамина (GlutaMax, США) и 1% раствора PenStrep (Gibco, США). КЦ человека культивировали в питательной среде Keratinocyte-SFM (Gibco, США), а ФБ человека – в питательной среде DMEM/F12 (Gibco, США). Перед посевом КЦ дно культуральной посуды обрабатывали 2% р-ром желатины.

2.3 Оценка морфологического состояния культивируемых клеток

Метод прижизненного наблюдения под инвертированным микроскопом с фотофиксацией позволяет визуально оценить морфологическое состояние клеток в процессе их культивирования. Морфологический анализ культивируемых клеток регулярно проводили с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100 (Nikon, Япония), оснащенного фотокамерой.

2.4 Оценка пролиферативной активности по индексу пролиферации

Пролиферативную активность полученных клеточных линий оценивали по индексу пролиферации, где рассчитывается отношение числа клеток в данный момент времени к исходному числу посеянных клеток. Для этого ФБ и КЦ человека высевали на восемнадцать культуральных чашек (TPP, Швейцария) площадью 9 см² с плотностью 4-5x10⁴ клеток/см², для

каждой клеточной линии. На основании полученных значений высчитывали ИП для каждого дня, а также среднее время одного удвоения клеточной популяции (a_0) для последнего дня:

$$a_0 = \frac{t \ln 2}{\ln\left(\frac{Mt}{M_0}\right)}$$

где Mt – количество клеток в момент времени t , M_0 – начальное количество клеток, t – время логарифмической фазы роста клеточной культуры.

2.5 Анализ эффективности колониобразования

Эффективность колониобразования определяли в условиях редкого посева клеток. Для этого клетки каждой клеточной линии (ФБ и КЦ человека) высевали на четыре культуральные чашки (ТРР, Швейцария) площадью 21 см² с плотностью 4-5 клеток/см², для каждой клеточной линии. По истечению 12 суток чашки промывали PBS, фиксировали клетки 70% этанолом в течении 15 мин и окрашивали кристаллическим фиолетовым (ЛенРеактив, Россия) в течение 15 мин. Далее подсчитывали колонии, состоящие не менее чем из 50 клеток. Эффективность колониобразования оценивали по соотношению выросших колоний к изначальному количеству посеянных клеток в пересчёте на % ± ошибка среднего.

2.6 Анализ репликативного старения

Ограниченная способность к размножению является определяющей характеристикой большинства нормальных клеток и завершается старением, остановленным состоянием, в котором клетка остается жизнеспособной.

На данный момент принято выделять несколько форм клеточного старения: (а) репликативное старение – это результат необратимой потери пролиферативной активности соматическими клетками вследствие прохождения определенного числа клеточных делений в соответствии с лимитом Хейфлика; (б) стресс-индукция – старение вызванное субцитотоксическими стрессовыми воздействиями. Основные признаки репликативного и стресс-индуцированного старения сходны и включают определенные изменения (Blagosklonny, 2012) – увеличенный размер клеток, экспрессия рН-зависимой активности бета-галактозидазы (SA- β -Gal) (Dimri, et al., 1995) и измененный паттерн экспрессии генов (Cristofalo et al., 1998). Однако при снижении пролиферативной активности, стареющие клетки все ещё остаются метаболически активными (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

При использовании коммерческого набора Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signalling Technology, США) ФБ и КЦ на различных пассажах были окрашены галактозидазой в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Для проведения этого анализа клетки предварительно высевали в 48-луночную плату и культивировали на протяжении 20-25

пассажей. Об активности SA- β -Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток, вступивших в стадию старения.

2.7 Иммуноцитохимический анализ

Для иммуноцитохимического анализа ФБ и КЦ человека предварительно высевали с плотностью $2,5 \times 10^3$ клеток/см² на покровные стёкла площадью 4 см² и культивировали до достижения монослоя.

- 1) Клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре, промывали PBS (Биолот, Россия) с 0,1% Тритоном X-100 (Sigma, США).
- 2) Инкубировали с первичными антителами в PBS в течение 60 мин при комнатной температуре (или при +4°C в течение ночи) в разведении, рекомендованном производителем.
- 3) Отмывали 3 раза по 10 мин в 0,1% PBS-Tween20 (Sigma, США), после чего инкубировали с вторичными антителами в PBS в разведении, рекомендованном производителем, в течение 60 мин при комнатной температуре. Снова отмывали 3 раза по 10 мин в PBS (Биолот, Россия).
- 4) Заключали в среде, содержащей DAPI (Invitrogen, США).

Изображения получали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FLUOVIEW FV3000 (Life Science, Япония). Анализ изображений осуществляли с помощью программного обеспечения ImageJ (Wayne Rasband, США). Список использованных антител представлен в таблице 2.

Таблица 2. Антитела, использованные в работе

Антитела	Производитель
Anti-ABCB5	Abcam, США
Anti-Cytokeratin 5	Vector Laboratories, США
Anti-Cytokeratin 14	Abcam, США
Anti-Cytokeratin 15	Thermo Fisher Scientific, США
Anti-14-3-3 sigma	GeneTex, США
Anti-p63 α	Biocompare, США
Alexa Fluor® 488	Abcam, США
Alexa Fluor® 555	Abcam, США
Anti-E Cadherin	Abcam, США
Anti-N Cadherin	Abcam, США
Anti-Laminin	Abcam, США

2.8 Цитогенетический анализ полученных линий ФБ

Цитогенетический анализ трех линий ФБ человека проводили на различных пассажах до и после криоконсервации.

Для анализа использовали делящиеся клетки на стадии метафазы. Для перехода ФБ человека к активной логарифмической фазе роста, клетки высевали с плотностью $1,5-2 \times 10^4$ клеток/см² в культуральные флаконы (TPP, Швейцария) с площадью 75 см² и культивировали в течение 2-3 дней. Для накопления клеток на стадии метафазы в питательную среду добавляли колхицин, который связывается с тубулином и тем самым блокирует образование микротрубочек. Колхицин добавляли в концентрации 0,06 мкг/мл (Aldrich Chemical Company, США) на 3,5 часа. Далее клетки сначала промывали PBS (Биолот, Россия), затем 0,02% раствором Версена (Биолот, Россия) и диссоциировали 0,25% раствором Trypsin-EDTA (Gibco, США). Действие фермента блокировали добавлением питательной среды DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% FBS (HyClone, США).

Суспензии клеток центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, супернатант удаляли и проводили гипотоническую обработку смесью 0,075 М KCl и 1% раствором цитрата Na в соотношении 1:1 в течение 20 мин при 37°C или 25 мин при комнатной температуре. После чего клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 в течение 15 мин трижды. Для получения препаратов метафазных пластинок суспензию фиксированных клеток раскапывали на сухие предметные стекла над водяной баней при температуре воды 50-53° С.

Анализ хромосом осуществляли с использованием стандартного GTG-метода дифференциального окрашивания хромосом на G-диски (Ozkinay & Mitelman, 1979). Препараты хромосом, предварительно высушенные при 37°C, а перед окрашиванием нагретые в термостате при 60°C в течение 24ч, обрабатывали 0,02% раствором трипсина (Difco, США) в течение 2-3 мин. Действие фермента блокировали раствором GKN (2,5 г глюкозы Д(+), 1 г KCl, 20 г NaCl, 0,875 г NaHCO₃) в течение 15 сек. Далее препараты хромосом окрашивали раствором красителя Гимза на фосфатном буфере (2мл/10мл) (Merc, США) в течение 4 мин, затем промывали дистиллированной водой и заключали в канадский бальзам.

Препараты метафазных хромосом анализировали в зависимости от качества метафазных пластинок вручную или автоматически с помощью аппаратно-программного комплекса, в состав которого входят: микроскоп Axio Skop A1 ProgRes MF (Carl Zeiss Microscopy, Германия), чёрно-белая CCD-камера высокого разрешения (Jenoptik, 1360 × 1024 пикселя) и компьютер с установленным программным обеспечением «ВидеоТест Карио 3.1».

Число хромосом определяли, анализируя 75-90 метафазных пластинок. Для анализа структурных перестроек хромосом (СПХ) кариотипировали 30 метафазных пластинок.

Количество анализируемых клеток определяли в зависимости от количества и качества полученных метафазных пластинок хромосом. За клональные СПХ принимали перестройки, выявленные как минимум в двух клетках. Кариотипирование и идентификацию хромосом человека проводили в соответствии с Интернациональной системой номенклатуры хромосом человека (ISCN, 2009).

2.9 Моделирование мезенхимально-эпителиального перехода КЦ (эпителиальная дифференцировка)

Для моделирования мезенхимально-эпителиального перехода КЦ использовали ФБ и КЦ человека 7-го пассажа. В лунки 24-луночного культурального планшета (TPP, Швейцария) высевали ФБ в количестве 2 тыс. клеток в 200 мкл питательной среды DMEM/F12 (Биолот, Россия), одновременно с этим в соседние лунки помещались культуральные планшетные вставки (Falcon, США) с диаметром пор 0,8 мкм куда высевали на них КЦ в количестве 50 тыс. клеток в 200 мкл питательной среды Keratinocyte-SFM (Gibco, США).

Через сутки после формирования ФБ монослоя, культуральные планшетные вставки с культивируемыми в них КЦ помещали в лунки с ФБ и культивировали клетки в течении 2-х недель. КЦ в планшетных вставках культивировали в условиях среда-воздух, каждые 3 сут в лунки добавляли питательную среду для предотвращения высыхания КЦ и поддержания ФБ. Контролем служили КЦ, культивируемые в культуральных планшетных вставках в стандартных условиях и без присутствия ФБ (рис. 9).

По окончании срока культивирования мембраны из культуральных вставок вырезали и фиксировали клетки на мембранах 4% параформальдегидом.

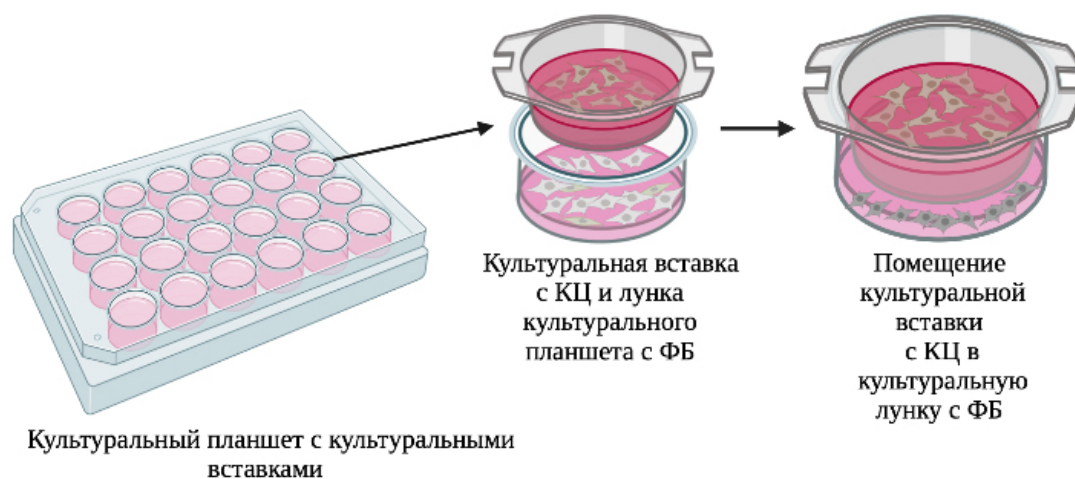


Рисунок 9. Моделирование мезенхимально-эпителиального перехода КЦ

(изображение сделано при помощи сайта <https://biorender.com>).

Дальнейшее иммуноцитохимическое окрашивание КЦ производили по протоколу (описанный в параграфе 2.7). Иммуноцитохимическое окрашивание КЦ проводили на исследование экспрессии K5, K14, K15 и 14-3-3σ.

Изображения получали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FLUOVIEW FV3000 (Life Science, Япония). Анализ изображений осуществляли с помощью программного обеспечения ImageJ (Wayne Rasband, США).

2.10 Криоконсервация и реконсервация ФБ и КЦ

Открепленные с помощью 0,25% раствора Trypsin-EDTA (Invitrogen, США) суспензию клеток переносили в пробирку на 15 мл центрифугировали со скоростью 1500 об/мин в течение 5 мин. Параллельно с этим готовили смесь для криоконсервации на 1 мл смеси для заморозки приходится 100 мкл ДМСО (Биолот, Россия), 200 мкл FBS (HyClone, США), 200 мкл среды для культивирования. После чего сливали супернатант и добавляли необходимое количество среды. По стенке пробирки или каплями добавляли к суспензии клеток смесь для криоконсервации, затем ресуспендировали и раскапывали по криоампулам. Криоампулы помещали в специальный контейнер для заморозки, понижающий температуру на 1°C в минуту, и убирали в холодильник на -80°C после чего переносили в жидкий азот (-195°C) на длительное хранение.

Реконсервацию клеток проводили на водяной бане при 37°C. Открыв криоампулы, клетки бережно ресуспендировали. Клетки аккуратно по стенке или каплями добавляли в пробирку на 15 мл с предварительно добавленными 8 мл, затем центрифугировали 3 минуты 1000g; после чего старую культуральную среду удаляли и ресуспендировали осадок в новой культуральной среде и переносили в культуральную посуду.

2.11 Приготовление дермального и эпидермального эквивалентов кожи на основе коллагенового геля

Для приготовления ТБП дермального и эпидермального эквивалентов использовали коллаген I типа в концентрации 4,6 мг/мл полученный в ИИЦ РАН методом кислотной экстракции из сухожилий крысиных хвостов, который смешивали с концентрированной (10x) средой 199 (Gibco, США) и стерильным 0.34M раствором NaOH (Sigma, США) для доведения pH смеси до нейтрального значения; в полученную смесь добавляли суспензию культивируемых клеток одной из клеточных линий, используемых в работе, в соответствующих питательных средах из расчёта $1,5 \times 10^6$ кл/мл готового геля. Конечная

концентрация коллагена в геле достигала 2 мг/мл. Приготовленную смесь разливали в культуральные сосуды (TPP, Швейцария) и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 20 мин до полной полимеризации. После полимеризации на поверхность эквивалентов добавляли соответствующую питательную среду.

Оценку жизнеспособности клеток в составе эквивалентов кожи проводили, анализируя морфологическое состояние клеток внутри коллагенового геля в процессе прижизненного наблюдения с использованием метода фазово-контрастной микроскопии, организацию актинового цитоскелета методом флуоресцентной микроскопии, пролиферативную активность клеток по их способности к индукции контракции геля и метаболической активности с использованием колориметрических методов (МТТ- и Резазурин-тесты).

«Эквивалент дермальный ЭД» использовали в качестве модельной системы для исследования в условиях *in vitro* его биосовместимости с коммерческими РП.

Приготовленные на основе коллагенового геля ТБП «Эквивалент дермальный ЭД» и «Эквивалент эпидермальный» были переданы в Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И. И. Джанелидзе для проведения клинических исследований (испытаний) биомедицинских клеточных продуктов в рамках совместной НИР «Разработка метода лечения обширных ожоговых ран путем последовательной трансплантации дермального эквивалента и аллогенных кератиноцитов», № АААА-А19-119091800073-1 от 18.09.2019.

2.12 Колориметрические методы оценки пролиферативной активности клеток в составе эквивалентов кожи на основе коллагенового геля

Оценку пролиферативной активности ФБ и КЦ человека в составе кожных эквивалентов проводили, анализируя их метаболическую активность с помощью двух колориметрических методов: МТТ и резазурин-тестов.

2.12.1 МТТ-тест

В основе МТТ-теста лежит способность митохондрий живых клеток с помощью НАДФН-зависимых ферментов, оксидоредуктаз, восстанавливать жёлтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) до пурпурно-синих внутриклеточных кристаллов формазана, которые могут быть растворены в органических растворителях (ДМСО; Биолот, Россия) (Митрошина и др., 2015).

Для проведения МТТ-теста в лунки 48-луночный планшета заливали по 250 мкл подготовленного (параграф 2.10) неполимеризованного КГ, содержащего клетки (дермального или эпидермального ЭК), после его полимеризации добавляли по 250 мкл

питательной среды и культивировали в стандартных условиях. На 3-и, 6-е, 9-е, 12-е и 15-е сутки культивирования питательную среду над КГ удаляли и заменяли на 250 мкл среды, содержащей 10% МТТ (Sigma-Aldrich, США) (0,5 мг/мл фосфатно-солевого буфера PBS) от общего объёма. Планшет помещали в орбитальный термошейкер (BIOSAN, Латвия) и инкубировали в течение 5-и часов при $t=37^{\circ}\text{C}$ и скорости шейкирования 240 оборотов в минуту. По окончании инкубирования удаляли среду с МТТ, вносили по 250 мкл раствора ДМСО (Биолот, Россия) и проводили экстракцию внутриклеточных кристаллов формазана при постоянном шейкировании в течение 10 часов при комнатной температуре. После чего из каждой лунки забирали по 100 мкл раствора и разливали в 96-луночный планшет по 100 мкл и проводили спектрофотометрические измерения оптической плотности раствора. Оптическую плотность раствора формазана измеряли при длине волны 570 нм и референсной длине волны 620 нм с помощью мультимодального ридера Varioskam LUX (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием программного обеспечения Skanlt Software (Thermo Fisher Scientific, США).

2.12.2 Резазурин-тест

В основе резазурин-теста лежит способность митохондрий живых клеток восстанавливать синий резазурин до фиолетового резорурфина, который в дальнейшем может быть восстановлен до гидрорезорурфина, который является прозрачным и бесцветным. Сообщается, что резазурин восстанавливается более широким, чем МТТ, спектром ферментов: кроме митохондриальных дегидрогеназ его восстанавливают цитохромы и дегидрогеназы, находящиеся в цитоплазме клетки. Кроме того, в отличие от МТТ-теста, измерение выживаемости клеток при использовании резазурина может быть первой, но не конечной, точкой эксперимента, что позволяет использовать клеточную культуру в дальнейших экспериментах.

