

*З.Б. Квачева¹, М.В. Левченя¹, И.Е. Гурманчук², О.В. Петракова²,
С.В. Корень¹, Ю.А. Кабанова¹, Л.А. Хватова¹, Е.Н. Ромащук¹, Н.И. Мезен¹,
А.Н. Харламова²*

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КОМБУСТИОЛОГИИ: УСПЕХИ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

*ГУ« Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь¹,
Белорусский государственный медицинский университет²*

*Настоящий обзор посвящен анализу фундаментальных и прикладных исследований, касающихся функций и биологических свойств клеток кожи *in vivo* и *in vitro*. Рассмотрены проблемы получения, выделения и культивирования клеток кожи. Представлены этапы развития, достигнутые успехи и возникшие проблемы применения клеточных технологий для восстановления кожного покрова у пациентов. Определены некоторые из перспективных направлений оптимизации технологий культуры клеток кожи в медицине.*

Кожа обладает высокой регенеративной способностью, что имеет важнейшее значение в функционировании организма, как в нормальных условиях, так и при наличии повреждений. Однако при обширных термических травмах, трофических язвах, плановых операциях, сопровождающихся утратой значительной части кожного покрова, регенеративных возможностей этого органа бывает недостаточно. Для решения проблемы своевременного и быстрого закрытия раневых поверхностей, широкое применение в клинической практике получил метод аутодермотрансплантации – пересадки лоскутов кожи, взятых из неповрежденных участков на поврежденные участки. Основным недостатком этого метода является нарушение целостности кожного покрова в месте забора лоскута, сопоставимое с размером лоскута, и невозможность применения при обширных поражениях более 30-40% поверхности тела по причине дефицита донорских ресурсов. В связи с этим разработка альтернативных методов закрытия обширных раневых поверхностей остается одним из актуальных вопросов комбустиологии [1, 2, 3, 4, 5, 6].

В настоящее время в медицинской практике развитых стран уже широко применяются различные клеточные биотехнологии, однако дальнейшее их развитие, а так же внедрение все более наукоемких методов является актуальным и перспективным. Современные клеточные технологии, используемые для восстановления поврежденных кожных покровов, основаны на трансплантации живых эквивалентов кожи, полученных при выращивании в культуре эпителиальных пластов кератиноцитов, фибробластов, и их комбинаций.

На настоящий момент уже разработан ряд коммерческих биопрепаратов и тест-систем на основе культур клеток, предлагаемых для клинической практики [2].

Современное представление о строении и функциях кожи

Эпидермис представляет собой сложно организованную быстро обновляющуюся клеточную систему, основным клеточным компонентом которой являются кератиноциты. В эпидермисе представлены так же и другие клетки, выполняющие ряд функций (меланоциты, клетки Лангерганса, фибробласты, дендритные клетки, лимфоциты и др.). Удельный вклад каждого вида клеток в общую систему кожи значительно различается; так на одну клетку Лангерганса приходится 53 живых кератиноцита. Базальный слой эпидермиса включает стволовые и транзиторные клетки

(предшественники кератиноцитов), которые начинают интенсивно дифференцироваться после перехода в шиповатый слой. При этом в базальном слое встречаются клетки с маркерами терминально дифференцированных кератиноцитов, что указывает на сложность структурной и функциональной организации эпидермиса [7, 9, 10, 11].

Популяция кератиноцитов весьма гетерогенна. В эпидермальных пролиферативных нишах центральные клетки, скорее всего являющиеся стволовыми, пролиферируют медленно и, включив радиоактивную метку, сохраняют ее в течение длительного времени, тогда как клетки периферии пролиферируют более интенсивно. Координированное взаимодействие между различными клетками кожи, как и в других тканях и органах осуществляется посредством межклеточных взаимодействий. С их помощью происходит согласованная регуляция метаболизма, дифференциации, пролиферации, проявления физиологических функций специализированных клеток. Важная роль в регуляции межклеточного взаимодействия принадлежит цитокинам и ростовым факторам, которые, взаимодействуя со специфическими рецепторами клеток, обеспечивают все процессы их жизнедеятельности [7, 12, 13].

За последние десятилетия укрепилось представление о коже как об иммунно-компетентном органе, которое вошло в различные области медицинских знаний. В настоящее время кожа рассматривается как высокоорганизованный орган иммунной системы, который обладает необходимым составом иммуннокомпетентных клеток, кооперирующихся между собой как с помощью комплементарных структур на своей поверхности, так и при участии иммунорегуляторных цитокинов. Накоплена колоссальная база знаний о клетках кожи выполняющих определённые иммунные функции, об их межклеточных взаимодействиях, осуществляемых посредством различных медиаторов и направленных на сохранение гомеостаза в системе защиты организма в целом [14]. Подобная организация позволяет участвовать коже, как в иммунных реакциях всего организма, так и осуществлять некоторые иммунологические процессы самостоятельно, *in situ*.

Клеточный субстрат иммунной компетентности кожи представлен резидентными клетками и рециркулирующими клетками костномозгового происхождения. К резидентным клеткам относятся гистиоциты, тучные клетки, клетки Лангерганса, клетки Гренштейна, кератиноциты, эндотелиальные клетки, клетки Меркеля, некоторые типы лим-

фоцитов, которые способны иммигрировать и оставаться в коже.

Значительную роль в инициации иммунного ответа в коже принадлежит клеткам Лангерганса – субпопуляции дендритных клеток костномозгового происхождения. Экспериментально доказано, что клетки Лангерганса мигрируют под действием раздражителя через эпидермальную базальную мембрану в лимфатический узел и реализуют так ряд функций, включая презентацию антигенов.

К антигенпредставляющим клеткам кожи относятся клетки Гринштейна. Они были обнаружены в коже мышей и в отличие от клеток Лангерганса, устойчивы к ультрафиолетовому облучению и индуцируют супрессорный иммунный ответ. Предполагается, что подобные клетки могут существовать и в коже человека. Клетки Меркеля в коже выполняют рецепторную функцию и связаны с афферентным нервным волокном.