Для проведения резазурин-теста в лунки 48-луночный планшета заливали по 250 мкл подготовленного (параграф 2.10) неполимеризованного КГ (дермального или эпидермального ЭК), после его полимеризации добавляли по 250 мкл питательной среды и культивировали в стандартных условиях. На 3-и, 6-е, 9-е, 12-е и 15-е сутки культивирования удаляли питательную среду и добавляли по 250 мкл питательной среды содержащей резазурин (SigmaAldrich, США) в количестве 10% от общего объёма (рабочая концентрация реактива – 1 мг/мл). После чего планшет помещали в орбитальный термошейкер (BIOSAN, Латвия) на 5 часов при $t=37^{\circ}\text{C}$ и скорости 240 оборотов в минуту. Оптимальное время и скорость инкубации шейкирования были подобраны эмпирическим путём. По прошествии данного времени среду с фиолетовым резорурфином переносили в лунки пустого 96-луночного планшета и проводили

спектрофотометрические измерения оптической плотности раствора. Оптическую плотность раствора резорфуфина измеряли при длине волны 570 нм и референсной длине волны 600 нм с помощью мультимодального ридера Varioskam LUX (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием программного обеспечения SkanIt Software (Thermo Fisher Scientific, США).

2.13 Анализ индукции контракции коллагенового геля

Для анализа индукции контракции коллагенового геля культивируемыми внутри него клетками подготовленный (параграф 2.10) неполимеризованный КГ, содержащий в своём составе клетки, помещали в лунки 48-луночного планшета по 250 мкл на лунку. После полимеризации КГ добавляли в каждую лунку по 250 мкл питательной среды. ЭК на основе КГ и различных типов клеток культивировали в стандартных условиях.

Способность клеток к индукции спонтанной контракции КГ изучали при ежедневном наблюдении с фотофиксацией в течение 15 суток. Контракцию КГ рассчитывали, измеряя его диаметр в лунках 48-луночных плат на 3-и, 6-е, 9-е, 12-е и 15-е сутки культивирования. Степень контракции определяли как отношение диаметра контрактирующего геля к исходному размеру в 1-е сутки, принятого за 100%. В качестве отрицательного контроля использовали КГ без клеток.

2.14 Анализ структуры актинового цитоскелета

Для анализа организации актинового цитоскелета клеток, культивируемых внутри КГ, подготовленный (параграф 2.10) неполимеризованный КГ, содержащий в своём составе клетки, наносили на покровные стекла, помещенные в лунки 24-луночного планшета. После полимеризации КГ в лунки добавляли соответствующую питательную среду и инкубировали КГ с клетками в стандартных условиях в течение 1 сут. По окончании инкубации клетки в КГ фиксировали 4% раствором параформальдегида, пермеабелизировали с помощью 0,1% Triton X-100, затем окрашивали флуоресцентным красителем Rhodamine Phalloidin (Invitrogen, США). Заключали в среду, содержащую DAPI (Sigma, Япония). Анализ актинового цитоскелета проводился с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (ЛСКМ) Olympus FLUOVIEW FV3000 (Life Science, Япония) и ЛСКМ Yokogawa CQ1 (Life Science, Япония). Анализ изображений осуществляли с помощью программного обеспечения ImageJ (Wayne Rasband, США).

2.13 Анализ биосовместимости коммерческих раневых покрытий с дермальным эквивалентом на основе коллагенового геля

Биосовместимость ТБП «Эквивалент дермальный ЭД» и коммерческих РП оценивали по воздействию РП на жизнеспособность ФБ в составе «Эквивалент дермальный ЭД» при моделировании их совместного применения в условиях *in vitro*.

Для этого подготовленный неполимеризованный КГ, содержащий в своём составе ФБ, помещали в лунки 24-луночного планшета по 500 мкл на лунку. После полимеризации КГ добавляли в каждую лунку по 500 мкл питательной среды и культивировали в стандартных условиях в течение 48 ч. Затем проводили анализ биосовместимости «ЭД» с коммерческими РП при их непосредственном контакте.

Для этого убрали питательную среду и помещали на поверхность дермального ЭК равные по площади фрагменты РП.

Жизнеспособность клеток оценивали по их морфологии и метаболической активности с использованием световой микроскопии и МТТ-теста. Контролем служили БИК с ДФ, инкубированные в стандартных условиях.

Инкубацию «Эквивалент дермальный ЭД» с фрагментами РП проводили при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ в течение 3-е суток. Контролем служили КГ с ФБ, инкубированные в стандартных условиях. Влияние РП на жизнеспособность ФБ в составе «ЭД» оценивали на основании анализа морфологии клеток при помощи инвертированного микроскопа Eclipse TS100 (Nikon, Япония) и их метаболической активности при помощи МТТ-теста.

Скрининг биосовместимости коммерческих РП с «Эквивалент дермальный ЭД» проводили по принципу «слепого метода» без указания названия, состава и производителя РП. Список использованных РП представлен в таблице 5.

Таблица 5. Раневые покрытия, использованные в исследовании

Наименование раневого покрытия	Производитель
Syspur-derm®	Hartmann, Германия
Парапран®	Биотекфарм, Россия
Lomatuell H®	Lohmann & Rauscher, Германия
Воскопран®	Биотекфарм, Россия
Metalline®	Lohmann & Rauscher, Германия
Granuflex®	ConvaTec, Великобритания
ХитоПран®	Биотекфарм, Россия
HydroTac transparent®	Paul Hartmann, Германия
Бранолинд Н®	Paul Hartmann, Германия
Aquacel adhesive foam®	ConvaTec, Великобритания
Aquacel Ag ⁺ ®	ConvaTec, Великобритания

2.14 Гистологическое исследование тонкой кожи человека

Гистологическое исследование проводили на биоптате тонкой кожи век человека.

Чтобы исследовать гистологическое строение биоптата тонкой кожи век человека, полученный материал фиксировали методом химической фиксации смесью Буэна, в течение 1 сут, после чего биопсионный материал последовательно переносили в три порции 70% этанолового спирта, в течение 6–7ч (пока спирт не потерял желтоватый оттенок). Затем обезвоживали образец в спиртах с возрастающей концентрацией (от 70 до 100% этилового спирта). Заменяли спирт на хлороформ, постепенно переводили через смесь парафина с хлороформом (1:1) в чистый парафин и заливали в парафиновые блоки. После того как парафин полностью застыл, извлекали из формочки, вырезали скальпелем блоки, оставляя с каждой стороны образца каемку парафина шириной несколько миллиметров. При помощи нагретого скальпеля наклеивали парафиновые блоки на колодку. Получали гистологические препараты с срезами толщиной в 6 мкм. После этого проводили гистологическое окрашивание препаратов гематоксилин-эозином. Гематоксилин окрашивает кислые соединения в клетках (рРНК, РНК, ДНК) в сине-фиолетовый цвет. Эозин окрашивает основные соединения (белки) в розовый цвет.

2.15 Клинические исследования применения дермального и эпидермального эквивалентов кожи при терапии кожных ран

Клинические исследования применения ТБП «Эквивалент дермальный ЭД» и «Эквивалент эпидермальный» проводились в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте скорой помощи имени И. И. Джанелидзе в рамках совместной НИР «Разработка метода лечения обширных ожоговых ран путем последовательной трансплантации дермального эквивалента и аллогенных кератиноцитов». В исследовании приняли участие 13 пациентов с различными повреждениями кожи.

В ходе отработки метода применения была применена поэтапная трансплантация ТБП «Эквивалент дермальный ЭД» и «Эквивалент эпидермальный» совместно с наиболее биосовместимым с данными ТБП раневым покрытием.

2.16 Обработка полученных данных

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2019. Количественные показатели представлены в виде $M \pm m$, где M – среднееарифметическое значение, а m – стандартная ошибка средней. Оценку различий между выборками проводили с использованием метода двухфакторного дисперсионного анализа при помощи GraphPad Prism 8.0, где выявлена критическая

значимость отличительных признаков как ns – not significant, * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$).

Для работы с изображениями использовалась программа ImageJ.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Гистологическое исследование тонкой кожи человека

Для анализа строения ткани, являющейся потенциальным источником СК кожи, использовали гистологические препараты тонкой кожи век человека, окрашенные гематоксилином и эозином (рис. 10).

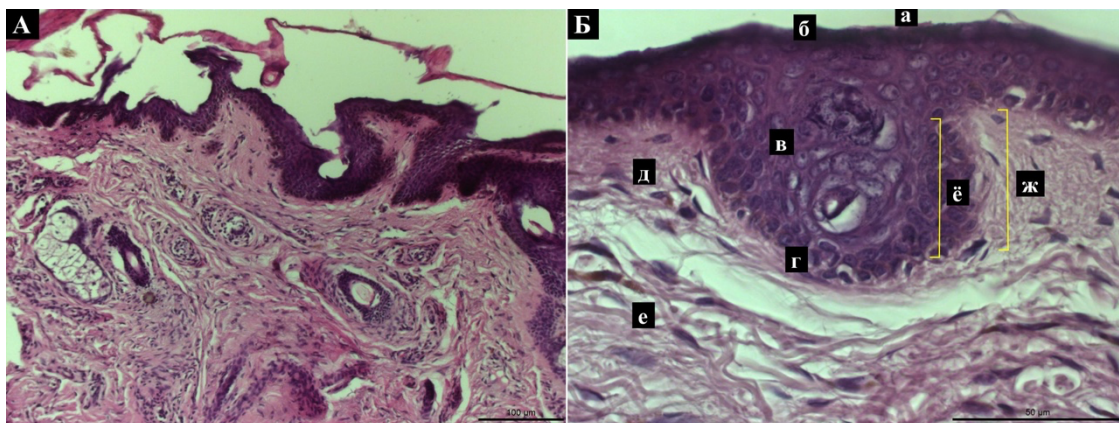


Рисунок 10. Гистологические препараты тонкой кожи век человека. Окраска гематоксилином и эозином. А – эпителиально-стромальный комплекс. МЛ: 50 мкм; Б – послойное строение кожи (слои эпидермиса: а – роговой, б – зернистый, в – шиповатый, г – базальный; слои дермы: д – папиллярный, е – ретикулярный; ё – эпидермальные гребни, ж – дермальные сосочки). МЛ: 50 µm. и 100 µm.

Кожа человека имеет толщину от 0,3 до 5 мм (в зависимости от локализации) и состоит из эпидермиса, эпителиального слоя эктодермального происхождения, и дермы, слоя мезодермальной соединительной ткани.

Отличительными чертами тонкой от толстой кожи являются малая толщина рогового (4-5 рядов клеток) и полное отсутствие блестящего слоя в эпидермисе. Структурно эпидермис тонкой кожи представляет собой ороговевший многослойный плоский эпителий, состоящий из 4-х отдельных слоев: базальный, шиповидный, зернистый, роговой. Основным клеточным элементом всех слоев являются КЦ в разной степени дифференциации. Помимо КЦ в состав различных слоев эпидермиса также входят МЦ, КЛ, тактильные КМ. Базальный слой эпидермиса, расположенный на базальной мембране, разделяющей эпидермис и дерму, представлен одним рядом базофильных кубовидных или столбчатых клеток. Здесь находятся стволовые и делящиеся клетки, за счет которых происходит обновление эпидермиса. Шиповатый слой, расположенный над базальным, в тонкой коже представлен 3-4-я рядами клеток многогранной формы, в которых происходит активный синтез кератина и других белков. Часть клеток этого слоя, находящихся непосредственно рядом с базальным слоем, еще сохраняют способность к делению и формирует т.н. ростковую зону эпидермиса.

Расположенный выше шиповатого зернистый слой представлен 3-5-ю рядами клеток уплощенной формы, проходящих процесс терминальной дифференцировки. В цитоплазме клеток этого слоя уменьшается количество органелл и увеличивается количество толстых пучков кератиновых тонофибрилл, гранул Одланда и гранул кератогиалина, что обуславливает зернистую структуру клеток. (Афанасьев и др., 2018). Самый поверхностный роговой слой, в тонкой коже расположенный над зернистым, представлен 3-4-мя рядами мертвыми клетками (корнеоцитами), представляющих собой чешуйки, состоящие из кератина. Корнеоциты организованы в виде пластинчатых липидных слоев и погруженных в обогащенный неполярными липидами межклеточный матрикс. Самый внешний слой корнеоцитов постоянно сбрасывается шелушением.

Дерма структурно представлена двумя слоями: тонким верхним папиллярным (сосочковым) и толстым нижним ретикулярным (сетчатым). Прилегающий к эпидермису сосочковый слой имеет множество выступов (дермальных сосочков), залегающих между эпидермальными гребнями шиповатых клеток. Сосочковый слой образован рыхлой неоформленной соединительной тканью, состоящей из тонких волокон коллагена, ретикулярных волокон (из коллагена III типа) и эластина, между которыми расположены сосуды, нервные окончания. Клеточные элементы представлены в основном ФБ и фиброцитами, в меньшем количестве присутствуют макрофаги, тучные клетки, МЦ, лимфоциты и миоциты.

Основную часть дермы составляет ретикулярный слой, расположенный под сосочковым. Он образован плотноупакованными коллагеновыми волокнами и сетью эластических волокон, между которыми расположены лимфатические и кровеносные сосуды, рецепторы, волосяные фолликулы, сальные, потовые и апокринные железы. Клеточные элементы в этом слое дермы менее многочисленны и представлены, главным образом, ФБ (Mescher, 2018).

Забираемый биоптат толщиной 0,3-0,5 см представляет собой эпителиально-стромальный комплекс, состоящий из четырех слоев эпидермиса и двух слоев дермы. На основании этих данных можно предполагать, что забор такого биоптата потенциально позволяет получить как эпителиальные (КЦ), так и стромальные (ФБ) СК кожи, что является определяющим фактором их дальнейшего использования при создании эквивалентов кожи.

3.2 Получение клеточных культур ФБ и КЦ кожи человека

Первичные культуры ФБ и КЦ человека получали из биоптатов кожи вк ферментативным методом, состоящим из двух этапов.

На первом этапе биоптат кожи разделяли на эпидермис и дерму. Для отделения эпидермиса по линии базальной мембраны от дермы биоптаты инкубировали при +4°C в

течение ночи в растворе ферментов (диспаза II и коллагеназа I). По окончании срока инкубации механически пинцетами легко отделяли эпидермис от дермы. На втором этапе эпидермис использовали для выделения КЦ, а дерму – для выделения ФБ. Для этого эпидермис инкубировали в течение 5-7 мин при температуре 37°C в 0,25% растворе Trypsin-EDTA, а предварительно измельченную дерму в течение 30 мин в термошейкере при +37°C в 1% р-ре коллагеназы I типа. По окончании времени инкубации ферменты инактивировали добавлением 10% FBS. Полученные суспензии пропускали через сетчатый фильтр и осаждали центрифугированием в режиме 1000 об/мин в течении 7 мин. Осадок ресуспендировали в соответствующих питательных средах (Keratinocyte-SFM для КЦ и ДМЕМ/F12 для ФБ), содержащих 10 % FBS, и высевали клетки на чашках Петри диаметром 5 см². Клетки культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в газовой среде с 5% CO₂. Через сутки культивирования все не прикрепившиеся клетки удаляли при смене питательной среды. Далее первичные культуры культивировали до формирования клетками конфлюэнтного (субконфлюэнтного) монослоя, а затем проводили пассирование культур.

Результаты прижизненного наблюдения за клетками в процессе их культивирования представлены на рис. 11.

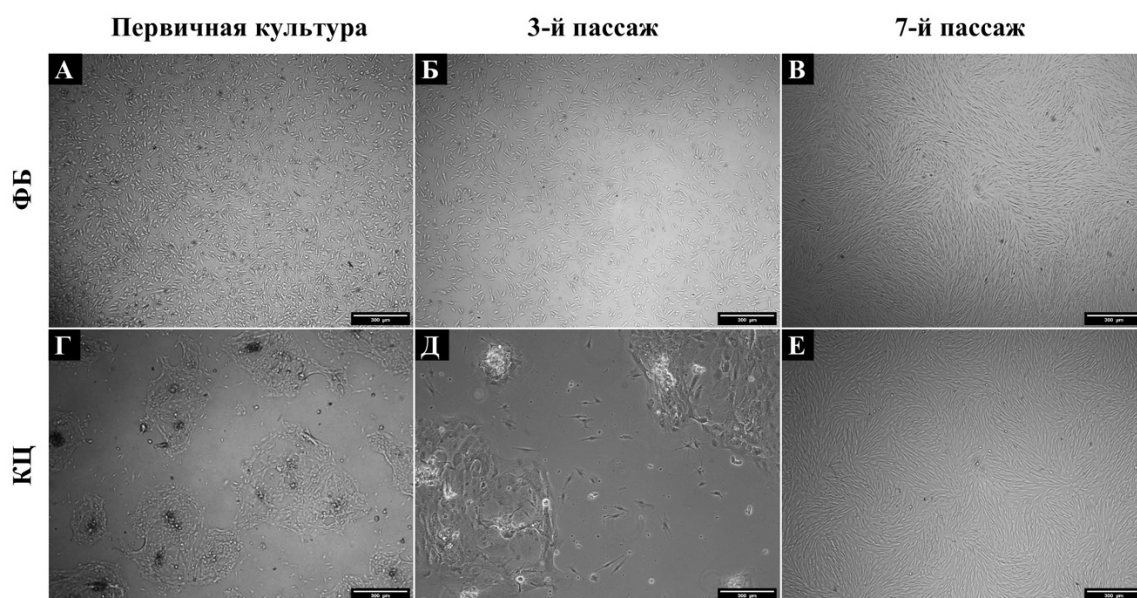


Рисунок 11. Морфология ФБ и КЦ в процессе их культивирования. Фазово-контрастная микроскопия. На рисунке под буквами А-В, МЛ: 300 µm.

Первичные культуры КЦ, полученные из эпидермиса, и ФБ, полученные из дермы, имеют различный морфологический фенотип. Кроме того, следует отметить, что большая часть клеток, выделенных из эпидермиса, не адгезирует к поверхности культуральной посуды и удаляется при первой смене питательной среды. Это связано с наличием в первичной культуре КЦ мертвых клеток рогового слоя.

КЦ на первых этапах культивирования представлены популяцией клеток двух фенотипов: эпителио-подобным и мезенхимо-подобным, с преобладанием первого. В процессе культивирования наблюдается рост и слияние эпителиальных колоний с формированием многослойного эпителиального пласта КЦ. После пассирования первичной культуры часть клеток не адгезирует к поверхности культуральной посуды и удаляется в дальнейшем при смене питательной среды. Адгезировавшие после первого пассажа клетки преимущественно являются базальными клетками, сохраняющий высокий пролиферативный потенциал и дающие начало эпителиальным колониям. В течение 3-4 пассажей число колоний значительно сокращается, фенотип клеток сменяется на мезенхимо-подобный, в результате клетки удлиняются, но сохраняется сильная адгезионная способность, из-за которой клетки сложно пассируются и, следовательно, нарастание конфлюэнтного монослоя занимает большое количество времени. Смена фенотипического профиля выделенных КЦ объясняется может быть объяснена эпителио-мезенхимальной трансформацией клеток в условиях культивирования.

ФБ на первых этапах культивирования представлены различными по форме и размерам клетками (веретеновидные и плащевидные, крупных и небольших размеров), что свидетельствует о гетерогенности природы ФБ дермальных слоев кожи. По прошествии 1-го пассажа ФБ формируют конфлюэнтный монослой, где клетки имеют длинную веретеновидную форму (мезенхимо-подобный фенотип) и ориентировочно располагаются в одном направлении, образуя завихрения.

Методы выделения ФБ и КЦ кожи и полученные нами данные о составе первичных культур клеток кожи и их динамике в культуре соотносятся с протоколами иностранных исследователей (Henrot et al., 2020; Wang et al., 2012).

3.3 Оценка пролиферативной активности ФБ и КЦ на основании данных по способности к колониобразованию и индексу пролиферации

Оценку пролиферативной активности ФБ и КЦ проводили, анализируя эффективность колониобразования и кривые роста с вычислением среднего времени удвоения клеточных популяций.

Полученные нами данные свидетельствуют о более высокой эффективности колониобразования у ФБ по сравнению с КЦ: для КЦ она составила $52,06 \pm 2,12\%$, а для ФБ – $60 \pm 1,76\%$.

Анализ кривых роста показал, что для обеих культур время активной фазы составило 120 ч с средним временем удвоения для КЦ – $64,07 \pm 1,03$ ч, для ФБ – $39,18 \pm 0,27$ ч (рис. 12).

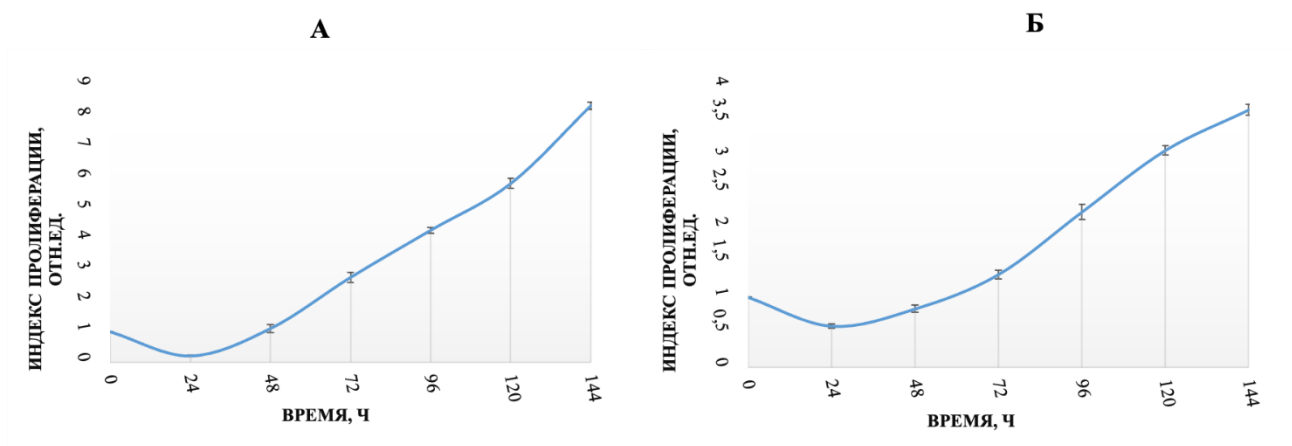


Рисунок 12. Оценка пролиферативной активности ФБ и КЦ. На графиках представлены кривые роста ФБ (А) и КЦ (Б).

Данные пролиферативной активности обеих полученных линий являются нормальными и соотносятся с данными, приведенными в других исследованиях (Зорин и др., 2009; Крылова и др., 2016).

3.4 Репликативное клеточное старение ФБ и КЦ

На более поздних пассажах клетки обеих культур претерпевают морфологические изменения (вытянутая форма, крупные ядра, снижена плотность монослоя). Окрашенные галактозидазой клетки в обеих культурах свидетельствуют об их репликативном старении, ФБ и КЦ были окрашены на 25 и 20 пассажах соответственно.

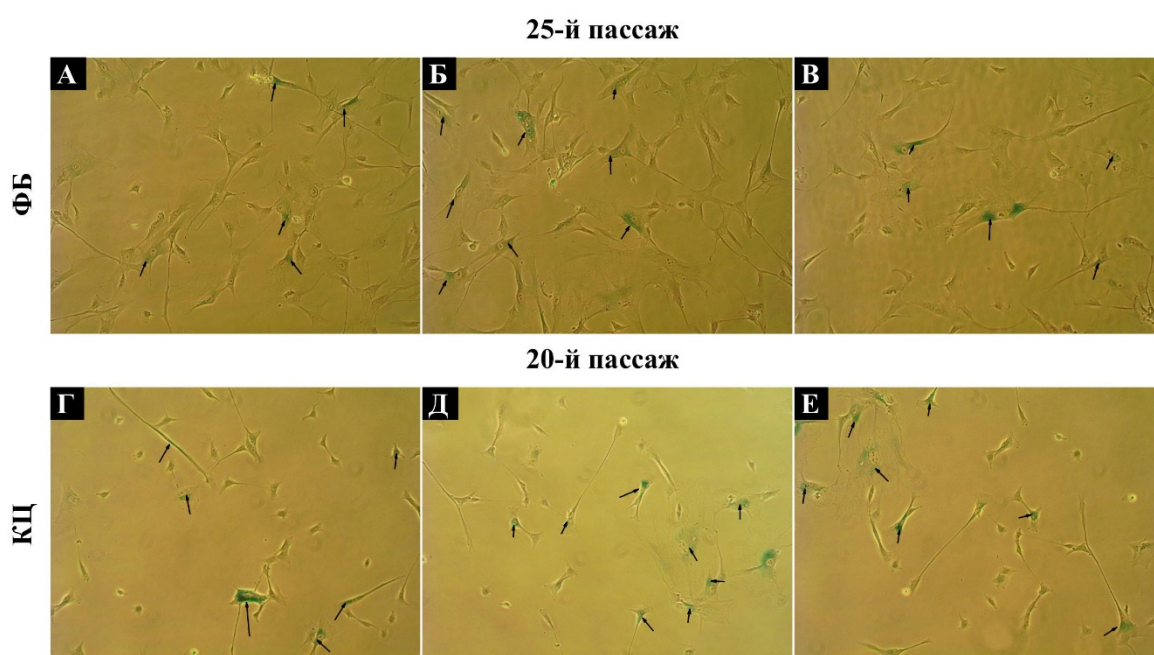


Рисунок 13. Окраска ФБ и КЦ на активность β -галактозидазы. Стрелками указаны окрашенные участки. МЛ: 200 мкм.

Как можно видеть на рис.13, клетки в обеих культурах окрашены не все, следовательно, можно предположить о начальной стадии клеточного старения, что не противоречит литературным источникам (Крылова и др., 2016; Воронкина и др., 2020).

3.5 Цитогенетический анализ полученных линий ФБ кожи человека

Одним из самых важных показателей при оценке потенциальной возможности использования клеточных линий в качестве компонента разрабатываемых ЭК является их безопасность (Рачинская и Меркулов, 2018). Для выявления признаков генетической нестабильности полученных нами линий ФБ кожи человека применяли стандартный GTG-метод дифференциального окрашивания хромосом на G-диски (Ozkinay & Mitelman, 1979). Анализируемые ФБ человека являлись нормальными не иммортализованными клетками. В целях выявления влияния сроков культивирования клеток на стабильность кариотипа мы исследовали три полученные нами линии ФБ на 3-ем и 7-ом пассажах до их криоконсервации. В целях выявления влияния процесса криоконсервации на стабильность кариотипа одна из этих линий дополнительно была проанализирована после криоконсервации на 7-ом суммарном и 15-ом суммарном пассажах.

Кариотипирование первой линии ФБ кожи человека. Полученные кариотипы ФБ кожи человека первой линии до криоконсервации приведены на рис. 14, после консервации – на рис. 15.

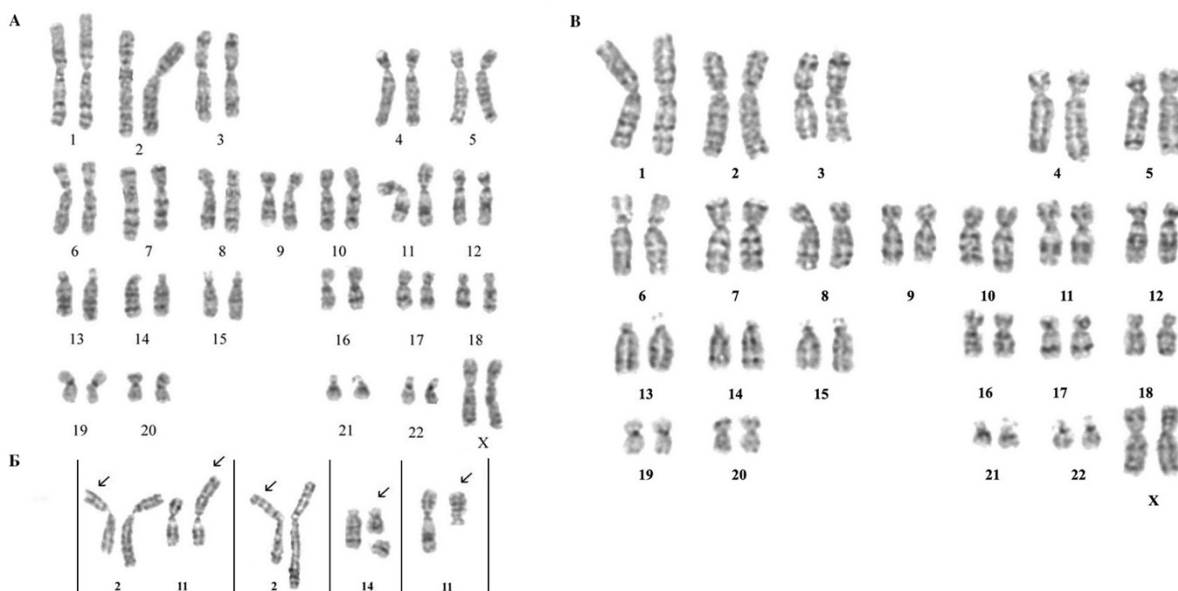


Рисунок 14. Кариотип первой линии ФБ кожи человека до криоконсервации. А – нормальный кариотип клетки 46,XX, первой линии ФБ, 3-й пассаж. Б – структурно перестроенные хромосомы из четырех разных клеток. В первой клетке делеция длинного плеча хромосомы 2 – del(2)(q33:) и добавочный хромосомный материал на коротком плече

хромосомы 11 – add(11)(p15.4); во второй клетке клональная перестройка хромосом – делеция длинного плеча хромосомы 2 – del(2)(q33:); в третьей клетке хромосомный разрыв длинного плеча хромосомы 14 – chrb(14)(q22:) и двойной фрагмент из материала хромосомы 14; в четвертой клетке делеция длинного плеча хромосомы 11 – del(11)(q11~12:). В – нормальный кариотип 46,XX, 7-й пассаж. На кариограмме представлены перестроенные хромосомы из клеток с хорошей морфологией хромосом и чётким рисунком G-дисков. Стрелки указывают на перестроенные хромосомы; add – добавочный хромосомный материал, chrb – хромосомный разрыв, del – делеция, t – транслокация, p – короткое плечо хромосомы, q – длинное плечо хромосомы, знак ~ означает, что локус точно указать невозможно; дифференциальное G-окрашивание хромосом.

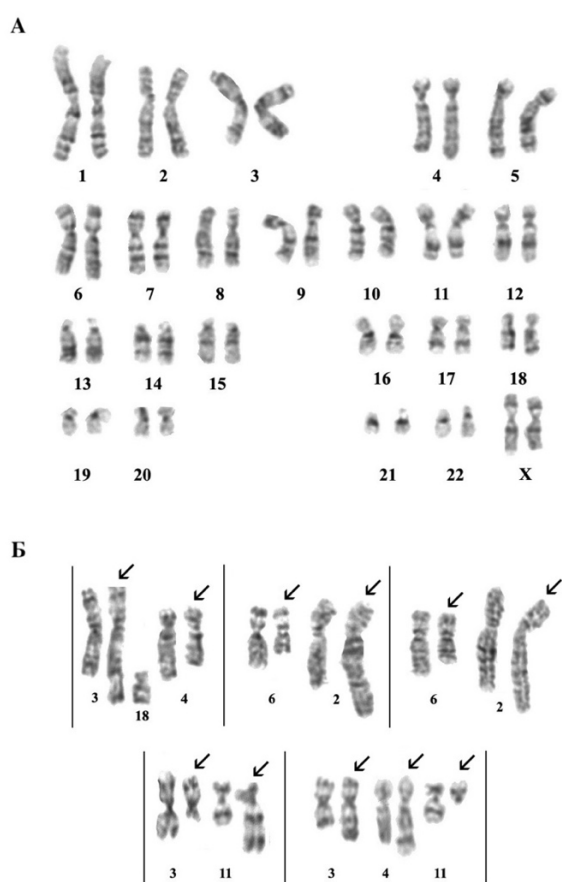


Рисунок 15. Кариотип первой линии ФБ кожи человека после криоконсервации. А – нормальный кариотип клетки 46,XX, первой линии ФБ, 15-й пассаж, суммарный от начала культивирования. Б – структурно перестроенные хромосомы из пяти разных клеток. В первой клетке делеция длинного плеча хромосомы 4 – del(4)(q31:) и транслокация длинного плеча хромосомы 18 на хромосому 3 – t(3;18)(q27;q11); во второй и в третьей клетке – клональные перестройки: делеция длинного плеча хромосомы 6 – del(6)(q23:) и транслокация длинного плеча хромосомы 6 на хромосому 2 – t(2;6)(q37;q23); в четвертой клетке делеция длинного плеча хромосомы 3 – del(3)(q21:) и транслокация длинного плеча хромосомы 3 на хромосому

11 – t(3;11)(q21;q23); в пятой клетке делеция длинного плеча хромосомы 11 – del(13)(q13:), транслокация длинного плеча хромосомы 4 на хромосому 3 – t(3;4)(q25~26.2;q27~31) и транслокация длинного плеча хромосомы 11 на хромосому 4 – t(4;11)(q27~31;q13). На кариограмме представлены перестроенные хромосомы из клеток с хорошей морфологией хромосом и чётким рисунком G-дисков. Расшифровка обозначений такая же, как на рис. 14.

Для определения числа хромосом ФБ кожи человека первой линии на 3-ем пассаже до криоконсервации анализировали 75 метафазных пластинок, а на 8-ом пассаже до криоконсервации – 80 метафазных пластинок. Анализ числа хромосом первой выделенной линии ФБ человека показал нормальное число хромосом равное 46, как на 3-ем, так и на 8-м пассажах до криоконсервации. Для анализа СПХ кариотипировали по 30 метафазных пластинок на этих пассажах.

Кариотип клеток первой линии ФБ на 3-ем пассаже был нормальным 46,XX, за исключением четырёх отдельных клеток со СПХ. В первой клетке делеция терминального района длинного плеча хромосомы 2 – del(2)(q35:) и добавочный хромосомный материал на коротком плече хромосомы 11 – add(11)(p15.4:); во второй клетке клональная перестройка хромосом – делеция длинного плеча хромосомы 2 – del(2)(q33:); в третьей клетке хромосомный разрыв в длинном плече хромосомы 14 – del(14)(q22:) и двойной фрагмент из материала хромосомы 14; в четвертой клетке делеция длинного плеча хромосомы 11 – del(11)(q11~12:). Доля клеток со СПХ составила 5,3%.

Кариотип клеток первой линии ФБ на 7-ом пассаже был нормальным 46, XX, за исключением двух отдельных клеток со СПХ. В первой клетке хроматидный разрыв в хромосоме 13 – chtb(13), во второй клетке хроматидный разрыв в хромосоме 17 – chtb(17). Доля клеток со СПХ составила 2,5%.

Клональные численные СПХ, выявленные в этой линии ФБ человека на 3-ем пассаже, на 7-ом пассаже отсутствуют.

Для определения числа хромосом ФБ кожи человека первой линии после криоконсервации на суммарно 7-ом пассаже анализировали 75 метафазных пластинок, а на суммарно 15-ом пассаже – 70 метафазных пластинок. Анализ кариотипа показал нормальное число хромосом равное 46, как на 7-ом, так и на 15-ом пассажах. Для анализа СПХ кариотипировали по 30 метафазных пластинок на этих пассажах.

Кариотип клеток первой линии после криоконсервации на суммарно 7-ом пассаже был нормальным 46,XX, за исключением двух отдельных клеток со СПХ. В первой клетке делеция длинного плеча хромосомы 4 – del(4)(q12:) и делеция длинного плеча хромосомы 2 – del(2)(q12:); во второй клетке делеция длинного плеча хромосомы 10 – del(10)(q22:). Доля клеток со СПХ составила 2,5%.

Кариотип клеток первой линии после криоконсервации на суммарно 15-ом пассаже был нормальным 46,XX, за исключением пяти отдельных клеток со СПХ. В первой клетке делеция длинного плеча хромосомы 4 – $\text{del}(4)(\text{q}31:)$ и транслокация длинного плеча хромосомы 18 на хромосому 3 – $\text{t}(3;18)(\text{q}27;\text{q}11)$; во второй клетке – клональные перестройки: делеция длинного плеча хромосомы 6 – $\text{del}(6)(\text{q}23:)$ и транслокация длинного плеча хромосомы 6 на хромосому 2 – $\text{t}(2;6)(\text{q}37;\text{q}23)$; в третьей клетке делеция длинного плеча хромосомы 3 – $\text{del}(3)(\text{q}21:)$ и транслокация длинного плеча хромосомы 3 на хромосому 11 – $\text{t}(3;11)(\text{q}21;\text{q}23)$; в четвертой клетке делеция короткого плеча хромосомы 20 – $\text{del}(20)(\text{p}11.2:)$, делеция длинного плеча хромосомы 6 – $\text{del}(6)(\text{q}23:)$, транслокация длинного плеча хромосомы 6 на хромосому 2 – $\text{t}(2;6)(\text{q}37;\text{q}23)$; в пятой клетке делеция длинного плеча хромосомы 11 – $\text{del}(11)(\text{q}11:)$, транслокация длинного плеча хромосомы 4 на хромосому 3 – $\text{t}(3;4)(\text{q}25;\text{q}27)$ и транслокация длинного плеча хромосомы 11 на хромосому 4 – $\text{t}(4;11)(\text{q}27;\text{q}13)$. Доля клеток со СПХ составила 7,1%.