Кератиноциты являются резидентными клетками кожи, выполняющими так же и иммунокомпетентную функцию. Они продуцируют ряд цитокинов и различные гемопоэтические факторы роста, которые оказывают воздействие в том числе и на клетки, непосредственно реализующие иммунологические функции – лимфоциты, дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы.

Факторы роста играют важную роль в регуляции пролиферации и дифференцировки кератиноцитов как в организме, так в культуре. Активация и пролиферация кератиноцитов регулируется такими факторами роста как эпидермальный фактор роста, трансформирующий фактор роста, фактор роста кератиноцитов, амфирегулин, основной фактор роста фибробластов, интерлейкин-8, интерферон- γ , фактор роста из тромбоцитов, эндотелин и др. Воздействие этих факторов характеризуется изменением экспрессии кератиновых белков. Специфическими маркерами активированных эпидермальных кератиноцитов являются цитокератин K6 и K16. Активация экспрессии K6 происходит под действием таких факторов роста как IL-1, EGF и TNF α . На поверхности кератиноцитов экспрессируется ряд дифференцировочных маркеров (CD44, CD36, CD24, CD141). Молекула CD36 обнаруживается на поверхности эпидермальных кератиноцитов и характерна для клеток, составляющих послеожоговые гипертрофические рубцы, тогда как кератиноциты нормальной кожи не содержат этот маркер ни внутри, ни на поверхности клетки [13, 14, 15, 16]. Молекула CD24 являясь маркером дифференцировки кератиноцитов, в тоже время обнаруживается в элементах волосяного фолликула и возможно играет важную роль в процессах клеточной адгезии.

Заживление раны представляет собой сложную последовательность межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий, формирующих каскад тесно связанных между собой событий: коагуляцию, воспалительную реакцию, синтез и накопление компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), неоваскуляризацию, контракцию, ремоделирование ВКМ и реэпителизацию.

Первой местной реакцией организма на повреждение является дегрануляция тромбоцитов, которая приводит к высвобождению трансформирующего фактора роста (TGF β) – регулятора репаративных процессов, а также тромбоцитарного фактора роста (PDGF). TGF β вызывает усиление экспрессии гена рецепторов TGF β в клетках мышечных и влияет на продукцию ими других цитокинов и ростовых факторов, таких как TGF β , интерлейкин-1 (IL-1),

фактор некроза опухолей (TNF α), фактор роста фибробластов-2,-7 (FGF-2, FGF-7) и эпидермальный фактор роста (EGF). PDGF является мощным хемоаттрактантом для моноцитов/макрофагов, которые на поздних этапах раневого заживления становятся основным источником противовоспалительных цитокинов и фиброгенных факторов роста. Однако TGF β индуцирует накопление компонентов внеклеточного матрикса в зоне повреждения и его избыток может привести к развитию фиброза и рубца. Кератиноциты, прилегающие к области повреждения, также влияют на процесс раневого заживления. Синтезируемые ими различные изоформы TGF β , а также PDGF оказывают регулирующее действие на пролиферацию фибробластов, их миграцию в область повреждения и продукцию ими компонентов внеклеточного матрикса. Пролиферация кератиноцитов в свою очередь регулируется инсулино-подобным фактором роста (IGFs), EGF и FGF-7. [2, 17, 18, 19].

Методология культивирования клеток кожи

Первые данные о возможности хранения человеческой кожи во внешней среде были опубликованы в 1898 году, когда кожные фрагменты были сохранены в течение длительного времени в асцитической жидкости, а затем пересажены обратно донору. Первая зафиксированная трансплантация кератиноцитов была проведена у кроликов и опубликована в 1968 году. В 1983 году Хэфтон с соавторами впервые сообщили об использовании многослойных пластов кератиноцитов для лечения трофических язв, обусловленных хронической венозной недостаточностью. В результате такого лечения у пожилых пациентов трофические язвы эпителизировались в течение 3-5 недель [7, 9].

Возможность применения для заживления ран культур клеток из аутологических клеток кожи, выращенных *in vitro*, была продемонстрирована еще в сороковых годах прошлого века профессором зоологии P.B. Medawar, что положило начало новому направлению в создании биологических покрытий. Однако представленный тогда метод не позволял накапливать достаточное для трансплантации количество аутоклеток. Лишь в середине семидесятых годов J. Rheinwald и H. Green [20, 21] удалось усовершенствовать метод культивирования клеток эпидермиса и дермы (кератиноцитов, фибробластов), который позволил примерно в течение 3-х недель получать из биоптата кожи пласты клеток в 1000 раз превышающие его размеры. Сущность метода заключалась в использовании в качестве субстрата облученных или обработанных митомицином С мышинных фибробластов линии 3T3 и питательной среды DMEM/F12 с сывороткой эмбрионов коров.

Было показано, что фидерные клетки способны образовывать внеклеточный матрикс, который обеспечивает микроокружение, необходимое для роста и функционирования кератиноцитов. Фибробласты в культуре синтезируют большое количество фибронектина и гепаринсульфат-протеогликана, коллагена и других компонентов ВКМ, которые непосредственно могут оказывать действие на прикрепление и пролиферацию кератиноцитов в субоптимальных условиях. Эта техника культивирования сделала возможным использование аутологических кератиноцитов для ускорения заживления ран. О первом успешном клиническом их применении было сообщено в журнале Lancet в 1981 году [22]. Полученные в результате культивирования клетки были использованы для лечения трофических язв, развившихся вследствие хронической веноз-

ной недостаточности. В дальнейшем метод стал внедряться в клиническую практику ведущих ожоговых центров развитых стран мира [9, 13, 23, 24, 25, 26].

В процессе культивирования кератиноцитов сложно получить чистую культуру, чаще всего клеточная масса представляет собой культуру, обогащенную кератиноцитами. Одной из причин этого является невысокая пролиферативная активность кератиноцитов в условиях культуры (1-10% клеток размножаются, тогда как остальные клетки уже приступили к терминальной дифференцировке) по сравнению с фибробластами. Вследствие этого соотношение этих клеток в культуре может изменяться в пользу последних. В то же время, фибробласты оказывают существенное влияние на заживление и эпителизацию ран вследствие их способности продуцировать коллагены I и III типов, фибронектин, ламинин, нидоген, хондроитин-4-сульфат. Фибробласты также продуцируют эпидермальный фактор роста (EGF) и фактор роста кератиноцитов (KGF), которые стимулируют пролиферацию и миграцию кератиноцитов кожи, и могут ускорять восстановление пораженной дермы [27].

Фибробласты растут очень активно и могут в культуре вытеснять кератиноциты, вследствие чего происходит контаминация фибробластами культуры кератиноцитов, для предупреждения которой возникает необходимость селективного удаления фибробластов. Для удаления фибробластов были предложены различные способы, включающие как механическое удаление, так обработку культур протеолитическими ферментами (трипсин, коллагеназа), культивирование кератиноцитов при 32-33 °С с уменьшением количества сыворотки, градиентное центрифугирование, использование моноклональных антител против нормальных фибробластов человека. Однако широкого применения эти методы не нашли по ряду причин, одна из них, и самая главная, - недостаточная эффективность. Достаточно большая, по нашему мнению и мнению ряда других исследователей, эффективность разделения фибробластов может быть достигнута за счет очень аккуратного отделения эпидермиса от дермы после обработки образца кожи диспазой [7].

Культивирование кератиноцитов чаще всего проводят в минимальной среде Игла (MEM), Дальбекко модифицированной среде Игла (DMEM), F-10 и других средах с низким содержанием кальция, в которые добавляется сыворотка эмбрионов коров в качестве комплекса ростовых факторов. Наиболее успешно для выращивания кератиноцитов используются коммерческие синтетические бессывороточные питательные среды с низким содержанием кальция, содержащие факторы роста для пролиферации кератиноцитов. Происходит постоянное совершенствование технологии культивирования разных типов клеток кожи, в основном эпидермальных кератиноцитов: разрабатываются и создаются бессывороточные питательные среды, определяют оптимальные условия, обеспечивающие адгезию клеток и их эффективный рост [15, 28, 29, 30].

Одной из важнейших проблем, которую требуется решать для достижения необходимой биомассы культивируемых клеток и их дальнейшего использования в трансплантации, является замена нестандартного и небезопасного компонента ростовых сред – сыворотки эмбрионов коров. Различные серии сыворотки по составу ростовых факторов могут отличаться, а так же не исключена возможность

их латентной контаминации бактериями и вирусами. Кроме стимуляторов роста в сыворотке могут присутствовать и ингибиторы: фетуин, липопротеин высокой плотности, альфа-глобулин и др., которые могут снижать эффективность формирования колоний и роста клеточных культур. В связи с этим, некоторые партии сыворотки могут быть токсичными для роста кератиноцитов, что приводит к необходимости их предварительного тестирования. Активно проводятся исследования по созданию бессывороточных ростовых сред с определенным химическим составом и необходимыми биологическими факторами роста. Эти среды имеют сложный состав и являются дорогостоящими. К ним относится, например, среда MCDB153 для культивирования кератиноцитов, с добавками – эпидермального фактора роста (EGF), инсулина, гидрокортизона и др [13].

Дальнейшим прорывом в культивировании кератиноцитов, обладающих слабой адгезивной способностью, явилось использование в качестве субстрата для их роста белков ВКМ. Наиболее широко используются покрытия с коллагеном I и IV типов, который обеспечивает лучшее прикрепление и рост кератиноцитов в культуре. Замена фидерных клеток белками ВКМ, дала возможность обеспечить большую безопасность производимого биопрепарата.

Биологические свойства кератиноцитов в культуре

Оптимизация методов культивирования эпидермальных кератиноцитов позволила достаточно близко подойти к детальному изучению биологических свойств этих клеток в условиях культуры: была дана морфофункциональная и фенотипическая характеристика клонам, образуемым кератиноцитами. По пролиферативной способности эти клетки делят на 3 группы клонов: голоклоны, параклоны и мероклоны. Голоклоны (holo – полный, цельный) имеют максимальную способность к пролиферации: за 12 дней они производят от 20 тыс. до 50 тыс. мелких округлых базальных кератиноцитов, тогда как выше лежащие клетки имеют вид терминально дифференцированных. В целом, голоклоны могут проходить в культуре до 100 генераций. Параклоны (para-около) представлены исключительно клетками с низким пролиферативным потенциалом: они проходят не более 15 генераций, после чего переходят к терминальной дифференциации. И, наконец, мероклоны (mero-частично) содержат клетки с разным пролиферативным потенциалом и представляют собой промежуточную стадию между голоклонами и параклонами. На основании данных культивирования можно предположить, что голоклоны образованы стволовыми клетками с максимальным пролиферативным потенциалом, параклоны образованы транзиторными клетками, а мероклоны образованы прогениторными клетками, обладающими меньшим пролиферативным потенциалом, чем стволовые клетки. Было установлено, что наибольшим пролиферативным потенциалом обладают голоклоны, полученные из клеток волосяного фолликула, что может быть важным свидетельством в пользу присутствия там стволовых клеток. В настоящее время получены данные, которые позволяют поставить под сомнение существующую модель поддержания эпидермального гомеостаза. Согласно результатам ученых Кембриджского университета, новая модель гомеостаза эпителиальной ткани у взрослых мышей в отсутствие повреждения предполагает наличие только одного типа прогениторных стволовых клеток, которые подвергают как симметричному, так и ассиметричному делению,

при котором каждая клетка базального слоя может дать начало одной дочерней (активно делящейся) и одной аналогичной клетке, либо двум дочерним, либо двум аналогичным клеткам [28]. При этом большинство эпителиальных предшественников дают начало двум клеткам базального уровня. Данное исследование было проведено в условиях нормального функционирования и возобновления эпидермиса мыши зоны спины и хвоста, однако, вопрос восстановления и функционирования стволовых клеток кожи в условиях повреждения или воспаления остается открытым.