Клональные СПХ, в данной клеточной линии после криоконсервации отсутствуют на суммарно 7-ом пассаже, но появляются на суммарно 15-ом пассаже.

Кариотипирование второй линии ФБ кожи человека. Полученные кариотипы ФБ кожи человека второй линии до криоконсервации приведены на рис. 13.

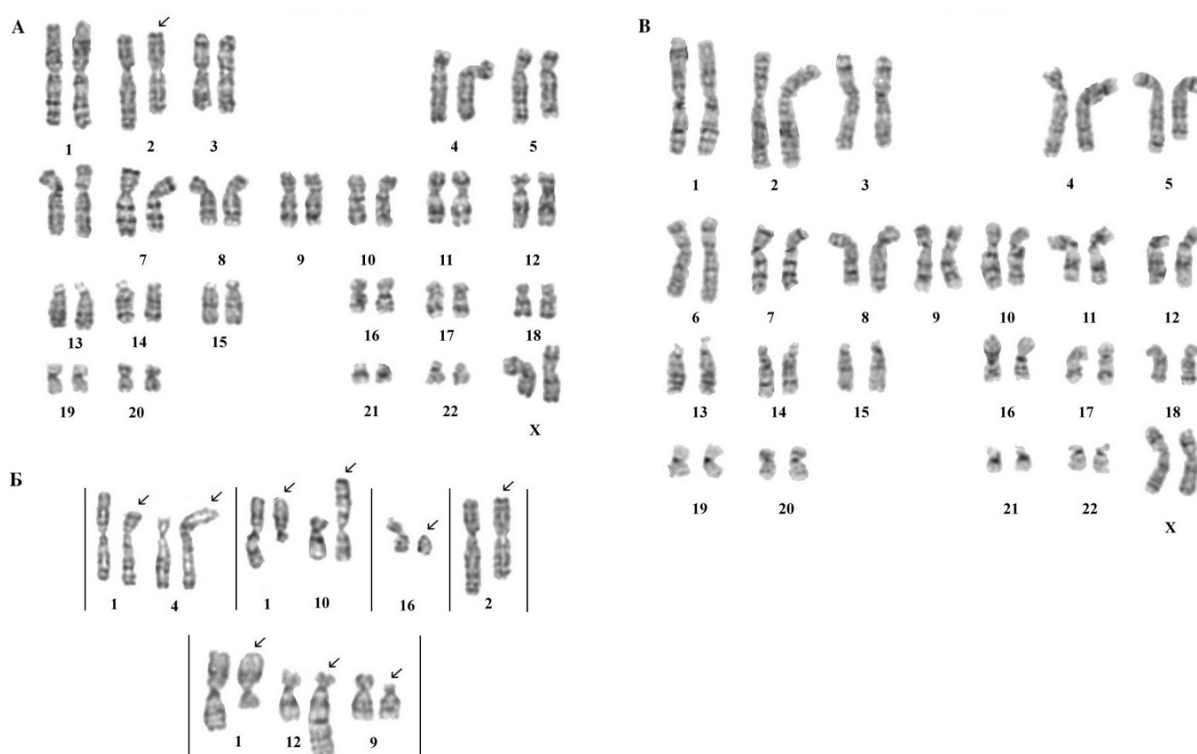


Рисунок 16. Кариотип второй линии ФБ кожи человека до криоконсервации. А – кариотип клетки с делецией хромосомы 2 – 46,XX,del(2)(q33:), 3-ий пассаж. Б – структурно перестроенные хромосомы из пяти разных клеток. В первой клетке: делеция короткого плеча

хромосомы 1 – del(1)(p32:) и транслокация длинного плеча хромосомы 1 на хромосому 4 – t(1;4)(p32;p16); во второй клетке: делеция длинного плеча хромосомы 1 – del(1)(q21:) и транслокация длинного плеча хромосомы 1 на хромосому 10 – t(1;10)(q21;p13); в третьей клетке: делеция короткого плеча хромосомы 16 – del(16)(p10:); в четвертой клетке: делеция длинного плеча хромосомы 2 – del(2)(q33:); в пятой клетке: делеции длинного плеча хромосомы 1 – del(1)(q11~12:) и короткого плеча хромосомы 9 – del(9)(p13:); транслокация длинного плеча хромосомы 1 на хромосому 12 – t(1;12)(q11~12;q24). В – нормальный кариотип 46,XX, 7-ой пассаж. На кариограмме представлены перестроенные хромосомы из клеток с хорошей морфологией хромосом и чётким рисунком G-дисков. Расшифровка обозначений такая же, как на рис. 14.

Для определения числа хромосом ФБ кожи человека второй линии на 3-ем пассаже до криоконсервации анализировали 90 метафазных пластинок, а на 7-ом пассаже до криоконсервации – 75 метафазных пластинок. Анализ кариотипа показал нормальное число хромосом равное 46, как на 3-ем, так и на 7-ом пассажах. Для анализа структурных перестроек хромосом на этих пассажах кариотипировали по 30 метафазных пластинок.

Кариотип клеток второй линии ФБ на 3-ем пассаже до криоконсервации был нормальным 46,XX, за исключением десяти отдельных клеток со СПХ. В первой клетке делеция короткого плеча хромосомы 16 – del(16)(p11.26:); во второй клетке делеция длинного плеча хромосомы 2 – del(2)(q33:); в третьей клетке делеция длинного плеча хромосомы 11 – del(11)(q22:); в четвертой клетке делеция длинного плеча хромосомы 5 – del(5)(q15:); в пятой клетке делеция короткого плеча хромосомы 1 – del(1)(p32:) и транслокация длинного плеча хромосомы 1 на хромосому 4 – t(1;4)(p32;p16); в шестой клетке делеция длинного плеча хромосомы 1 – del(1)(q21:) и транслокация длинного плеча хромосомы 1 на хромосому 10 – t(1;10)(q21;p13); в седьмой клетке делеция длинного плеча хромосомы 22 – del(22)(q11:) (и двойной фрагмент в виде части этой хромосомы) и хроматидный разрыв в хромосоме 7 – chtb(7); в восьмой клетке делеция длинного плеча хромосомы 1 – del(1)(q11:), делеция короткого плеча хромосомы 9 – del(9)(p13:) и транслокация длинного плеча хромосомы 1 на хромосому 12 – t(1;12)(q11~12;q24); в девятой клетке транслокация между хромосомами 1 и 2 – t(1;2)(q42;p13), делеция короткого плеча хромосомы 2 – del(2)(p13:), делеция короткого плеча хромосомы 11 – del(11)(p11.2:) и транслокация между хромосомами 11 и 14 – (11;14)(p11.2;p11.2); в десятой клетке добавочный хромосомный материал к короткому плечу хромосомы 17 – add(17)(p11~12:), делеция длинного плеча хромосомы 22 – del(22)(q11:) и перестроенная хромосома 15 – rea(15) и перестроенная не идентифицированная хромосома. Доля клеток со СПХ составила 11,1%.

Кариотип клеток второй линии ФБ на 7-ом пассаже являлся нормальным 46,XX, за исключением двух отдельных клеток со СПХ. В первой клетке хроматидный разрыв хромосомы 4 – chtb(4); во второй клетке хроматидный разрыв в хромосоме 7 – chtb(7). Доля клеток со СПХ составила 2,5%.

Клональные численные СПХ, в этой линии ФБ кожи человека на 3-ем и 7-ом пассажах до криоконсервации отсутствуют.

Кариотипирование третьей линии ФБ человека. Полученные кариотипы ФБ кожи человека третьей линии до криоконсервации приведены на рис. 17.

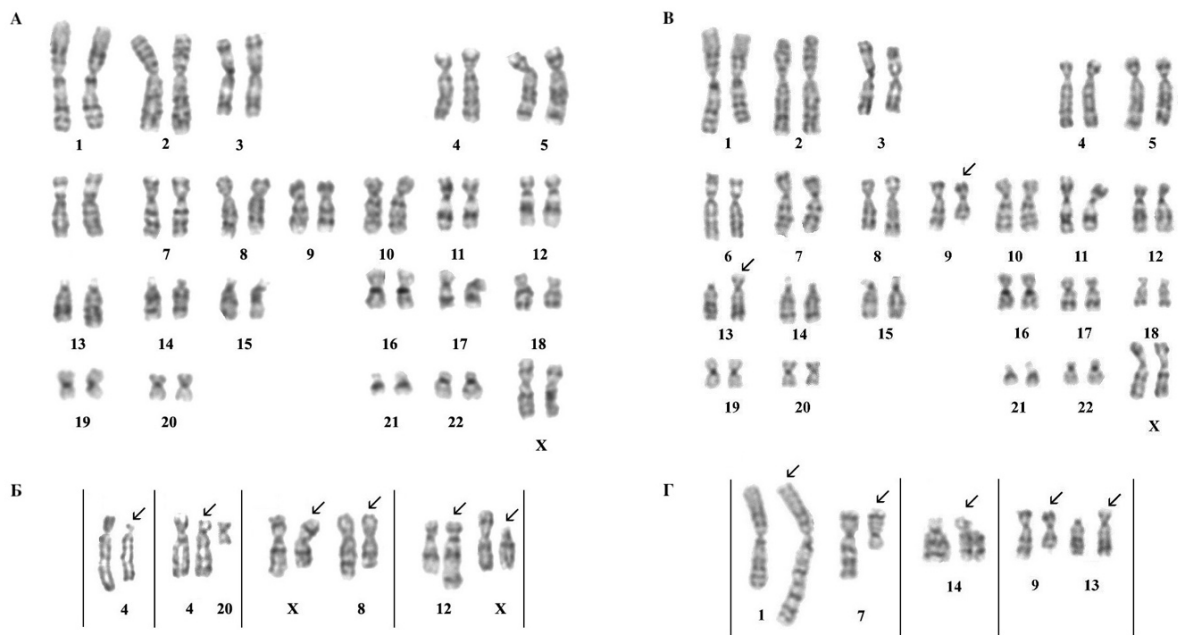


Рисунок 17. Кариотип третьей линии ФБ кожи человека до криоконсервации. А – нормальный кариотип 46,XX, 3-й пассаж. Б – структурно перестроенные хромосомы из четырёх разных клеток. В первой клетке делеция короткого плеча хромосомы 4 – del(4)(p14~15:); во второй клетке: транслокация длинного плеча хромосомы 20 на хромосому 4 – t(4;20)(q21;q13); в третьей клетке: делеция длинного плеча хромосомы X – del(X)(q26:) и интерстициальная делеция в длинном плече хромосомы 8 – del(8)(q13q22:); в четвертой клетке: делеция хромосомы X – del(X)(p11:) и транслокация короткого плеча хромосомы X на хромосому 12 – t(X;12)(p11;q24). В – кариотип клетки с двумя хромосомными перестройками 46,XX,del(9)(q31~32:), t(9;13)(q31~32;p12), 7-й пассаж. Г – структурно перестроенные хромосомы из трех разных клеток. В первой клетке транслокация длинного плеча хромосомы 7 на хромосому 1 – t(1;7)(q42;q11.2) и делеция длинного плеча хромосомы 7 – del(7)(q11.2:); во второй клетке хроматидный разрыв в коротком плече хромосомы 14 – chtb(14)(p12:); в третьей клетке делеция длинного плеча хромосомы 9 – del(9)(q31~32:), транслокация короткого длинного плеча хромосомы 9 на хромосому 13 – t(9;13)(q31~32;p12); На

кариограмме представлены перестроенные хромосомы из клеток с хорошей морфологией хромосом и чётким рисунком G-дисков. Расшифровка обозначений такие же как на рис. 14.

Для определения числа хромосом ФБ кожи человека третьей линии на 3-ем пассаже до криоконсервации анализировали 80 метафазных пластинок, а на 7-ом пассаже до криоконсервации – 85 метафазных пластинок. Анализ кариотипа показал нормальное число хромосом равное 46, как на 3-ем, так и на 7-ом пассажах. Для анализа СПХ кариотипировали 30 метафазных пластинок на 3-ем пассаже и 20 метафазных пластинок на 7-ом пассаже.

Кариотип клеток третьей линии ФБ на 3-ем пассаже до криоконсервации был нормальным 46,XX, за исключением пяти отдельных клеток со СПХ. В первой клетке транслокация длинного плеча хромосомы 20 на хромосому 4 – t(4;20)(q21;q13), во второй клетке делеция короткого плеча хромосомы 4 – del(4)(p~15:), в третьей клетке делеция короткого плеча хромосомы X – del(X)(p11:) и транслокация короткого плеча хромосомы X на хромосому 12 – t(X;12)(p11;q~24.3); в четвертой клетке делеция короткого плеча хромосомы X – del(X)(q26:) и делеция длинного плеча хромосомы 8 – del(8)(q13q22:), в пятой клетке делеция длинного плеча хромосомы 20 – del(20)(q11:). Доля клеток со СПХ составила 6,3%.

Кариотип клеток третьей линии ФБ на 7-ом пассаже до криоконсервации являлся нормальным 46, XX, за исключением трёх отдельных клеток со СПХ. В первой клетке транслокация длинного плеча хромосомы 7 на хромосому 1 – t(1;7)(q42;q11.2) и делеция длинного плеча хромосомы 7 – del(7)(q11.2:); во второй клетке делеция длинного плеча хромосомы 9 – del(9)(q~31:), транслокация короткого длинного плеча хромосомы 9 на хромосому 13 – t(9;13)(q~31;p12); в третьей клетке хроматидный разрыв в коротком плече хромосомы 14 – chtb(14)(p12:). Доля клеток со СПХ составила 3,5%.

Клональные численные СПХ, в этой линии ФБ кожи человека на 3-ем и 7-ом пассажах до криоконсервации отсутствуют.

Исходя из полученных нами данных (табл. 4), можно сделать вывод о том, что кариотипы клеток, полученных нами линий ФБ кожи человека, имеют нормальное диплоидное число хромосом и не содержат численных ПХ.

Таблица 4. Результаты цитогенетического анализа линий ФБ

Линии ФБ кожи человека	Пассажи	Кол-во клеток		Кол-во хромосомных перестроек		
		всего	с СПХ	всего	неклональные	клональные
Первая до криоконсервации	3	75	5,3%	5	4	1
	7	80	2,5%	2	2	–
Первая	7	75	2,5%	2	2	–

после криоконсервации	15	70	7,1%	11	9	2
Вторая до криоконсервации	3	90	11,1%	20	20	–
	7	75	2,5%	2	2	–
Третья до криоконсервации	3	80	6,3%	8	8	–
	7	85	3,5%	5	5	–

Анализ СПХ ФБ трёх линий показал, что кариотипы этих линий отличаются друг от друга на 3-ем пассаже, где в первой линии выявили 4 СПХ, из которых 3 неклональные и 1 клональная, во второй линии выявили 20 СПХ, которые являются неклональными, в третьей линии выявили 8 СПХ которые являются неклональными. Различие кариотипов трех полученных нами линий ФБ кожи человека по количеству СПХ скорее всего связано с индивидуальными особенностями геномов этих клеток. Анализ кариотипов ФБ на более позднем 7-ом пассаже, выявил в первой культуре 2 неклональные СПХ, во второй культуре 2 неклональные СПХ, в третьей культуре 5 неклональных СПХ. В клетках трёх линий наблюдалось нормальное число хромосом, численные перестройки хромосом отсутствовали. В кариотипе клеток второй линии на 7-ом пассаже выявлено уменьшение количества СПХ, такое сокращение хромосомных перестроек в клетках этой линии ФБ, возможно, связано с осуществлением физиологической гибели клеток (апоптозом). Анализ кариотипов ФБ первой линии после криоконсервации суммарно на 7-ом и 15-ом пассажах, выявил на 7-ом пассаже 2 неклональные СПХ и на 15-ом пассаже 9 неклональных и 2 клональные СПХ. Накопление клональных хромосомных перестроек на 15-ом пассаже, возможно связано с длительным культивированием и старением клеток (претерпели 9 пассажей), что подтверждается литературными источниками (Ben-David et al., 2011; Rebuzzini et al., 2015; Ярцева и Федорцева., 2014).

Тем не менее, для того, чтобы сделать окончательные выводы относительно стабильности кариотипа ФБ кожи человека *in vitro* необходим анализ кариотипа ФБ кожи большего числа доноров различного возраста. Линии клеток с генетической стабильностью могут быть использованы для трансплантации в составе ТБП. Применение в медицинских целях клеток с выявленной генетической нестабильностью невозможно, однако они могут использоваться для фундаментальных исследований.

3.6 Маркерный профиль выделенных культур ФБ и КЦ

Исследование маркерного профиля ФБ и КЦ кожи производили при помощи иммуноцитохимического окрашивания на экспрессию различных маркеров: стволовых

маркеров (ABCВ5 и p63 α); эпителиальных маркеров, отвечающих за дифференцировку и стратификацию многослойных эпителиев (14-3-3 σ , E-кадгерин, α 9 β 1-интегрин, ламинин, кератины (K5/14, K15, K19)); мезенхимальных маркеров (виментин, N-кадгерин)

Таблица 5. Характеристика маркеров, участвующих в иммуноцитохимическом окрашивании.