Перспективным направлением исследований для получения «обогащенных культур кератиноцитов», является выделение и культивирование базальных кератиноцитов и стволовых клеток кожи [4, 16, 18, 19, 27]. Один из подходов – сепарация кератиноцитов по их пролиферативной активности с использованием различных факторов роста [16] с определением специфических маркеров этих клеток. Охарактеризовано множество маркеров, как поверхностных, так и функциональных, экспрессирующихся на определенной стадии дифференцировки кератиноцитов [12, 20, 22]. Выявление специфических маркеров кератиноцитов (цитокератин 1, 6, 10, 11, 14, 18) и стволовых клеток эпидермиса (CD49f и др.), позволяет проводить фенотипирование культивируемых клеток и проводить их селекцию в условиях культуры. Для эффективной идентификации стволовых клеток ряд авторов предлагает использовать несколько факторов совместно [22]. В то же время, специфические маркеры, позволяющие выделить достаточно чистую популяцию стволовых клеток кожи, на настоящий момент не определены.

Выделение и изучение стволовых клеток эпидермиса затрудняется из-за отсутствия их надежных морфологических маркеров. Один из перспективных путей – использование моноклональных антител, которые могли бы селективно распознать антигены стволовых клеток [12, 20, 22, 27]. Как правило, стволовые и транзиторные клетки кожи прочно связаны с базальной мембраной. В процессе дифференцировки *in vivo* базальные кератиноциты меняют свои адгезивные свойства, теряют связь с базальной мембраной и переходят в вышележащие слои эпидермиса. Благодаря этому свойству был разработан метод выделения базальных кератиноцитов путём их селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса. Авторами [39] была продемонстрирована степень взаимодействия различных субтипов кератиноцитов первичной культуры с белками базальной мембраны (коллагенами I и IV типов, ламинином-2 α 4, фибронектином и матригелем). Показано, что популяция кератиноцитов содержит клетки с различной способностью к адгезии к перечисленным белкам.

Факторы роста, используемые в настоящее время как компоненты питательных сред

Эпидермальный фактор роста (EGF). EGF в настоящее время является одним из наиболее широко используемых компонентов питательных сред для культивирования кератиноцитов. Благодаря его использованию удалось увеличить число пассажей клеток в 2-3 раза. Участие EGF в передаче регуляторных сигналов в клетку осуществляется за счет взаимодействия с высокоаффинными рецепторами, которые составляют 5-10% от общего количества рецепторов EGF. К числу ранних клеточных реакций на действие этого ростового фактора относятся фосфорилирование рецептора EGF, образование инозитолфосфата,

выход Ca^{2+} из внутриклеточного депо, повышение внутриклеточного pH. Было показано, что в присутствии EGF колонии кератиноцитов достигают большего размера, являются менее стратифицированными, культура длительно поддерживается в фазе экспоненциального роста [15, 29, 31, 32]. Взаимодействуя со многими митогенными факторами, EGF стимулирует также и пролиферативную активность через активацию орнитиндекарбоксилазы, фермента участвующего в пролиферации клеток и фосфолипазы А, что приводит к инициации каскада арахидоновой кислоты [7].

Фактор роста кератиноцитов (KGF). В связи с разработкой питательных сред для кератиноцитов и установлением оптимальных условий для их роста начались исследования по выделению специфических факторов роста кератиноцитов и их анализу. По первичной структуре KGF имеет сходство с кислым и основным FGF, однако свойства его еще до конца не изучены. KGF секретируется стромальными фибробластами в культуре и экспрессируется *in vivo* в области дермы, но не в эпидермисе, что позволяет предположить о его участии в паракринной регуляции пролиферации кератиноцитов. Сравнительное изучение KGF и EGF показало, что оба фактора являются мощными стимуляторами пролиферации первичных и вторичных культур кератиноцитов человека. Этот эффект зависел как от дозы фактора, так и от концентрации Ca^{2+} в питательной среде. Максимальный эффект KGF как и EGF наблюдался при низком содержании Ca^{2+} (0,05 мМ) [33].

Факторы роста фибробластов (bFGF). Основной фактор роста фибробластов (bFGF) стимулирует пролиферативную активность как кератиноцитов, так и фибробластов. В культурах клеток крайней плоти была показана высокая чувствительность кератиноцитов к *ab*FGF и bEGF, но последний был более сильным митогеном для кератиноцитов, а *ab*FGF – для фибробластов [7].

Инсулин. Митогенная активность инсулина реализуется через трансмембранные рецепторы клеток посредством регуляции в них нескольких метаболических процессов с вовлечением глюкозы, липидов, белков. Взаимодействие инсулина с его рецепторами также активирует представители семейства митоген-активированных белковых протеинкиназ и в результате чего индуцируется клеточная пролиферация в культуре. Эти результаты свидетельствуют о том, что кератиноциты в культуре экспрессируют рецепторы к инсулину. Показано, что культивирование кератиноцитов с добавлением инсулина поддерживает их морфологический фенотип. Инсулиноподобный ростовой фактор (IGFs) является потенциальным митогеном для кератиноцитов, ответ на него опосредуется через IGF-1R рецепторы, которые могут активироваться и самим инсулином при некоторых условиях [34, 35].

Липополисахарид (LPS). В ряде работ было установлено, что LPS так же способен оказывать прямое или опосредованное действие на функционирование клеток эпителия. LPS *P. aeruginosa* приводит к увеличению активности NF- κ B в эпителиальных клетках в 3-5 раз, что также сопровождается значительным ростом пролиферативной активности кератиноцитов [36]. LPS *E. coli* в концентрации от 0,05 до 0,5 мкг/мл приводит к значительному росту пролиферативной активности фибробластов через 6 дней и позже после добавления в культуру, тогда как действие на кератиноциты регистрировалось уже на 3-й день в базальной среде и на 5-й день в ростовой среде [37]. Влияние LPS на пролиферативную активность клеток

эпителия может быть связано со способностью LPS и липотейхоевых кислот индуцировать продукцию противовоспалительных цитокинов (TNF α и IFN γ) в культуре кератиноцитов, которое оказывают прямое действие на функциональные параметры этих клеток. Липотейхоевые кислоты и компоненты клеточной стенки грамположительных бактерий приводят к формированию оболочки из кератина в кератиноцитах и увеличению активности транскламиназы, стимулируя терминальную дифференцировку и аккумуляцию кератиновых волокон. LPS и провоспалительные цитокины (IL-1 β и TNF α) значительно увеличивают экспрессию рецептора к KGF, влияя на пролиферацию и миграцию клеток эпителия. В связи с этим пролонгированное действие этого фактора может способствовать накоплению в культуре терминально дифференцированных клеток, не способных к пролиферации и снижать общую пролиферативную активность кератиноцитов в культуре [38].

Имеющиеся данные литературы свидетельствуют, что различные факторы роста действуют на кератиноциты кооперативно и их эффект также зависит от разных внеклеточных факторов и условий культивирования клеток, источника, из которого получены клетки и многих других еще подлежащих исследованию факторов. Суммарный эффект на культивируемые кератиноциты может отличаться от эффекта каждого конкретного фактора роста и поэтому необходимо проведение дальнейших исследований по установлению оптимального кооперативного их воздействия на пролиферацию кератиноцитов в условиях культуры.

Использование культур клеток кожи в создании клеточных препаратов для лечения термической травмы: успехи и проблемы

По данным ряда исследователей, эпидермальные кератиноциты *in vitro* способны к реализации различных программ дифференцировки, в зависимости от условий культивирования. Кроме того, они обладают высокой степенью лабильности и мощными резервными функциями, что подтверждается многолетними наблюдениями за пересаженными аутопластами кератиноцитов. Доказано, что кератиноциты способны модифицироваться морфологически (в частности, по положению кератина K-9) и становиться идентичным клеткам в зонах трансплантации, вне зависимости от места забора клеток для выращивания пласта. Трансформация начинается уже со 2-й недели и к 4-6 месяцам пересаженные клетки ничем не отличаются от кератиноцитов зоны трансплантации с формированием стабильного фенотипа [40].

Ранее считалось, что кератиноциты не обладают иммуногенными свойствами, в связи с этим предпочтение отдавалось использованию аллогенных эпидермальных пластов с целью раннего закрытия ожоговой раны, так как при культивировании теряются клетки Лангерганса. Но накопленный практический опыт показал, что полное отторжение трансплантата происходит через 10-20 дней после пересадки с образованием плотного мононуклеарного инфильтрата, а применение циклоспорина-A значительно удлинило время выживаемости трансплантата, что свидетельствует об участии факторов иммунной системы в этом процессе. Реакция отторжения трансплантата главным образом реализовывается с участием клеток Лангерганса реципиента. Эти клетки инфильтрируют трансплантируемый пласт, после чего запускают цепь реакций иммунного ответа.

Доказано, что кератиноциты в норме, помимо факто-

ров роста продуцируют и другие биологически активные факторы: интерфероны, супрессорные факторы и интерлейкины (IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-20). Кроме того, кератиноциты сами так же подвергаются воздействию со стороны клеток иммунной системы – на их поверхности присутствуют рецепторы к IL-4, IL-13, IL-17). Эти данные указывают на способность кератиноцитов не только реагировать на стимулы, образующиеся при формировании иммунного ответа, но так же и самостоятельно регулировать этот процесс.

Было также показано, что кератиноциты в культуре могут экспрессировать антигены не только HLA I, но и II класса. Так же было установлено, что антигены HLA I класса также участвуют в процессе экспрессии комплекса HLA-пептид на клеточную мембрану, как и антигены II класса [14]. Эти данные доказывают возможность участия кератиноцитов в индукции иммунного ответа с помощью механизма отличного от продукции цитокинов и биологически активных факторов.

В настоящее время в медицинской практике лечения ожоговых больных используется как ауто-так и аллогенная кожа, являющаяся оптимальным естественным покрытием. Как правило, аллогенная кожа включает в себя слой дермы и эпидермиса. Лоскуты аллогенной кожи хранят при температуре от 0 до 8 °C в ростовых средах в присутствии антиоксидантов и криопротекторов. Для более длительного хранения используют лиофильную сушку, помещая лоскуты кожи в раствор глицерина и подвергая их глубокому замораживанию. Отечественными, так и зарубежными компаниями широко применяются так же препараты дермы. Их консервация так же происходит методом лиофильной сушки. Обычно препараты изготавливаются из свиной кожи (препараты Свидаерм и Аллоаск Д) или из донорской кожи человека – Аллодерм (Alloderm), Интегра (Integra) и Дермаграфт (Dermagraft). К природным покрытиям относят и амниотические мембраны, полученные от человека или животных. Лечебное свойство данного типа покрытия обусловлено наличием в составе амниотической мембраны компонентов внеклеточного матрикса (коллагенов, фибронектина, гликозаминов) и ростовых факторов. К недостаткам амниотических мембран можно отнести невозможность длительного хранения (на раневые поверхности следует накладывать только свежие мембраны) [2, 42].