Маркер	Специфика
K5	Данная пара белков, интенсивно экспрессируется в недифференцированном базальном слое, содержащем СК
K14	
K15	белок, являющийся специфическим компонентом базальных КЦ многослойного плоского эпителия, кроме того, может применяться в качестве маркера СК эпидермиса
E-кадгерин	белок клеточной адгезии, характерный для всех эпителиальных клеток
N-кадгерин	белок, экспрессируется в клетках мезенхимального происхождения
Ламинин	один из наиболее распространенных белков, присутствует в базальных мембранах
Виментин	белок цитоскелета, характерный для клеток мезенхимального происхождения
p63 α	белок, отвечающий за пролиферацию и дифференцировку КЦ. Более высокий уровень белка обнаружен в более пролиферативных клетках, таких как голоклоны, которые являются эпидермальными СК
ABCВ5	является маркером СК за счет поддержания прогениторного потенциала клетки с помощью транспорта регуляторных молекул, необходимых для пролиферации, дифференцировки и апоптоза
14-3-3 σ	белок, регулирующий дифференцировку и стратификацию многослойных эпителиев
α 9 β 1-интегрин	белок, экспрессируется в базальных КЦ, в супрабазальных слоях его экспрессия снижена

В качестве негативного контроля проводили иммуноцитохимическое окрашивание только вторичными антителами. Неспецифического связывания вторичных антител не было обнаружено.

Для ФБ исследования маркерного профиля проводили на клетках 7-го пассажа, а для КЦ – на клетках первичной культуры и клетках 7-го пассажа. Результаты исследования приведены на рис. 18-20.

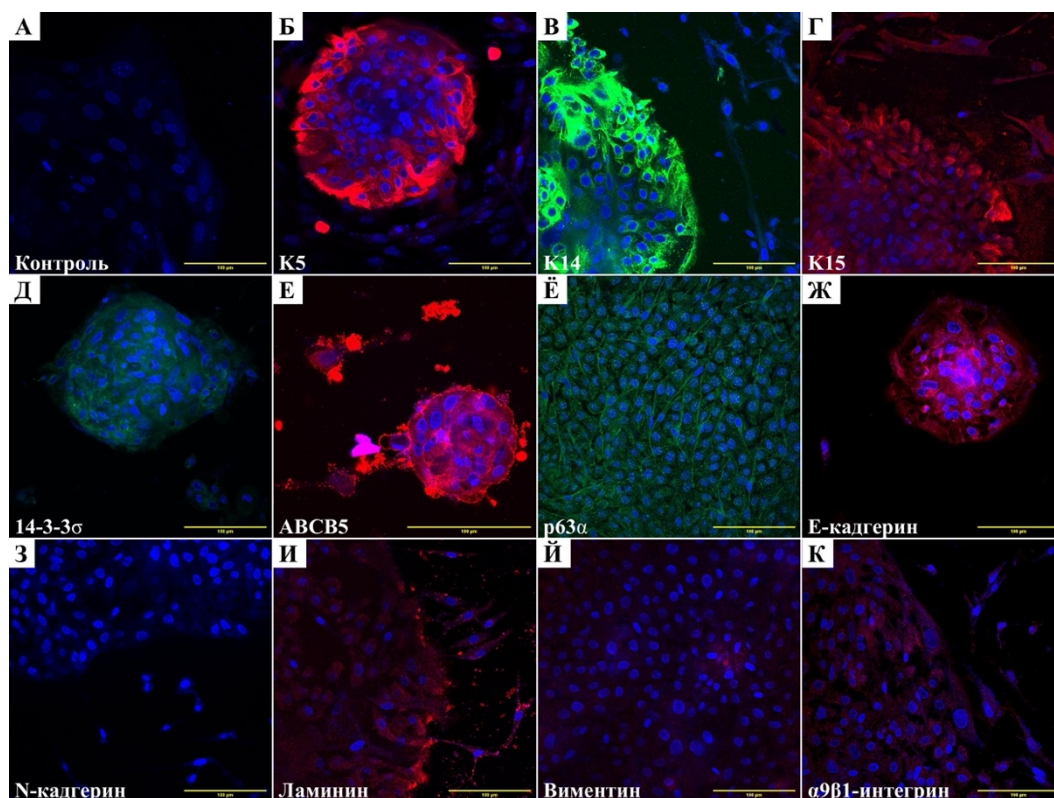


Рисунок 18. Результаты исследования экспрессии маркеров у первичной культуры КЦ.

МЛ: 100 μm.

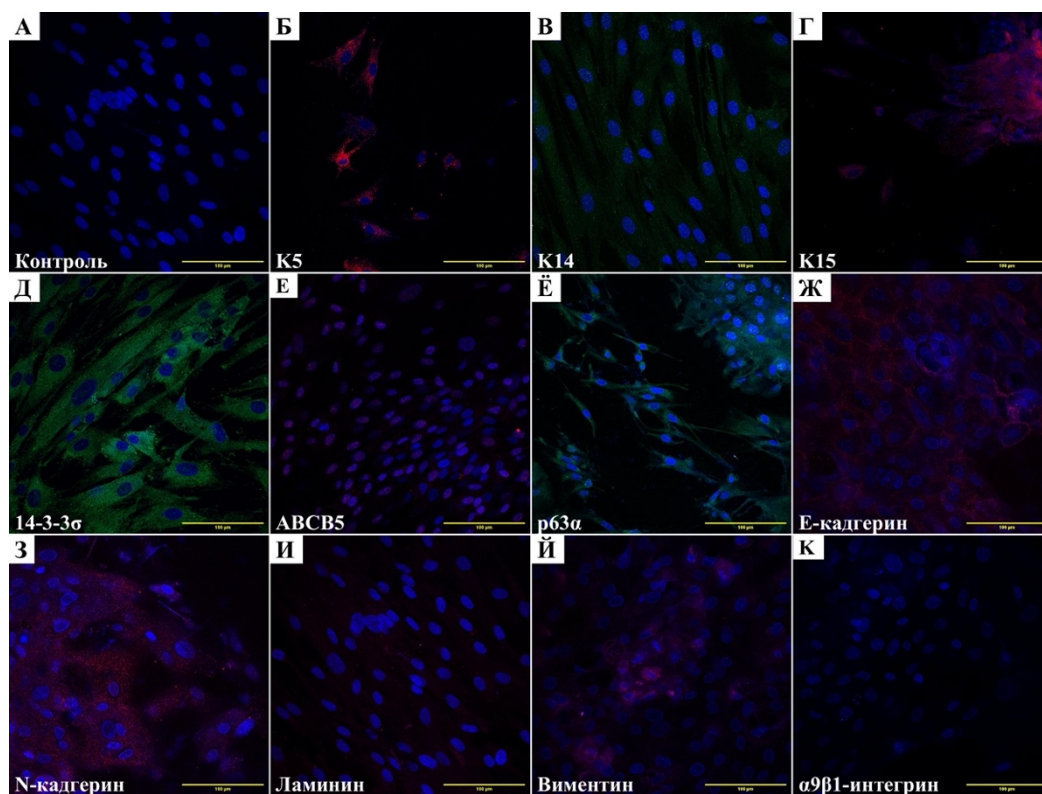


Рисунок 19. Результаты исследования экспрессии маркеров у КЦ 7-го пассажа. МЛ: 100 μ m.

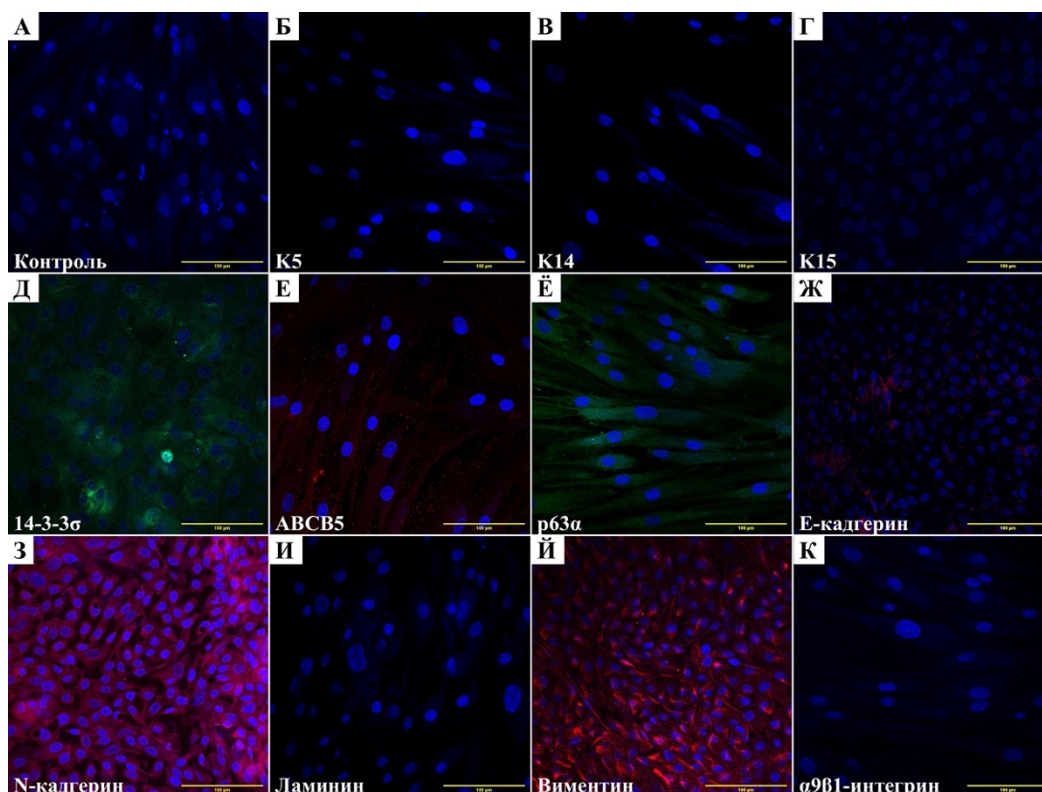


Рисунок 20. Результаты исследования экспрессии маркеров у ФБ 7-го пассажа. МЛ: 100 μ m.

Полученные данные иммуноцитохимического окрашивания подтверждают гетерогенную природу первичной культуры КЦ, для которых характерна одновременная экспрессия эпидермальных (K5, K14, K15 и E-кадгерин) и мезенхимальных маркеров (виментин). Кроме того, обнаружена экспрессия маркеров, считающихся характерными для многослойного эпителия α 9 β 1, 14-3-3 σ , ламинин. Отсутствовала экспрессия мезенхимального маркера N-кадгерина. В первичной культуре КЦ присутствуют СК базального слоя, что показано за счет экспрессии маркеров ABC5 и p63 α .

КЦ 7-го пассажа претерпевшие морфологические изменения сохранили экспрессию кератинов K5, K14, K15, однако она снижена и присутствует в незначительном количестве клеток. Кроме того, экспрессия α 9 β 1-интегрин не была обнаружена, это можно объяснить, функцией данного белка, участие в процессе ранозаживления, чем и объясняется его активность в первичной культуре КЦ и отсутствие на 7-ом пассаже. Как уже было сказано выше (параграф 3.2), КЦ при длительном культивировании приобретают мезенхимоподобный фенотип, что подтверждается незначительной экспрессией виментина и N-кадгерина и снижением экспрессии E-кадгерина. На основании этих изменения можно предположить, что КЦ в ходе культивирования *in vitro* претерпевают эпителиально-

мезенхимальный переход. По сравнению с первичной культурой снижается экспрессия стволовых маркеров ABCB5 и р63 α и маркеров многослойных эпителиев 14-3-3 σ , α 9 β 1-интегрин, ламинина.

ФБ 7-го пассажа экспрессируют характерные маркеры мезенхимальной природы N-кадгерина и виментина. Отсутствие эпителиальных маркеров K5, K14, K15, кроме того, отсутствовала экспрессия α 9 β 1-интегрин, ламинина. Выявлена небольшая экспрессия 14-3-3 σ , единичные клетки с активностью N-кадгерина и маркеры СК ABCB5 и р63 α .

На основании полученных нами данных можно сделать вывод, что ФБ и КЦ кожи человека имеют в своем составе СК, т.к. экспрессируют общепринятые маркеры, характерные для СК. Первичная культура КЦ является гетерогенной, исходя из одновременно высокой активности эпителиальных и мезенхимальных маркеров. КЦ 7-го пассажа по сравнению с первичной культурой теряют активность эпителиальных маркеров, замещая их мезенхимальными, что делает их схожими с ФБ 7-го пассажа. Мы предполагаем, что КЦ 7-го пассажа в условиях культивирования *in vitro* подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу, что расширяет возможности их использования в области регенеративной медицины при создании ТБП.

Полученные данные в ходе исследования маркерного профиля выделенных клеток соответствует литературным источникам (Юнусбаева и др., 2015; Аксененко и Рукша, 2014; Ter Horst et al., 2018; Soares & Zhou., 2018; Frank et al., 2003; Lynch & Watt., 2018).

3.7 Моделирование мезенхимально-эпителиального перехода КЦ *in vitro*

КЦ в процессе культивирования приобретают мезенхимо-подобный фенотип, что, по-видимому, связано с эпителиально-мезенхимальным переходом, но сохраняют способность к образованию пласта клеток эпителиального фенотипа, что подтверждается индуцированием эпителиальной дифференцировки в условиях среда-воздух на вставках для культуральных планшетов. (параграф 2.9) и последующим иммуноцитохимическим окрашиванием КЦ (параграф 2.7) на экспрессию K5, K14, K15 и 14-3-3 σ . При помощи ЛСКМ Olympus FLUOVIEW FV3000 (Life Science, Япония) были произведены серии оптических срезов, полученных с одинаковым интервалом по оси z, которые позволили реконструировать объемное 3D изображение.

Полученные данные свидетельствуют, что при культивировании в условиях среда-воздух КЦ, обладающие мезенхимально-подобным фенотипом, претерпевают мезенхимально-эпителиальный переход и формируют эпителиальный пласт (рис. 21).

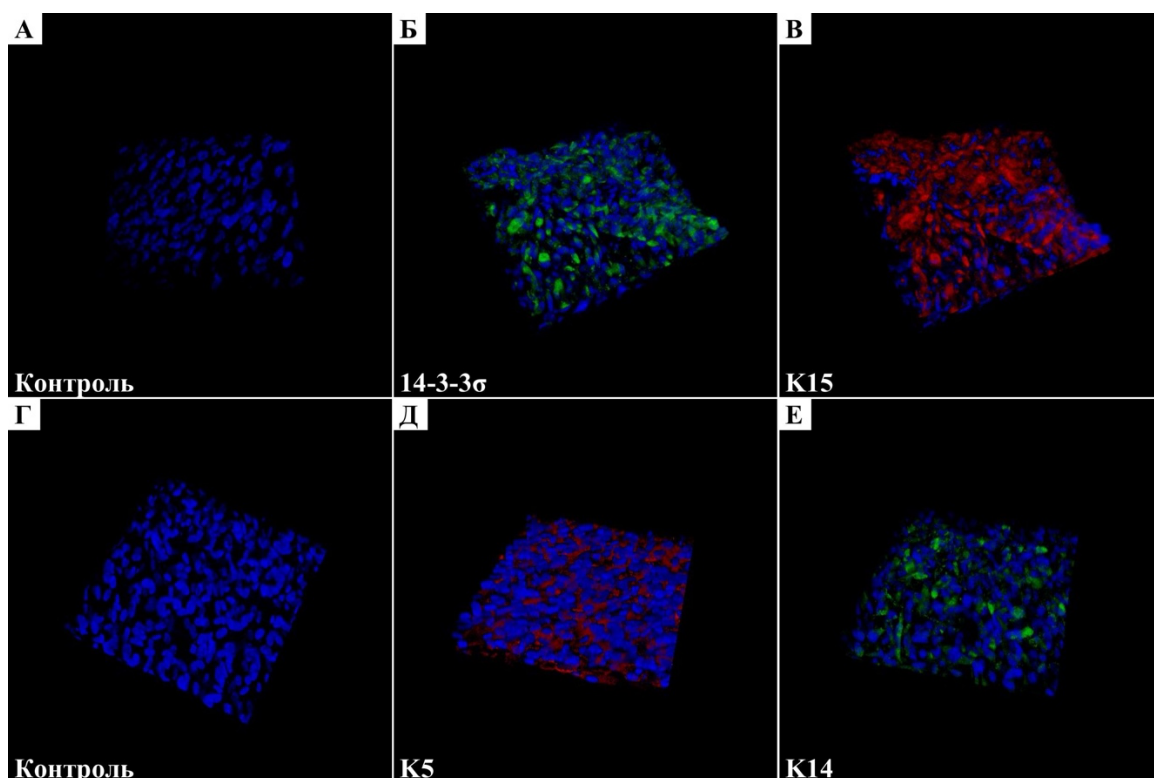


Рисунок 21. Экспрессия эпителиальных маркеров у КЦ. Культивирование КЦ на культуральных вставках совместно с ФБ. А, Г – контроль, Б – экспрессия 14-3-3σ, В – экспрессия К15, Д – экспрессия К5, Е – экспрессия К14.

Как можно видеть на приведенных photographs, интенсивность экспрессии белков схожа с исследованной экспрессией этих маркеров у КЦ первичной культуры эпителио-подобного фенотипа, формирующих многослойный эпителиальный пласт. Следовательно, можно предположить, что КЦ 7-го пассажа мезенхимального фенотипа способны при культивировании на границе среда-воздух сформировать пласт клеток, экспрессирующие эпителиальные маркеры К5, К14, К15 и маркер характерный для многослойных эпителиев 14-3-3σ.

3.8 Исследование жизнеспособности клеточной составляющей эквивалентов кожи на основе коллагенового геля

Оценку жизнеспособности клеток в составе приготовленных нами дермального и эпидермального ЭК проводили, анализируя морфологическое состояние клеток внутри коллагенового геля в процессе прижизненного наблюдения с использованием метода фазово-контрастной микроскопии, организацию актинового цитоскелета методом флуоресцентной микроскопии, пролиферативную активность клеток по их способности к индукции контракции геля и метаболической активности с использованием колориметрических методов (МТТ- и резазурин-тесты).

Прижизненное наблюдение за морфологическим состоянием клеток, культивируемых внутри КГ выявило, что КЦ и ФБ человека одинаково быстро адаптируются к условиям 3D культивирования внутри КГ. Сразу после полимеризации КГ, заключенные в него ФБ и КЦ, имеют округлую форму; в течение нескольких часов они принимают звездчатую форму, а позже форму веретена (Dodd et al., 1982).

Для лучшей визуализации клеток в составе ТБП на основе КГ и оценки их морфологического состояния окрашивали актиновый цитоскелет флуоресцентным красителем Rhodamine Phalloidin (рис.22).