Накопленный опыт заместительной клеточной терапии при использовании культур эпидермальных кератиноцитов и их предшественников в клинике показал, что применение данной технологии сопряжено с рядом проблем. Основными недостатками метода явились длительность подготовки подложек с культивированными клетками кожи и непредсказуемое их приживание. Препятствием для широкого использования предложенного метода стала высокая стоимость лечения. Так стоимость подложки с культивированными аутокератиноцитами (компания Bisurface Technology, США), необходимой для лечения одного больного, составляет от 10 до 160 тыс. долларов в зависимости от площади раны [2]. Сроки, необходимые для изготовления достаточного по площади трансплантата, составляют 3-4 недели, что увеличивает риск развития инфекционных осложнений ожоговой болезни и удлиняет время пребывания пациентов в стационаре. Серьезным ограничением являются и ежегодичес-

кие трудности в получении «обогащенных» культур кератиноцитов, несмотря на большое содержание их в эпидермисе взрослого человека (90%). Одной из причин этого является невысокая пролиферативная активность этих клеток в условиях культуры (1-10% клеток размножаются, а остальные уже приступили к терминальной дифференцировке) по сравнению с фибробластами. Вследствие этого соотношение их в культуре может изменяться в пользу последних. В то же время фибробласты оказывают существенное влияние на заживление ран и на эпителизацию, вследствие их способности продуцировать коллагены I и III типов, фибронектин, ламинин, нидоген, хондроитин-4-сульфат. Фибробласты также продуцируют EGF и KGF, которые стимулируют пролиферацию и миграцию кератиноцитов кожи, и могут ускорять восстановление пораженной дермы. В связи с этим для закрытия раневых поверхностей часто используют также и культуры фибробластов дермы. Они имеют ряд преимуществ перед кератиноцитами. Фибробласты менее требовательны к составу питательных сред при культивировании, легко подвергаются пассированию. Фибробласты активно пролиферируют и синтезируют коллаген и гликозамины, которые входят в состав клеточного матрикса, являясь необходимым фактором для дифференцировки и формирования межклеточных связей с кератиноцитами. Для трансплантации культуры фибробластов на раневую поверхность их культивируют на специальной мембране. Такой биопрепарат – «Карбосил-П» разработан в России, мембрана представляет собой кремний-органический полимер. Проведенные клинические исследования в Институте хирургии им. А. В. Вишневского РАМН показали, что трансплантация этих клеток на термические раны 3-й и 4-й степени способствует ускорению эпителизации и заживлению пограничных ожогов уже через 6-8 дней после операции. Трансплантированные аллофибробласты стимулируют пролиферацию сохранившихся дериватов кожи и элементов сосочкового слоя, что обеспечивает скорейшее восстановление кожного покрова. Есть данные о применении культивируемых аллофибробластов в лечении длительных не заживающих донорских ран. При этом длительное заживление донорских ран ведёт к образованию гипертрофических и келоидных рубцов, что нежелательно. Поэтому предпочтение при лечении ожоговых больных с использованием заместительной клеточной терапии, все же отдается культурам кератиноцитов [4, 5, 18, 39]. Наряду с аутологичными культурами кератиноцитов и фибробластов в медицине находят применение и аллогенные. Некоторые исследователи считают их наиболее перспективными биопрепаратами, которые могут быть эффективно использованы в регенеративной клеточной терапии ожоговых больных. Преимуществами данного метода являются быстрое закрытие раневых поверхностей, не требующее ожидания трёхнедельного срока, необходимого для получения подложек с культивированными аутокератиноцитами, а так же возможность создания банков культур аллогенных клеток кожи [43].

Многолетний опыт применения культуральных ауто-трансплантантов показал, что полная приживаемость их в оптимальных условиях при лечении тяжелых ожогов составляет около 60%, а использование сложных ауто-трансплантантов (содержащих соединительнотканые компоненты) порой приводит к их нестабильности в глубокой ожоговой ране. Культуральные ауто-трансплантанты край-

не неустойчивы к инфекции, однако, при использовании смешанной культуры ауто+аллокератиноцитов – достигается хороший клинический эффект [44].

Также были разработаны и используются множество коммерческих препаратов, для закрытия раневых поверхностей. Как правило, это мембраны, состоящие из полимерной основы. По устойчивости синтетические покрытия можно разделить на биодеградирующие (рассасывающиеся) состоящие из природных полимеров (желатина, коллагена, хитозана) и биоинертные – состоящие из синтетических материалов.

Важным моментом в эффективном использовании накопленной в процессе культивирования биомассы клеток кожи для лечения ожоговых больных является качество субстрата для прикрепления, роста клеток и его биосовместимости при трансплантации. В настоящее время активно ведутся работы по созданию комплексных препаратов, представляющих собой синтетические или природные покрытия, содержащие живые кератиноциты и фибробласты. Появилось новое направление, которое предусматривает использование для закрытия раневых поверхностей так называемых эквивалентов кожи, которые включают не только культивированные кератиноциты, но и дермальный эквивалент, состоящий из биодеградируемых материалов: коллагена, желатина, гликозамин-гликанов и др. Современные «живые эквиваленты кожи» представляют собой порой ткане-инженерные конструкции на основе кератиноцитов, фибробластов и коллагеновой матрицы. Одна из первых таких конструкций была предложена в 1983 году – кератиноциты выращивали на поверхности гелеобразного «дермального эквивалента», состоявшего из смеси коллагена, плазмы, ростовой среды и фибробластов кожи. Преимуществом дермального эквивалента является то, что клетки в нем находятся в активном функциональном состоянии, близком к таковому в коже. В США был лицензирован и разрешен FDA к применению в клинической практике первый коммерческий тканевой продукт, состоящий из коллагеновой матрицы и донорских аллогенных фибробластов и кератиноцитов – Apligraf. Продукт выпускается компанией Organogenesis Inc. Пересадку этого биопокрытия уже получили около 80 000 пациентов в США. Комплекс Apligraf состоит из биодеградируемой коллагеновой матрицы на основе бычьего коллагена, аллогенных донорских кератиноцитов и фибробластов [45].

Некоторые клеточные препараты, в которых используются аллогенные фибробласты и кератиноциты, в настоящее время выпускаются в больших масштабах за рубежом (в США – Epicel, Apligraf, OrCel и др.; в Европе – CellSpray, ReCell, CrioCell, Autoderm и др.; в странах СНГ – «Фибродесмис», Москва; «Фибропор», Санкт-Петербург). Однако не существует универсального биопрепарата эквивалента кожи, подходящего для использования во всех фазах раневого процесса при ожогах различной глубины [2].

Таким образом, имеющиеся в литературе данные указывают на высокую актуальность использования культур кератиноцитов человека в лечении ожоговых больных. Однако требуется дальнейшее совершенствование, оптимизация и стандартизация условий приготовления культуры, состоящих из клонов кератиноцитов и их предшественников, обладающих большей пролиферативной активностью, чем другие клетки эпидермиса. Это, в свою очередь, обеспечивает необходимое накопление биомассы клеток для их последующей трансплантации ожоговым больным.

Заключение

Реконструкция повреждённого кожного покрова за счёт выращенных в культуре эпидермальных кератиноцитов и фибробластов представляет собой новый и перспективный способ лечения обширных поражений кожи. Однако реализация метода реконструкции кожи с использованием клеточных технологий связана со значительными методическими трудностями, вследствие чего он не так широко применяется на практике как старый метод аутодермотрансплантатов. Трудности эти заключаются, во-первых, в освоении и совершенствовании методов культивирования кератиноцитов *in vitro* и, во-вторых, в разработке техники трансплантации выращенных клеток для реконструкции эпидермиса *in vivo*. Не смотря на это, уже достигнуты большие успехи, связанные с разработкой бессывороточных ростовых сред и методов культивирования клеток. В настоящее время во многих странах интенсивно разрабатываются биопрепараты на основе дермального эквивалента кожи (кератиноциты и фибробласты) для внедрения в клиническую практику лечения ожоговых больных и использования при других кожных патологиях.

Литература

1. Блинова, М. И., Колесникова, Н. В., Юдинцев, Н. М. и др. Использование культивируемых клеток кожи человека для лечения трофических язв // Информационный бюллетень // Информационный бюллетень. 2006. С. 33 – 43.
2. Волков, А. В. Краткий обзор коммерчески доступных клеточных продуктов для восстановления кожных покровов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006. № 4(6). С. 62 – 65.
3. Кузнецов, Н. М., Мазка, О. Н., Шанина, Л. Н. и др. Применение культивированных клеток для закрытия дефектов кожи // Меж. симп. "Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи". Саратов, 1998. С. 20.
4. Малахов, С. Ф., Парамонов, Б. А. и др. Новые подходы к лечению тяжелых ожогов: трансплантация выращенных в культуре кератиноцитов // Военно-медицинский журнал. 1997. Т. 318. № 9. С. 16 – 19.
5. Малахов, С. Ф., Емельянов, А. В., Терских, В. В. и др. Ауто трансплантация выращенных вне организма эпидермальных кератиноцитов с целью лечения обширных ожогов // Вестник хирургии им. Грекова. 1993. № 4. С. 59 – 62.
6. MacNeil, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin // Nature. 2007. Vol. 445. № 22. P. 874 – 880.
7. Терских, В. В., Васильев, А. В. // Эпидермальные кератиноциты человека и животных: проблемы культивирования и трансплантации. М.: Наука, 1995.
8. Хэй, Р. Культура животных клеток / под ред. З. Фрешни. М.: Мир, 1989.
9. Shaw, A.J. Epithelial cell culture. The practical approach series. – Series ed. D. Richwood, B.D. Hames. – Reconstruction of human skin epidermis *in vitro*. 1996. P. 179 – 200.
10. Blau, H.M., Brazelton, T.R., Weissman, J.M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? // Cell. 2001. Vol. 105. P. 829 – 841.
11. Alonso, L., Fuchs, E. Stem cells of the skin epithelium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 11830 – 11835.
12. Иванов, А. А., Гладских, О. П., Кузнецова, А. В. и др.

Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в патологии // Молекулярная медицина. 2005. № 2. С. 16 – 20.