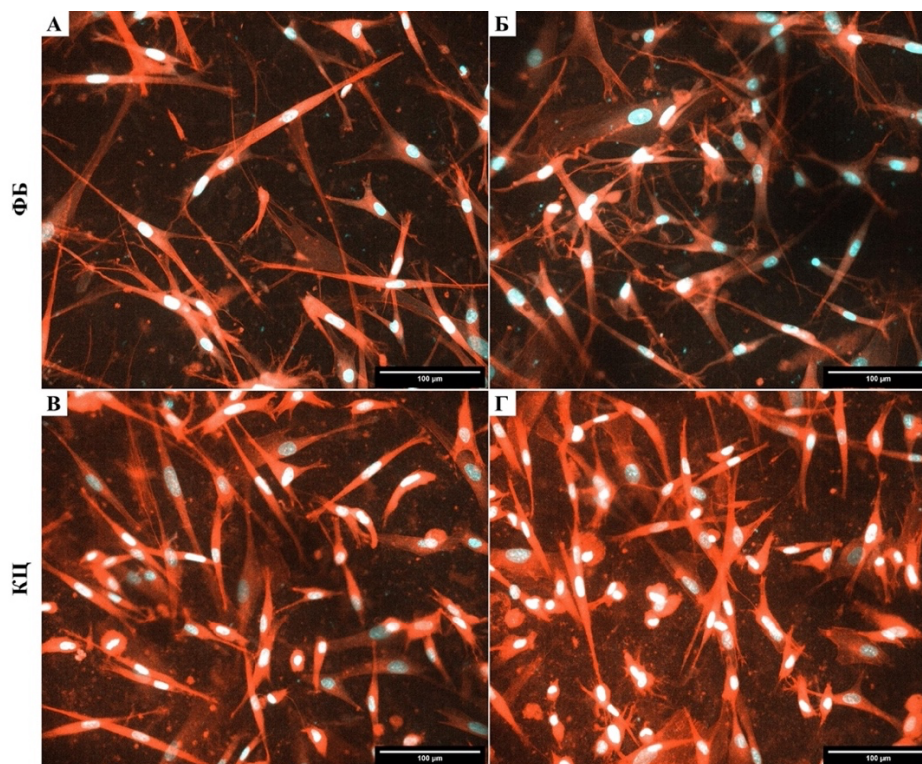


Рисунок 22. ФБ и КЦ в составе ТБП на основе КГ. Актиновый цитоскелет окрашен RP (красный), ядра – DAPI (белый). Конфокальная микроскопия МЛ: 100 мкм.

Морфология клеток в трехмерной матрице (3D условиях) сравнима с таковой в их исходной ткани, но сильно отличается от многоугольной формы, которую они принимают на плоском субстрате (2D-условия). Различия между ростом клеток на твердой пластиковой поверхности и мягким коллагеновым гелем свидетельствуют о том, что жесткость субстрата играет решающую роль.

Клетки кожи, встроенные в КГ, реконструируют окружающий матрикс. У них мало молекул клеточных адгезий на поверхности, но они производят дендритные расширения, которые взаимодействуют с коллагеновыми фибриллами. Клетки выравнивают гибкую коллагеновую сеть вокруг себя и удерживают коллагеновые фибриллы на месте. Затем фибриллы стабилизируются за счет нековалентных взаимодействий, которые не требуют присутствия клеток (Harris et al., 1981; Guidry & Grinnell, 1986). Клетки в прикрепленных

матрицах развивают изометрическое натяжение. Таким образом, клетки заключенные в КГ, индуцируют его контракцию. Когда КГ остается прикрепленным к стенкам культуральной посуды, клетки способны сокращать его только в вертикальном положении, но как только КГ отделяется от стенок культуральной посуды, сжатие происходит во всех направлениях. По мере пролиферации клеток в контактирующем геле, происходит миграция клеток из него.

Мы продемонстрировали длительное (в течение 15-и суток) культивирование КЦ и ФБ в составе КГ и исследовали их способность к индукции контракции КГ (рис. 23).

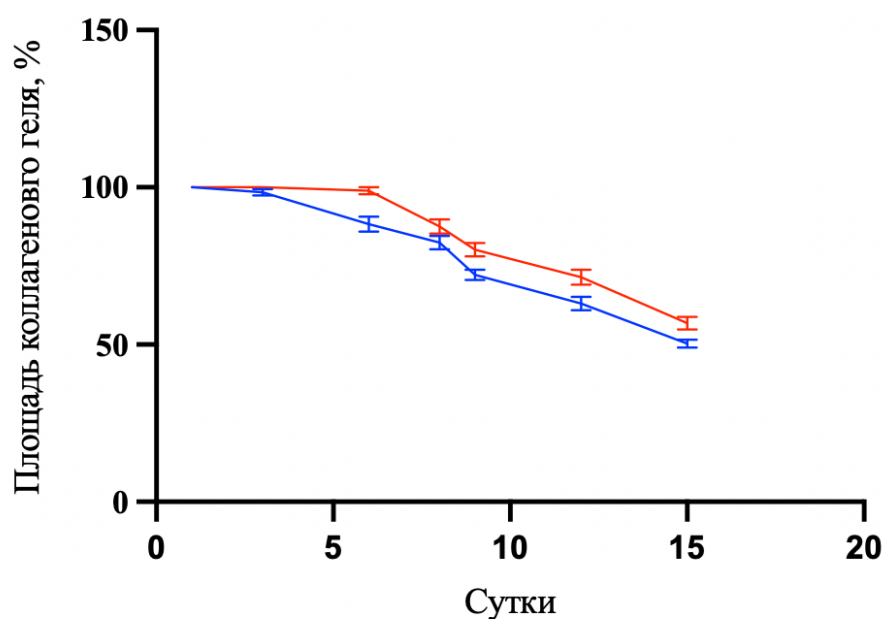


Рисунок 23. Контракция КГ клетками кожи. На графике представлены кривые, обозначающие сокращение КГ ФБ (кривая синего цвета) и КЦ (кривая красного цвета).

Степень контракции определяли как отношение диаметра контрактирующего геля на 3-и, 6-е, 9-е, 12-е и 15-е сутки культивирования к исходному размеру в 1-е сутки, принятого за 100%.

На основании полученных экспериментальных данных можно предположить, что трансплантация ТБП на основе КГ и ФБ или КЦ должна быть проведена не позднее 6-х суток после приготовления ТБП, пока не началась активная контракция КГ и миграция клеток на дно культуральной посуды. Миграция ФБ и КЦ из КГ на дно лунки определяет возможность их миграции при трансплантации ТБП на кожные раны.

При помощи двух колориметрических методов МТТ-теста и Резазурин-теста мы оценили пролиферативную активность ФБ и КЦ, культивируемых внутри КГ (рис. 24 и рис.25).

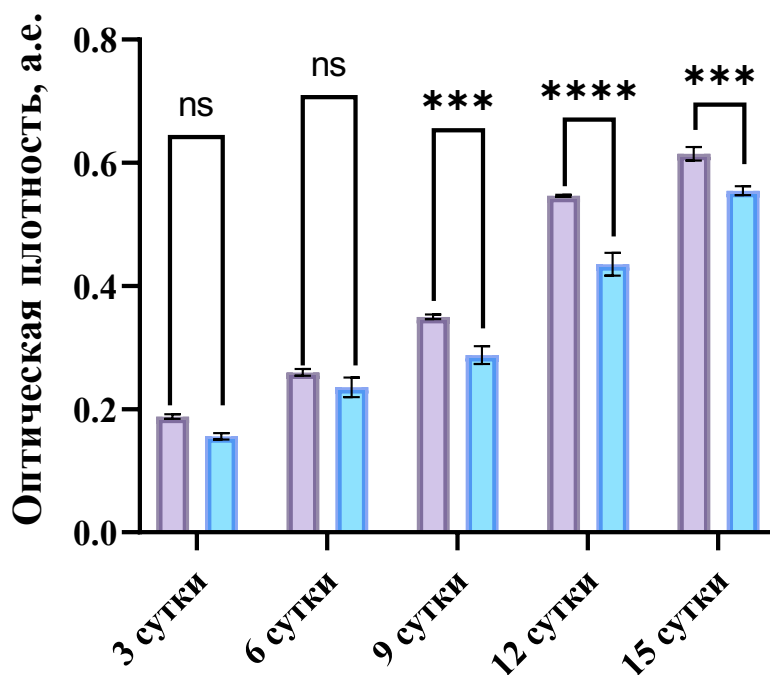


Рисунок 24. Пролиферативная активность ФБ (розовый цвет) и КЦ (голубой цвет) в составе ТБП на основе КГ. МТТ-тест. Выживаемость клеток исследована и представлена как среднее \pm ошибка среднего ($n = 6$; ns (not significant) соответствует $p < 0,1234$, *** и **** $p < 0,0002$ и $0,0001$ после двухфакторного дисперсионного анализа).

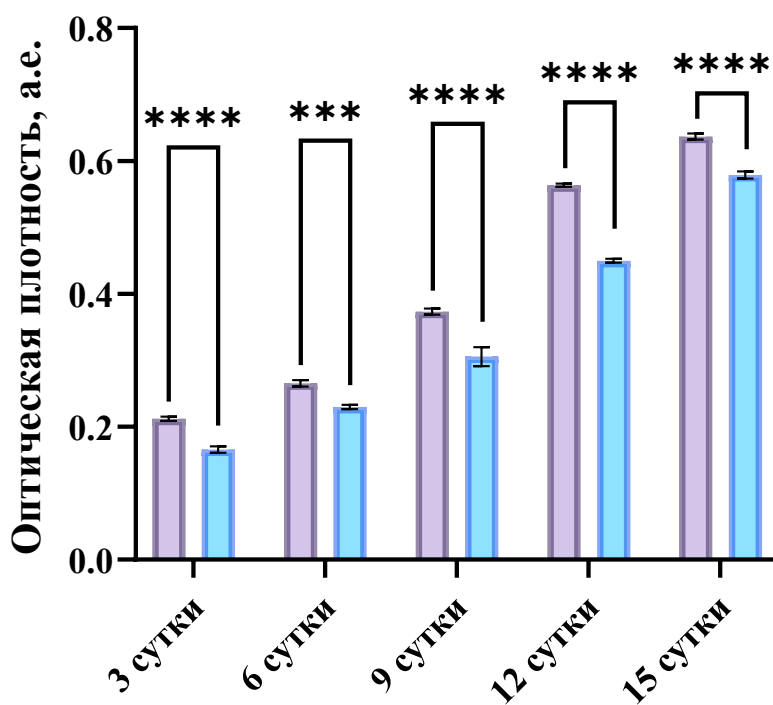


Рисунок 25. Пролиферативная активность ФБ (розовый цвет) и КЦ (голубой цвет) в составе ТБП на основе КГ. Резазурин-тест. Выживаемость клеток исследована и

представлена как среднее \pm ошибка среднего ($n = 6$ *** и **** $p < 0,0002$ и $0,0001$ после двухфакторного дисперсионного анализа).

Данные по оценке динамики пролиферативной активности ФБ и КЦ в составе ТБП на основе КГ, полученные в процессе МТТ-теста и Резазурин-теста сопоставимы. И ФБ, и КЦ активно пролиферируют внутри КГ. При этом пролиферативная активность ФБ немного выше, чем у КЦ, что совпадает с данными о пролиферативной активности ФБ и КЦ в условиях 2D культивирования. Между 9-ми и 12-ми сутками культивирования клеток в КГ выявлено резкое увеличение пролиферативной активности клеток, что может быть связано с усилением контракции КГ именно в эти сроки и миграцией клеток из геля.

Результаты исследования жизнеспособности ФБ и КЦ в составе ТБП «ЭД» и «ЭЭП» на основе КГ свидетельствуют об их высокой жизнеспособности и биосовместимости с КГ. Выявлено, что как ФБ, так и КЦ активно пролиферируют внутри КГ, и, индуцируя контракцию в процессе взаимодействия с ним, мигрируют из геля. Это позволяет рассматривать «ЭД» и «ЭП» на основе КГ в качестве потенциальных ТБП для терапии кожных ран. Данные о сроках контракции КГ являются критической информацией для сроков применения таких ТБП в клинике.

3.9 Анализ биосовместимости коммерческих раневых покрытий с ТБП «Эквивалент дермальный ЭД»

Биосовместимость дермального эквивалента, созданного на основе коллагенового геля, и коммерческих раневых покрытий (РП) оценивали по воздействию РП на жизнеспособность ФБ в составе ТБП «Эквивалент дермальный ЭД» при их совместном инкубировании в условиях *in vitro*. Фрагменты РП помещали на дермальный эквивалент, спустя 3 суток культивирования анализировали жизнеспособность ФБ используя МТТ-тест.

Результаты МТТ-теста представлены в виде гистограммы (рис. 26), где количество жизнеспособных клеток выражено в процентах по отношению к контролю.

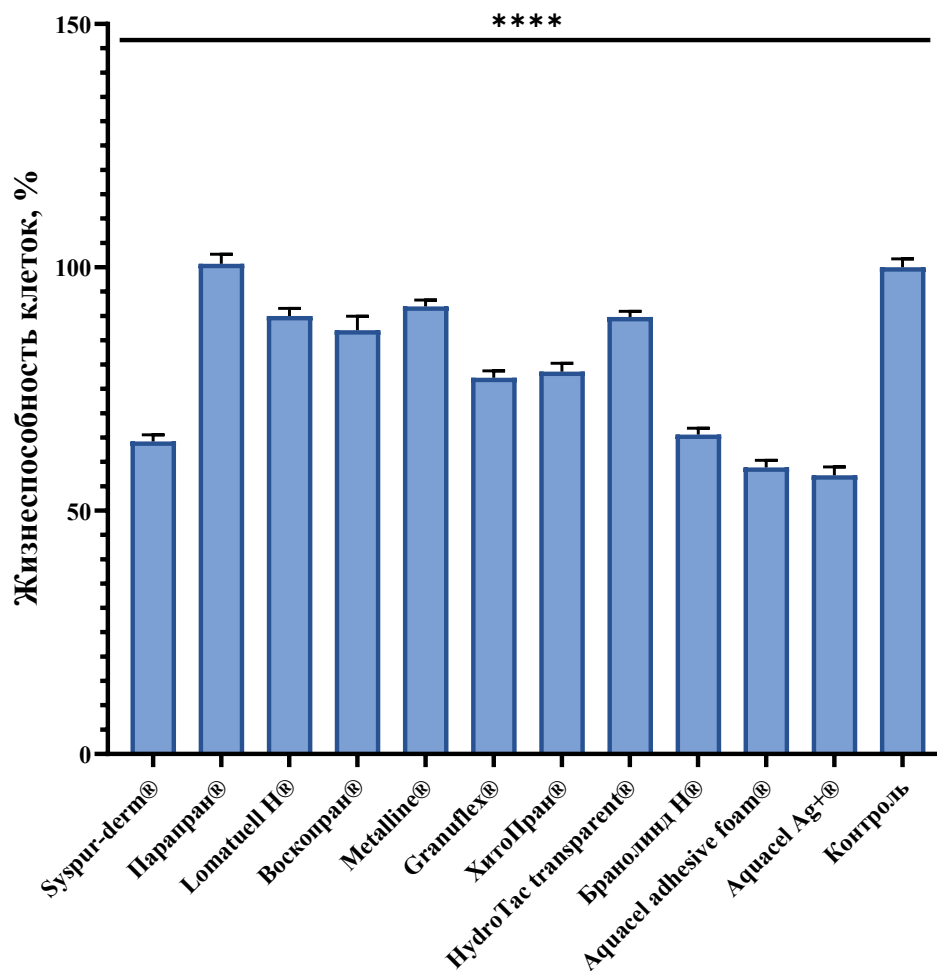


Рисунок 26. Влияние РП на жизнеспособность ФБ в составе ТБП на основе КГ. МТТ-тест. Выживаемость клеток исследована и представлена как среднее \pm ошибка среднего ($n = 8$ **** $p < 0,0001$ после двухфакторного дисперсионного анализа).

Результаты исследования *in vitro* показали, что исследуемые РП различаются по своему воздействию на ФБ в составе дермального эквивалента.

Было выявлено, что высокую биосовместимость с ТБП «Эквивалент дермальный ЭД» показало РП Парапран®. Жизнеспособность ФБ внутри ТБП, контактирующим с Парапран® была сопоставима с контролем. Все остальные РП оказали различное по интенсивности цитотоксическое действие в отношении ФБ в составе дермального эквивалента. Незначительное цитотоксическое действие оказали Metalline®, Lomatuell®, HydroTactransparent® и Воскопран®: жизнеспособность ФБ внутри ТБП составила в среднем 90%. Умеренный цитотоксический эффект в отношении ФБ внутри ТБП выявлен у Granuflex® и ХитоПран®: жизнеспособность ФБ составила в среднем 78%. РП Aquaceladhesivefoam®, AquacelAg+®, Syspur-derm® и Бранолинд Н® проявили в условиях *in vitro* низкую биосовместимость с ТБП «ЭД»: жизнеспособность ФБ внутри ТБП составила в среднем 61%.

Принцип минимизации вреда должен применяться к выбору РП на рану. На основании результатов проведенного исследования можно предположить, что при использовании для лечения кожных ран ТБП на основе КГ, содержащих в своем составе ФБ, нецелесообразно применять совместно РП. Aquaceladhesivefoam®, AquacelAg+®, Syspyr-derm® и Бранолинд Н®, а также, скорее всего, Granuflex® и ХитоПран®. Применение Metalline®, Lomatuell®, HydroTacttransparent® и Воскопран® совместно с ТБП на основе КГ «ЭД» сопряжено с некоторыми рисками. Оптимальным РП, из числа исследованных является Парапран®, обладающий высокой биосовместимостью с ТБП «ЭД». Исследования *in vitro* РП на биосовместимость с ТБП могут способствовать рациональному выбору РП при лечении кожных ран при совместном использовании РП с ТБП.

3.10 Клинические исследования применения дермального и эпидермального эквивалентов кожи при терапии кожных ран

Клинические исследования применения ТБП «Эквивалент дермальный ЭД» и «Эквивалент эпидермальный» проводились в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте скорой помощи имени И. И. Джанелидзе в рамках совместной с Институтом цитологии РАН НИР «Разработка метода лечения обширных ожоговых ран путем последовательной трансплантации дермального эквивалента и аллогенных кератиноцитов».