13. Mohamed Badawy Abdel-Naser, Marwa Abdallah, et al. Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology // Egyptian Dermatology Online Journal. 2005. Vol. 1. № 2. P. 1 – 33.
14. Гусак, В. К., Николенко, Ю. И., Фисталь, Э. Я. и др. Иммунная компетентность кожи как один из механизмов развития аутоагрессии при термических повреждениях // Вестник гигиены и эпидемиологии. 2000. Т. 4. № 2. С. 256 – 261.
15. Gross, M., Furstenberger, G., Marks, F. Isolation, characterization, and *in vitro* cultivation of keratinocyte subfractions from adult NMR1 mouse epidermis: Epidermal target cells for phorbol esters // Ibid. 1987. Vol. 171. № 2. P. 460 – 474.
16. Preciado, D., Caicedo, E., Jhanjee, R. et al. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide induction of keratinocyte proliferation, NF-kappa B, and cyclin D1 is inhibited by indomethacin // J Immunol. 2005. Vol.174. № 5. P. 2964 – 2973.
17. Tsuboi, R., Sato, C., Kurita, Y. et al. Keratinocyte Growth Factor (FGF-7) Stimulates Migration and Plasminogen Activator Activity of Normal Human Keratinocytes // Journal of Investigative Dermatology. 1993. Vol. 101. P.49 – 53.
18. Dawson, R., Upton, Z., Malda, J. Preparation of cultured skin for transplantation using insulin-like growth factor 1 in conjunction with insulin-like growth binding protein 5, epidermal growth factor and vitronectin // Transplantation. 2006. Vol. 81. № 12. 1668 – 76.
19. Bourdeau, P., Cadiot, C., Viac, J. et al. Upregulation of TNF-alpha Production by IFN-gamma and LPS in Cultured Canine Keratinocytes // Vet Res Commun. 2007. № 1. P. 835 – 846.
20. Rheinwald, J.C., Green, H. et al. Serial cultivation of stains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells // Cells. 1975. № 6. P. 331 – 344.
21. Basset-Seguin, N., Culard, J.F., Kerai, C. et al. Reconstructed skin in culture: a simple method with optimal differentiation // Differentiation. 1990. Vol. 44. № 3. P. 232 – 238.
22. O'Connor, N.E., Mulliken, J.B., Banks-Schleger, S. et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells // Lancet. 1981. Vol. 1. P. 75 – 78.
23. Смирнов, С. В., Киселев, И. В., Васильев, А. В. и др. Современные методы клеточной терапии при лечении ожогов // Хирургия. 2003 № 12. С. 58 – 62.
24. Смирнов, С. В., Киселев, И. В., Роговая, О. С. и др. Восстановление кожного покрова путем трансплантации выращенных кератиноцитов // Бюл. exper. биол. 2003. вып. 135. С. 711 – 713.
25. Kumagai, M. Clinical application of autologous cultured epithelia for the treatment of burn wounds and burn scars // Plast. Reconstr.Surg. 1988. № 1. P. 99 – 111.
26. Малахов, С. Ф., Васильев, А. В., Терских, В. В. и др. Перспективы биотехнологических методов восстановления кожных покровов // Межд.симп. "Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи".Тула, 1996. С. 6 – 7.
27. Васильев, А. В., Волошин, А. В., Воротеляк, Е. А. и др. Миграция колоний эпидермальных кератиноцитов человека в культуре // Докл. РАН. 1993. Т. 329. № 2. С. 232 –

235.

28. Clayton, E., Doupe, D.P., Klein, A.M. et al. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis // *Science*. 2007. Vol. 446. № 8. P. 185 – 189.

29. Ekuni, D., Firth, J.D., Putnins, E.E. Regulation of epithelial cell growth factor receptor protein and gene expression using a rat periodontitis model // *J Periodontal Res*. 2006. Vol. 41. № 4. P. 340 – 349.

30. Staiano-Coico, L., Higgins, P.J., Darzynkiewicz, Z. et al. Human keratinocyte culture. Identification and staging of epidermal cell subpopulations // *J. Clin. Invest*. 1986. Vol. 77. № 2. P. 396 – 404.

31. Papini, S., Cecchetti, D., Campani, D. et al. Isolation and clonal analysis of epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture // *Stem cells*. 2003. № 21. P. 481 – 494.

32. River, M., Safonova, I. Differential Expression of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Subtype the Differentiation of human Keratinocytes // *Journal of Investigative Dermatology*. 1998. Vol. 111. P. 1116 – 1121.

33. Michelson, M. et al. Keratinocyte growth factor stimulates bronchial epithelial cell proliferation in vitro and in vivo // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1999. Vol. 277. Issue 4. P. 737 – 742.

34. Musselman, K., Alexandron, B., Kane, B. Maintenance of the keratocyte phenotype during cell proliferation stimulated by insulin // *J Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280. № 38. P. 32634 – 32639.

35. Dawson, R., Upton, Z., Malda, J. Preparation of cultured skin for transplantation using insulin-like growth factor 1 in conjunction with insulin-like growth binding protein 5, epidermal growth factor and vitronectin // *Transplantation*. 2006. V. 81. № 12. P. 1668 – 1676.

36. Oonuma, T., Morimatsu, M., Ochiai, K., Iwanaga, T., Hashizume, K. Role of NF-kappaB in constitutive expression of MAIL in epidermal keratinocytes // *J Vet Med Sci*. 2007. Vol. 69. № 3. P. 279 – 284.

37. Yang, H., Kaneko, M., He, C., Hughes, M.A., Cherry, G.W. Effect of a lipopolysaccharide from *E. coli* on the proliferation of fibroblasts and keratinocytes in vitro // *Phytother. Res*. 2002. Vol. 16. № 1. P. 43 – 47.

38. Ibisch, C., Bourdeau, P. et al. Upregulation of TNF- α Production by IFN- α and LPS in Cultured Canine Keratinocytes: Application to Monosaccharides Effects // *Vet Res Commun*. 2007. № 1. P. 835 – 846.

39. Спичкина, О. Г., Калмыкова, Н. В., Кухарева, Л. В. и др. Выделение популяции базальных кератиноцитов человека путем их селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса // *Цитология*. 2006. № 10. С. 841 – 847.

40. Швед, Ю. А., Кухарева, Л. В., Зорин, И. М. и др. / Взаимодействие культивируемых клеток кожи с разными структурными формами коллагена, нанесенного на полилактидную матрицу // *Цитология*. 2006. № 1. С. 32 – 39.

41. Албанова, В. И., Когергина, Л. Д. // *Международ. конф. Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов*. М., 1995. С. 112 – 113.

42. Basset-Seguín, N., Culard, J.F., Kerai, C. et al. Reconstructed skin in culture: a simple method with optimal differentiation // *Differentiation*. 1990. Vol. 44. № 3. P. 232 – 238.

43. Abd El-A Iz, Hanafy, A., Ahmad, M.D et al. Cultured allogenic keratinocyte grafts in the treatment of burns: preliminary report // *Egypt. J. Plast. Reconstr. Surg*. 2002. Vol. 26. P. 161 – 165.

44. Garcia Fernandez, E., Bejar, J.M. Maruri, M. et al. Histological and immunohistochemical evaluation of human cultured epidermal cells // *Annals of Burns and Fire Disasters*. 1997. Vol. 10. № 1.

45. Kirsner, R., Trent, J. Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent // *Int J Clin Pract*. 1998. Vol. 52. № 6. P. 408 – 413.