Для первого этапа исследования были отобраны 11 клинических случаев, при которых самостоятельная регенерация кожи была невозможна. В исследовании приняли участие 10 пациентов с различными термическими повреждениями кожи которым была показана плановая аутодермапластика и 1 пациент с трофической язвой (табл. 6). Применение ТБП «Эквивалент дермальный ЭД» и «Эквивалент эпидермальный» пациентам с кожными повреждениями производили с их информационного добровольного согласия.

Таблица 6. Типы ран пациентов

Пациент, №	Тип раны пациента
1	Глубокий ожог на задней поверхности туловища (в области поясницы).
2	Глубокий ожог на передней поверхности туловища (живот) и левом бедре.
3	Глубокий ожог в области левой голени.
4	Глубокий ожог в области левой голени.
5	Глубокий ожог в области правой голени.
6	Глубокий ожог в области левого голеностопного сустава.
7	Глубокий ожог в области левого голеностопного сустава и левой стопы.

8	Лучевой ожог в области левого голеностопного сустава.
9	Ожоги тыльной стороны правой кисти I, II, IIIa степеней, а также глубокие поражения IIIб степени.
10	Длительно незаживающая донорская рана в области левого плеча.
11	Трофическая язва правой нижней конечности в следствии липоидного некробиоза и сахарного диабете 2 типа.

Группа пациентов, которым применялись кожные эквиваленты имели преимущественно глубокие кожные раны, которые не могли самопроизвольно зажить, без хирургического вмешательства (аутодермопластики).

В ходе отработки метода применения была предложена однократная поэтапная трансплантация ТБП «Эквивалент дермальный ЭД» и «Эквивалент эпидермальный» совместно с наиболее биосовместимым с данными ТБП РП (параграф 3.9).

После проведенного лечения с использованием ЭК у всех пациентов наблюдается положительная динамика заживления кожных ран (табл. 7) и операции по аутодермопластике отменены.

Таблица 7. Результаты применения «ЭД» и «ЭЭП» на пациентах

Пациент, №	Результаты лечения
1	Достигнут активный рост и созревание грануляционной ткани; краевая и островковая эпителизация; сокращение площади раны составила примерно 10%.
2	Достигнута активная краевая и островковая эпителизация. Общая площадь ран сократилась примерно на 30-40%.
3	Отмечена активная краевая и островковая эпителизация. Площадь раны сократилась примерно на 40-50%.
4	Достигнут активный рост и созревание грануляционной ткани; краевая и островковая эпителизация; сокращение общей площади ран примерно на 10-15%.
5	Достигнута активная краевая и островковая эпителизация. Площадь ран сократилась примерно на 30-40%.
6	Достигнута активная краевая и островковая эпителизация.
7	Достигнута полная эпителизация ожоговой раны.
8	Достигнута положительная динамика в области лучевой язвы с ее практически полной эпителизацией на фоне эпидермолиза по периферии.

9	Достигнута практически полная эпителизация раны в области глубокого ожога кожи. Сохраняются два незначительных раневых дефекта с признаками активной смешанной эпителизации.
10	Достигнута активная краевая и островковая эпителизация. Площадь ран сократилась примерно на 30-40%.
11	Достигнута положительная динамика в виде продолжающейся эпителизации, появления участков грануляционного вала. Лечение продолжается.

Расширение понимания роли ФБ и КЦ в процессах восстановления поврежденной кожи, а также активное развитие клеточных технологий в области комбустиологии способствовали разработкам инновационных методик лечения ран различной этиологии. В основе этих методик лежит применение культур ФБ и КЦ (Ледовской и др., 2008; Солошенко и Носенко, 2015; Jang et al., 2015; Lis et al., 2012; Yin et al., 2016).

Известно, что трансплантация ФБ способствует формированию грануляционной ткани, а трансплантация КЦ способствует формированию эпидермиса. Однако, применяемые по отдельности, эти методики не позволяют полноценно восстановить участки глубоких поражений, самостоятельная регенерация которых невозможна.

Более эффективным в этом случае может оказаться комбинированное применение клеточных культур (Алейник и др., 2015; Алтухова и др., 2015; Арефьев и др., 2019)

В таком сочетании ФБ и КЦ будут оказывать взаимный паракринный эффект, стимулирующий регенераторную активность друг друга. Однако, в доступной литературе почти не представлено научных исследований, направленных на разработку методик совместного одномоментного или последовательного применения культивируемых ФБ и КЦ у пострадавших с обширными глубокими поражениями кожи.

Для ожоговых ран поэтапное применение ТБП может позволить частично отказаться от использования традиционного хирургического лечения – кожной пластики расщепленными перфорированными трансплантатами. Однако применение кожных эквивалентов для трофических ран требует большей выборки пациентов и времени для наблюдений.

Проведенное нами исследование продемонстрировало эффективность однократной поэтапной трансплантации ТБП «Эквивалент дермальный ЭД» и «Эквивалент эпидермальный» при лечении поражений кожи в клинических случаях, когда ее самостоятельная регенерация была невозможна. В ряде случаев для ожоговых ран поэтапное применение ТБП позволило отказаться от использования запланированного традиционного хирургического лечения – кожной пластики расщепленными перфорированными трансплантатами. Применение кожных эквивалентов для трофических ран требует большей

выборки клинических случаев и времени для наблюдений. В настоящее время клинические исследования применения ТБП «ЭД» и «ЭП» в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте скорой помощи имени И. И. Джанелидзе в рамках совместной с Институтом цитологии РАН НИР «Разработка метода лечения обширных ожоговых ран путем последовательной трансплантации дермального эквивалента и аллогенных кератиноцитов» продолжаются.

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, позволят разработать оптимальные рецептуры биомедицинских клеточных продуктов на основе ФБ и КЦ, а также систему их применения.

Выводы

1. Забираемые биоптаты тонкой кожи век человека представлены эпителиально-стромальным комплексом; ферментативное разделение биоптатов на эпидермис и дерму позволило выделить из эпидермиса кератиноциты, а из дермы - фибробласты и получить из них диплоидные клеточные линии. Клетки полученных линий обладают высокой пролиферативной активностью.
2. Фибробласты на всех этапах культивирования представлены клетками мезенхимо-подобного фенотипа, экспрессирующими основные стволовые и мезенхимальные маркеры, что свидетельствует об их стволовости и мезенхимальном происхождении.
3. Полученные линии фибробластов имеют нормальный кариотип 46,X; без клональных численных структурных перестроек; криоконсервация и культивирование до 15 пассажа не оказывают значимого влияния на его стабильность.
4. Кератиноциты первичной культуры представлены популяцией клеток двух фенотипов: эпителио-подобным и мезенхимо-подобным, с преобладанием первого; они характеризуются экспрессией основных стволовых и эпителиальных маркеров, что свидетельствует об их стволовости и эпителиальном происхождении. В процессе культивирования фенотип клеток сменяется на мезенхимо-подобный, что сопровождается снижением уровня экспрессии эпителиальных маркеров и появлением экспрессия N-кадгерина.
5. Индукция эпителиальной дифференцировки выявила способность кератиноцитов мезенхимо-подобного фенотипа совершать мезенхимо-эпителиальный переход и формировать многослойный эпителиальный пласт клеток, экспрессирующих характерные для многослойных эпителиев маркеры.
6. Эквиваленты кожи на основе фибробластов и кератиноцитов, культивируемых внутри коллагенового геля, характеризуются высокой жизнеспособностью клеток обеих линий. Клинические исследования последовательного применения этих эквивалентов совместно с биосовместимыми раневыми покрытиями выявили положительную динамику заживления кожных ран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксененко, М. Б., и Рукша, Т. Г. (2014). Инвазивная способность и пролиферативная активность меланомы кожи в зависимости от эпигенетического фактора. *Российский журнал кожных и венерических болезней*, 17(5), 4-8.
2. Алейник, Д.Я., Докукина Л.Н., Квицинская, Н.А., Чарыкова, И.Н., Рубцова, Ю.П., и Воловик, М.Г. (2015). Применение свежезаготовленных аутологичных клеток в практике детской комбустиологии. *Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии*, 5(4), 18–23.
3. Алтухова, Л.В., Кот, К.В., Кот, Ю.Г., Морозова, К.С., Перский, Е.Э. (2015). Биохимические механизмы ингибирования и заживления лучевого ожога кожи объемной аутотрансплантацией фибробластов и композиции фибробластов с кератиноцитами. *Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина*, 6(2), 125–132.
4. Арефьев, И.Ю., Алейник, Д.Я., Воробьев, Е.В., Чарыкова, И.Н., Рубцова, Ю.П., Сидорова, Т.И., Егорихина, М.Н. (2019). Аутологичные некультивированные клетки кожи в сочетании с сетчатым трансплантатом 1:6 при лечении ожогов. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 8, 38–43.
5. Афанасьев, Ю.И., Юрина, Н.А., Алешин, Б.В. (2018). Гистология, эмбриология, цитология: учебник. Москва: ГЭОТАР-Медиа.
6. Блинова, М.И., Юдинцева, Н.М., Александрова, О.И., Баллюзек, М.Ф., Хабарова, И.Г., Маркин, С.М., Чагунава, О.Л. (2015). Клинический опыт заживления трофических язв с использованием клеточного продукта «Эквивалент дермальный, ЭД». *Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения*, 10(2), 690–694.
7. Блинова, М.И., Юдинцева, Н.М., Кухарева, Л.В., Нащекина, Ю.А., Александер-Синклер, Э.И., Крылова, Т.А. (2022). Эквивалент дермальный, ЭД. Разработка и практика применения. Санкт-Петербург: Издательство Политехнического университета.
8. Боровик Т.Э., Макарова С.Г., Дарчия С.Н., Гамалеева А.В., & Грибакин С.Г. (2010). Кожа как орган иммунной системы. *Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского*, 89 (2), 132-136.
9. Быков, В.Л. (1997). Частная гистология человека (краткий обзорный курс). Санкт-Петербург: СОТИС.
10. Волкова, Н.А., Мазур, С.П., Холодный, В.С, Петренко, А.Ю. (2014). Стволовые клетки кожи как объект криоконсервирования. *Проблемы криобиологии и криомедицины*, 24(1), 3–15.
11. Воронкина, И. В., Смагина, Л. В., Бильдюг Н.Б., Мусорина, А.С., Полянская, Г.Г. (2020). Динамика активности матриксных металлопротеиназ и содержания белков

- внеклеточного матрикса в процессе репликативного старения линий мезенхимных стволовых клеток человека. *Цитология*, 62(3), 210–219.
12. Гелашвили, П.А., Супильников, А.А., Плохова, В.А. (2013). Кожа человека (анатомия, гистология, гистопатология): учебное пособие для студентов медицинских вузов. Самара: «РЕАВИЗ».
 13. Завражнов, А. А., Гвоздев, М. Ю., Крутова, В. А., Ордокова, А. А. (2016). Раны и раневой процесс. Учебно-методическое пособие для интернов, ординаторов и практических врачей. Краснодар: КубГМУ.
 14. Зорина, А.И., Бозо, И.Я., Зорин, В.Л., Черкасов, В.Р., и Деев, Р.В. (2011). Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 6(2), 15–26.
 15. Зорин, В. Л., Зорина, А. И., Петракова, О. С., Черкасов, В. Р. (2009). Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи. *Гены и клетки*, 4(4), 26–40.
 16. Крылова, Т.А., Мусорина, А.С., Зенин, В.В., Кольцова, А.М., Кропачева, И.В., Турилова, В.И., Яковлева Т.К., Полянская, Г.Г. (2016). Получение и характеристика неиммортизированных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста. *Цитология*, 58(11), 850–864.
 17. Кузнецов, С.Л. и Мушкамбаров, Н.Н. (2007). Гистология, цитология и эмбриология: Учебник для медицинских вузов. Москва: Медицинское информационное агентство.
 18. Ледовской С.Н., Бурда Ю.Е., Лазаренко В.А. (2008). Анализ клинической эффективности применения фетальных и зрелых аллогенных диплоидных фибробластов в лечении пограничных ожогов. *Успехи современного естествознания. Успехи современного естествознания*, 9, 92–94.
 19. Митрошина Е. В., Мищенко Т. А., Ведунова М. В. (2015). Определение жизнеспособности клеточных культур: учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского.
 20. Мяделец, О.Д. (2016). Гистология, цитология и эмбриология человека. Часть 2. Частная гистология: учебник. Витебск: ВГМУ.
 21. Пальцев, М.А. (2009). Биология стволовых клеток и клеточные технологии: для студентов медицинских вузов, Том 2, Москва: Медицина.
 22. Рачинская, О. А., Меркулов, В. А. (2018). Применение методов цитогенетического анализа при оценке качества клеточных линий в составе биомедицинских клеточных продуктов. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 18(1), 25-32.

23. Солошенко, В.В. и Носенко, В.М. (2015). Хирургическое лечения обширных дермальных ожогов у пострадавших в результате шахтных аварий. *Медико-социальные проблемы семьи*, 19(1), 88–91
24. Солошенко, В.В. и Носенко, В.М. (2015). Хирургическое лечения обширных дермальных ожогов у пострадавших в результате шахтных аварий. *Медико-социальные проблемы семьи*, 19(1), 88–91
25. Целуйко, С.С., Красавина, Н.П., Семенов. Д.А. (2019). Регенерация тканей: учебное пособие. Благовещенск: АГМА, 136.
26. Шаповалов, С.Г. (2014). Комбустиология чрезвычайных ситуаций: учебное пособие. Всероссийский центр экстренной и радиации медицины им. А.М. Никифорова МЧС России. Санкт-Петербург: Политехникасервис.
27. Юнусбаева, М.М., Юнусбаев, Б.Б., Валиев, Р.Р., Хамматова, А.А., Хуснутдинова, Э.К. (2015). Широкое многообразие кератинов человека. *Вестник дерматологии и венерологии*, 91(5), 42–52.
28. Ярцева, Н.М., Федорцева, К.Ф. (2014). Особенности изменений кариотипа клеток крысы в процессе их трансформации *in vitro*. *Цитология*, 56 (1), 14–35.
29. Adam, R. C., Yang, H., Rockowitz, S., Larsen, S. B., Nikolova, M., Oristian, D. S., Polak, L., Kadaja, M., Asare, A., Zheng, D., & Fuchs, E. (2015). Pioneer factors govern super-enhancer dynamics in stem cell plasticity and lineage choice. *Nature*, 521(7552), 366–370.
30. Atiyeh, B. S., Hayek, S. N., & Gunn, S. W. (2005). New technologies for burn wound closure and healing--review of the literature. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 31(8), 944–956.
31. Aumailley M. (2013). The laminin family. *Cell adhesion & migration*, 7(1), 48–55.
32. Bell, E., Ehrlich, H. P., Buttle, D. J., & Nakatsuji, T. (1981). Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science (New York, N.Y.)*, 211(4486), 1052–1054.
33. Ben-David, U., Mayshar, Y., & Benvenisty, N. (2011). Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. *Cell stem cell*, 9(2), 97–102.
34. Blagosklonny M. V. (2012). Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging*, 4(3), 159–165.
35. Blanpain, C., & Fuchs, E. (2014). Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6189), 1242281.

36. Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(8), 2892–2923.
37. Bowers, S., & Franco, E. (2020). Chronic Wounds: Evaluation and Management. *American family physician*, 101(3), 159–166.
38. Brody, I. (1960). The ultrastructure of the tonofibrils in the keratinization process of normal human epidermis. *Journal of Ultrastructure Research*, 4, 264–297.
39. Broussard, K. C., & Powers, J. G. (2013). Wound dressings: selecting the most appropriate type. *American journal of clinical dermatology*, 14(6), 449–459.
40. Burke, J. F., Yannas, I. V., Quinby, W. C., Jr, Bondoc, C. C., & Jung, W. K. (1981). Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Annals of surgery*, 194(4), 413–428.
41. Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 729–740.
42. Clayton, E., Doupé, D. P., Klein, A. M., Winton, D. J., Simons, B. D., & Jones, P. H. (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature*, 446(7132), 185–189.
43. Cottle, D. L., Kretschmar, K., Schweiger, P. J., Quist, S. R., Gollnick, H. P., Natsuga, K., Aoyagi, S., & Watt, F. M. (2013). c-MYC-induced sebaceous gland differentiation is controlled by an androgen receptor/p53 axis. *Cell reports*, 3(2), 427–441.
44. Coulombe, P. A. (1997). Towards a molecular definition of keratinocyte activation after acute injury to stratified epithelia. *Biochemical and biophysical research communications*, 236(2), 231–238.
45. Covas, D. T., Panepucci, R. A., Fontes, A. M., Silva, W. A., Jr, Orellana, M. D., Freitas, M. C., Neder, L., Santos, A. R., Peres, L. C., Jamur, M. C., & Zago, M. A. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146⁺ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental hematology*, 36(5), 642–654.
46. Cristofalo, V. J., Volker, C., Francis, M. K., & Tresini, M. (1998). Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 8(1), 43–80.
47. Damon, M. & Blumenberg M. (2012). *Molecular Biology of the Skin: The Keratinocyte*. New York: Academic Press.
48. Darmon, M.Y., & Blumenberg, M. (1993). *Molecular biology of the skin: the keratinocyte*.

49. Datta, S. C., Fisher, G. J., & Voorhees, J. J. (2000). Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *The Journal of investigative dermatology*, 114(3), 480–486.
50. Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhini, E. (2015). Wound dressings - a review. *BioMedicine*, 5(4), 22.
51. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367.
52. Dodd, N. J., Schor, S. L., & Rushton, G. (1982). The effects of a collagenous extracellular matrix on fibroblast membrane organization. An ESR spin label study. *Experimental cell research*, 141(2), 421–431.
53. Driskell, R. R., & Watt, F. M. (2015). Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in cell biology*, 25(2), 92–99.
54. Driskell, R. R., Soldin, M., Lynch, M. D., & Watt, F. M. (2018). Spatial and Single-Cell Transcriptional Profiling Identifies Functionally Distinct Human Dermal Fibroblast Subpopulations. *The Journal of investigative dermatology*, 138(4), 811–825.
55. Díaz-García, D., Filipová, A., Garza-Veloz, I., & Martinez-Fierro, M. L. (2021). A Beginner's Introduction to Skin Stem Cells and Wound Healing. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 11030.
56. Evora, A. S., Adams, M. J., Johnson, S. A., & Zhang, Z. (2021). Corneocytes: Relationship between Structural and Biomechanical Properties. *Skin pharmacology and physiology*, 34(3), 146–161.
57. Fife, C. E., & Carter, M. J. (2012). Wound Care Outcomes and Associated Cost Among Patients Treated in US Outpatient Wound Centers: Data from the US Wound Registry. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 24(1), 10–17.
58. Frank, N. Y., Pendse, S. S., Lapchak, P. H., Margaryan, A., Shlain, D., Doeing, C., Sayegh, M. H., & Frank, M. H. (2003). Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *The Journal of biological chemistry*, 278(47), 47156–47165.
59. Frykberg, R. G., & Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in wound care*, 4(9), 560–582.
60. Gartner, L.P. (2019). *Cell Biology and Histology*. Wolters Kluwer.
61. Gawkrödger, D.J. (1997). *Dermatology: An Illustrated Colour Text*. Churchill Livingstone.

62. Ge, Y., Gomez, N. C., Adam, R. C., Nikolova, M., Yang, H., Verma, A., Lu, C. P., Polak, L., Yuan, S., Elemento, O., & Fuchs, E. (2017). Stem Cell Lineage Infidelity Drives Wound Repair and Cancer. *Cell*, 169(4), 636–650.e14.
63. Ghahary, A., Karimi-Busheri, F., Marcoux, Y., Li, Y., Tredget, E. E., Taghi Kilani, R., Li, L., Zheng, J., Karami, A., Keller, B. O., & Weinfeld, M. (2004). Keratinocyte-releasable stratifin functions as a potent collagenase-stimulating factor in fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology*, 122(5), 1188–1197.
64. Goldsmith, L.A., Katz, S.I., Gilchrest, B.A., Paller, A., Leffell, D.J., Wolff K. (2012). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, Eighth Edition, 2 Volume set. McGraw Hill Professional.
65. Gravante, G., Di Fede, M. C., Araco, A., Grimaldi, M., De Angelis, B., Arpino, A., Cervelli, V., & Montone, A. (2007). A randomized trial comparing ReCell system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 33(8), 966–972.
66. Gu, L. H., & Coulombe, P. A. (2007). Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Current opinion in cell biology*, 19(1), 13–23.
67. Guidry, C., & Grinnell, F. (1987). Contraction of hydrated collagen gels by fibroblasts: evidence for two mechanisms by which collagen fibrils are stabilized. *Collagen and related research*, 6(6), 515–529.
68. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321.
69. Harris, A. K., Stopak, D., & Wild, P. (1981). Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*, 290(5803), 249–251.
70. Hashimoto, K. (1972). The ultrastructure of the skin of human embryos. X. Merkel tactile cells in the finger and nail. *Journal of anatomy*, 111(Pt 1), 99–120.
71. Hawthorne, B., Simmons, J. K., Stuart, B., Tung, R., Zamierowski, D. S., & Mellott, A. J. (2021). Enhancing wound healing dressing development through interdisciplinary collaboration. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 109(12), 1967–1985.
72. Henrot, P., Laurent, P., Levionnois, E., Leleu, D., Pain, C., Truchetet, M. E., & Cario, M. (2020). A Method for Isolating and Culturing Skin Cells: Application to Endothelial Cells, Fibroblasts, Keratinocytes, and Melanocytes From Punch Biopsies in Systemic Sclerosis Skin. *Frontiers in immunology*, 11, 566607.
73. Hermans M. H. (2005). A general overview of burn care. *International wound journal*, 2(3), 206–220.
74. Horch, R. E., Kopp, J., Kneser, U., Beier, J., & Bach, A. D. (2005). Tissue engineering of cultured skin substitutes. *Journal of cellular and molecular medicine*, 9(3), 592–608.

75. Hsu, Y. C., Li, L., & Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature medicine*, 20(8), 847–856.
76. Hunt, T. K., Hopf, H., & Hussain, Z. (2000). Physiology of wound healing. *Advances in skin & wound care*, 13(2 Suppl), 6–11.
77. Ishida-Yamamoto, A., Simon, M., Kishibe, M., Miyauchi, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., O'Brien, T. J., Serre, G., & Iizuka, H. (2004). Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *The Journal of investigative dermatology*, 122(5), 1137–1144.
78. Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Liang, F., Morris, R. J., & Cotsarelis, G. (2005). Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nature medicine*, 11(12), 1351–1354.
79. Jang, J. C., Choi, R. J., Han, S. K., Jeong, S. H., & Kim, W. K. (2015). Effect of fibroblast-seeded artificial dermis on wound healing. *Annals of plastic surgery*, 74(4), 501–507.
80. Johnson-Wint, B., & Gross, J. (1984). Regulation of connective tissue collagenase production: stimulators from adult and fetal epidermal cells. *The Journal of cell biology*, 98(1), 90–96.
81. Kalluri, R. & Zeisberg, M. (2006) Fibroblasts in Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, 392-401.
82. Khavkin, J., & Ellis, D. A. (2011). Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial plastic surgery clinics of North America*, 19(2), 229–234.
83. Kirichenko, A. K., Bolshakov, I. N., Ali-Riza, A. E., & Vlasov, A. A. (2013). Morphological study of burn wound healing with the use of collagen-chitosan wound dressing. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 154(5), 692–696.
84. Kirwan, L. (1995). Management of difficult wounds with Biobrane. *Connecticut medicine*, 59(9), 523–529.
85. Kligys, K., Yao, J., Yu, D., & Jones, J. C. (2009). 14-3-3zeta/tau heterodimers regulate Slingshot activity in migrating keratinocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 383(4), 450–454.
86. Korting, H. C., Schöllmann, C., & White, R. J. (2011). Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 25(2), 130–137.
87. Landriscina, A., Rosen, J., & Friedman, A. J. (2015). Systematic Approach to Wound Dressings. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, 14(7), 740–744.
88. Lavker, R. M., & Sun, T. T. (2000). Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13473–13475.
89. Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Percoraro, R. E., Rodeheaver, G., & Robson, M. C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound*

- repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 2(3), 165–170.
90. Lazic, T., & Falanga, V. (2011). Bioengineered skin constructs and their use in wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 127 Suppl 1, 75S–90S.
 91. Levy, V., Lindon, C., Harfe, B. D., & Morgan, B. A. (2005). Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Developmental cell*, 9(6), 855–861.
 92. Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*, 25(1), 9–18.
 93. Lis, G. J., Zarzecka, J., Litwin, J. A., Jasek, E., Cichocki, T., & Zapała, J. (2012). Effect of cultured autologous oral keratinocyte suspension in fibrin glue on oral wound healing in rabbits. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 41(9), 1146–1152.
 94. Lo Celso, C., Berta, M. A., Braun, K. M., Frye, M., Lyle, S., Zouboulis, C. C., & Watt, F. M. (2008). Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(5), 1241–1252.
 95. Longmate, W. M., & Dipersio, C. M. (2014). Integrin Regulation of Epidermal Functions in Wounds. *Advances in wound care*, 3(3), 229–246.
 96. Lu, C. P., Polak, L., Rocha, A. S., Pasolli, H. A., Chen, S. C., Sharma, N., Blanpain, C., & Fuchs, E. (2012). Identification of stem cell populations in sweat glands and ducts reveals roles in homeostasis and wound repair. *Cell*, 150(1), 136–150.
 97. Lynch, M. D., & Watt, F. M. (2018). Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *The Journal of clinical investigation*, 128(1), 26–35.
 98. Magnúsdóttir, E., Kalachikov, S., Mizukoshi, K., Savitsky, D., Ishida-Yamamoto, A., Panteleyev, A. A., & Calame, K. (2007). Epidermal terminal differentiation depends on B lymphocyte-induced maturation protein-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(38), 14988–14993.
 99. Malmquist, J. P., Clemens, S. C., Oien, H. J., & Wilson, S. L. (2008). Hemostasis of oral surgery wounds with the HemCon Dental Dressing. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 66(6), 1177–1183.
 100. Martinengo, L., Olsson, M., Bajpai, R., Soljak, M., Upton, Z., Schmidtchen, A., Car, J., & Järbrink, K. (2019). Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Annals of epidemiology*, 29, 8–15.
 101. Mescher, A.L. (2018). *Junqueira's Basic Histology*. McGraw-Hill Education.
 102. Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R., & Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, 398(6729), 708–713.

103. Mine, S., Fortunel, N. O., Pigeon, H., & Asselineau, D. (2008). Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PloS one*, 3(12), e4066.
104. Mizuno, H., Tobita, M., & Uysal, A. C. (2012). Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 30(5), 804–810.
105. Moczar, M., & Robert, L. (1993). Stimulation of cell proliferation by hyaluronidase during in vitro aging of human skin fibroblasts. *Experimental gerontology*, 28(1), 59–68.
106. Mogoşanu, G. D., & Grumezescu, A. M. (2014). Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International journal of pharmaceutics*, 463(2), 127–136.
107. Morrison, K. M., Miesegaes, G. R., Lumpkin, E. A., & Maricich, S. M. (2009). Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Developmental biology*, 336(1), 76–83.
108. Nagafuchi, A., & Takeichi, M. (1988). Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *The EMBO journal*, 7(12), 3679–3684.
109. Nicholas, M. N., & Yeung, J. (2017). Current Status and Future of Skin Substitutes for Chronic Wound Healing. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 21(1), 23–30.
110. Nowak, J. A., Polak, L., Pasolli, H. A., & Fuchs, E. (2008). Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell stem cell*, 3(1), 33–43.
111. O'Guin, W. M., Galvin, S., Schermer, A., & Sun, T. T. (1987). Patterns of keratin expression define distinct pathways of epithelial development and differentiation. *Current topics in developmental biology*, 22, 97–125.
112. Ong, S. Y., Wu, J., Moochhala, S. M., Tan, M. H., & Lu, J. (2008). Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*, 29(32), 4323–4332.
113. Oryan, A., Alemzadeh, E., & Moshiri, A. (2017). Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. *Journal of wound care*, 26(1), 5–19.
114. Ozkinay, C., & Mitelman, F. (1979). A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas*, 90(1), 1–4.
115. Pakshir, P., & Hinz, B. (2018). The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 68-69, 81–93.
116. Parsa, R., Yang, A., McKeon, F., & Green, H. (1999). Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 113(6), 1099–1105.
117. Philippeos, C., Telerman, S. B., Oulès, B., Pisco, A. O., Shaw, T. J., Elgueta, R., Lombardi, G.,

118. Potten C. S. (1974). The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell and tissue kinetics*, 7(1), 77–88.
119. Potten C. S. (1981). Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *International review of cytology*, 69, 271–318.
120. Powell, H. M., Supp, D. M., & Boyce, S. T. (2008). Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. *Biomaterials*, 29(7), 834–843.
121. Quan, T., Qin, Z., Shao, Y., Xu, Y., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2011). Retinoids suppress cysteine-rich protein 61 (CCN1), a negative regulator of collagen homeostasis, in skin equivalent cultures and aged human skin in vivo. *Experimental dermatology*, 20(7), 572–576.
122. Ramos-e-Silva, M., & Ribeiro de Castro, M. C. (2002). New dressings, including tissue-engineered living skin. *Clinics in dermatology*, 20(6), 715–723.
123. Rebuzzini, P., Zuccotti, M., Redi, C. A., & Garagna, S. (2015). Chromosomal Abnormalities in Embryonic and Somatic Stem Cells. *Cytogenetic and genome research*, 147(1), 1–9.
124. Rheinwald, J. G., & Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6(3), 331–343.
125. Robinson, K. C., & Fisher, D. E. (2009). Specification and loss of melanocyte stem cells. *Seminars in cell & developmental biology*, 20(1), 111–116.
126. Rognoni, E., & Watt, F. M. (2018). Skin Cell Heterogeneity in Development, Wound Healing, and Cancer. *Trends in cell biology*, 28(9), 709–722.
127. Rowan M.P., Cancio L.C., Elster E.A., Burmeister D.M., Rose L.F., Natesan S. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit. Care*. 2015; 19:243.
128. Sarin, K. Y., & Artandi, S. E. (2007). Aging, graying and loss of melanocyte stem cells. *Stem cell reviews*, 3(3), 212–217.
129. Schepeler, T., Page, M. E., & Jensen, K. B. (2014). Heterogeneity and plasticity of epidermal stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 141(13), 2559–2567.
130. Sen, C. K., Gordillo, G. M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T. K., Gottrup, F., Gurtner, G. C., & Longaker, M. T. (2009). Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 17(6), 763–771.
131. Shakespeare P. G. (2005). The role of skin substitutes in the treatment of burn injuries. *Clinics in dermatology*, 23(4), 413–418.
132. Shevchenko, R. V., James, S. L., & James, S. E. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of the Royal Society, Interface*, 7(43), 229–258.

133. Shi, C., Wang, C., Liu, H., Li, Q., Li, R., Zhang, Y., Liu, Y., Shao, Y., & Wang, J. (2020). Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 182.
134. Shpichka, A., Butnaru, D., Bezrukov, E. A., Sukhanov, R. B., Atala, A., Burdukovskii, V., Zhang, Y., & Timashev, P. (2019). Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 94.
135. Singh, P., Chen, C., Pal-Ghosh, S., Stepp, M. A., Sheppard, D., & Van De Water, L. (2009). Loss of integrin alpha9beta1 results in defects in proliferation, causing poor re-epithelialization during cutaneous wound healing. *The Journal of investigative dermatology*, 129(1), 217–228.
136. Snowden, J. M., Kennedy, D. F., & Cliff, W. J. (1984). The contractile properties of wound granulation tissue. *The Journal of surgical research*, 36(2), 108–114.
137. Soares, E., & Zhou, H. (2018). Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease. *Cellular and molecular life sciences*, 75(7), 1179–1190.
138. Sorrell, J. M., & Caplan, A. I. (2009). Fibroblasts—a diverse population at the center of it all. *International review of cell and molecular biology*, 276, 161–214.
139. Sorrell, J.M., & Caplan, A.I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of Cell Science*, 117, 667–675.
140. Stappert, J., & Kemler, R. (1994). A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. *Cell adhesion and communication*, 2(4), 319–327.
141. Strutz, F., Okada, H., Lo, C. W., Danoff, T., Carone, R. L., Tomaszewski, J. E., & Neilson, E. G. (1995). Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *The Journal of cell biology*, 130(2), 393–405.
142. Ter Horst, B., Chouhan, G., Moiemien, N. S., & Grover, L. M. (2018). Advances in keratinocyte delivery in burn wound care. *Advanced drug delivery reviews*, 123, 18–32.
143. Turley, E. A., & Torrance, J. (1985). Localization of hyaluronate and hyaluronate-binding protein on motile and non-motile fibroblasts. *Experimental cell research*, 161(1), 17–28.
144. Uppal, R., Ramaswamy, G. N., Arnold, C., Goodband, R., & Wang, Y. (2011). Hyaluronic acid nanofiber wound dressing—production, characterization, and in vivo behavior. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 97(1), 20–29.
145. Varani, J., Warner, R. L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S. H., Kang, S., Chung, J. H., Wang, Z. Q.,
146. Wang, C., Mai, L., Yang, C., Liu, D., Sun, K., Song, W., Luo, B., Li, Y., Xu, M., Zhang, S., Li, F., Ren, M., & Yan, L. (2016). Reducing major lower extremity amputations after the introduction of a multidisciplinary team in patient with diabetes foot ulcer. *BMC endocrine disorders*, 16(1), 38.

147. Wang, J. H., Thampatty, B. P., Lin, J. S., & Im, H. J. (2007). Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts. *Gene*, 391(1-2), 1–15.
148. Wang, Z., Wang, Y., Farhangfar, F., Zimmer, M., & Zhang, Y. (2012). Enhanced keratinocyte proliferation and migration in co-culture with fibroblasts. *PloS one*, 7(7), e40951.
149. Watt, F. M., & Jones, P. H. (1993). Expression and function of the keratinocyte integrins. *Development (Cambridge, England)*. Supplement, 185–192.
150. Weller, C. D., Team, V., & Sussman, G. (2020). First-Line Interactive Wound Dressing Update: A Comprehensive Review of the Evidence. *Frontiers in pharmacology*, 11, 155.
151. Werner, S., Krieg, T., & Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of investigative dermatology*, 127(5), 998–1008.
152. Yin, K., Shen, C., Ma, L., Shang, Y., Li, D., Li, L., Zhao, D., & Cheng, W. (2016). An experimental study on repair of full thickness skin wound with graft of autologous keratinocyte suspension in rats. *Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, 30(2), 219-223.
153. Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., & Sorrentino, B. P. (2001). The ABC transporter *Bcrp1/ABCG2* is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature medicine*, 7(9), 1028–1034.

БЛАГОДАРНОСТИ

Эта работа выполнена в рамках выпускной квалификационной работы магистра Биологического факультета СПбГУ. Работа выполнена в Лаборатории клеточных биотехнологий Института цитологии РАН. В связи с этим мне хотелось бы принести благодарности тем людям, которые принимали участие в формировании как экспериментальной, так и теоретической ее части.

Выражаю глубокую признательность за помощь в процессе подготовки дипломной работы от выбора темы до завершения работы – моему научному руководителю Александер-Синклер Эльге Игоревне. Под руководством которой были с нуля получены теоретические и практические знания в области клеточных технологий. Я крайне признателен Блиновой Миральде Ивановне за плодотворное обсуждение результатов и неоценимые советы. В частности, благодарю Кирилла Эдуардовича Журенкова и Гречаной Юлии Сергеевны за консультации в планировании экспериментов. Кроме того, хочется выразить благодарность Ярцевой Наталье Михайловне за неоценимую помощь в рамках дипломной работы получении данных и их обсуждении.

Отдельную благодарность хочу выразить Кольке Алене Алексеевне и Костякову Денису Валерьевичу (ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург) за постановку *in vivo* экспериментов и плодотворное сотрудничество.

Также выражаю глубокую признательность и благодарю сотрудников и преподавателей Кафедры цитологии и гистологии СПбГУ за ценные советы и поддержку.

В завершении хочу поблагодарить всех сотрудников Лаборатории клеточных биотехнологий ИНЦ РАН за создание дружественной и приятной обстановки, способствующей плодотворной работе.