



Лаборатория клеточных культур ГБУЗСО ИМКТ

Заведующий лабораторией к.б.н. Фадеев Ф.А.

Клеточные технологии в терапии ожогов кожи

Фадеев Ф.А., Сергеев А.Г.

ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург
ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Екатеринбург

Ожоги являются одним из самых распространенных травматических поражений кожи: воздействие высокой температуры приводит к местной денатурации белков и, как следствие, к гибели клеток. Помимо этого, ожоговая травма осложняется патофизиологическим эффектом, вызванным выделением в области раны провоспалительных цитокинов. Продолжительная воспалительная реакция и колонизация раны бактериями препятствуют ее заживлению и могут сопровождаться развитием ожоговой болезни. Кроме того, заживление глубоких ожогов обычно носит длительный характер и сопровождается формированием рубцов.

Восстановление целостности кожных покровов на ожоговой поверхности включает процессы грануляции и эпителизации. Ключевую роль в формировании грануляционной ткани, являющейся первичным покровным слоем на раневой поверхности, играют фибробласты кожи. Процесс эпителизации также происходит при непосредственном участии фибробластов, которые формируют поверхность для последующего нарастания эпителия, и, кроме того, являются источником хемотаксических сигналов, направляющих пролиферацию и миграцию кератиноцитов от края раны к ее центру [21].

Фибробласты продуцируют компоненты внеклеточного матрикса: коллаген, ламинин, тенасцин, хондроитин-сульфат, фибронектин, протеогликан, нидоген, непосредственно участвуя в формировании базальной мембраны кожи. Кроме того, фибробласты секретируют широкий спектр цитокинов, к числу которых относятся:

– основной фактор роста фибробластов (bFGF, FGF2), стимулирующий рост всех типов клеток кожи, продукцию фибронектина, коллагена и эла-

стина;

- фактор роста кератиноцитов (KGF), усиливающий заживление и эпителизацию ран;
- эпидермальный фактор роста (EGF), усиливающий пролиферацию и миграцию кератиноцитов;
- фактор роста фибробластов (FGF-10), стимулирующий миграцию, пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток;
- трансформирующий фактор роста (TGF α), стимулирующий ангиогенез;
- трансформирующий фактор роста (TGF β), стимулирующий хемотаксис фибробластов и продукцию ими коллагена и фибронектина;
- фактор роста нервов (NGF), который активно влияет на рост, развитие и функциональную активность нейронов периферической нервной системы [22].

Продуцируемые фибробластами факторы роста стимулируют пролиферацию кератиноцитов, которые, в свою очередь, синтезируют факторы роста, влияющие на активность фибробластов: основной фактор роста фибробластов (FGF2) и интерлейкин-1, усиливающий синтез KGF [17, 21]. Таким образом, фибробласты и кератиноциты формируют друг с другом циклические паракринные связи. В экспериментах по совместному культивированию фибробластов и кератиноцитов была подтверждена их способность к взаимной стимуляции роста и деления. Было также показано, что стимулирующий эффект при бесконтактном культивировании фибробластов и кератиноцитов в общей питательной среде был значительно ниже, чем при смешанном культивировании обоих типов клеток. Однако при искусственном повышении уровня цитокинов, секретируемых клетками, их взаимная активация наблюдалась даже при раздельном выращивании обеих культур. На основании полученных результатов авторами был сделан вывод, что прямой контакт между кератиноцитами и фибробластами обеспечивал формирование микросреды, в которой создавалась достаточно высокая для взаимной стимуляции концентрация цитокинов [20].

Для получения культур фибробластов и кератиноцитов источником клеточного материала являются биоптаты кожи. Образцы кожи разделяют по линии базальной мембраны. Верхний, эпидермальный слой, является источником кератиноцитов; нижний слой (дерма) используется для выделения фибробластов. В настоящее время разработано большое количество методик получения культур фибробластов и кератиноцитов, однако большая часть этих методик сводится к единому принципу. Кожный материал механически измельчается, после чего подвергается ферментативной обработке трипсином и/или коллагеназой, что приводит к дезинтеграции межклеточных связей. Полученная клеточная масса отмывается от межклеточного матрикса и остатков ферментов, после чего суспендируется в питательной среде. Культивирование клеток обычно осуществляется в виде монослоя в среде Игла с добавлением 5–10% телячьей эмбриональной сыворотки при 37°C в пластиковых культуральных флаконах.

Оригинальный способ получения культур фибробластов был разрабо-

тан Huschtscha et al. (2012). Целые фрагменты кожи подвергались трипсинизации, после чего помещались в чашки Петри и культивировались под слоем питательной среды. Фибробласты с кожных фрагментов мигрировали на поверхность пластика и формировали монослой. Каждые 2–3 недели фрагмент кожи переносили на новую чашку Петри, и эта процедура повторялась до истощения пула фибробластов в образце. По данным авторов, преимуществом их методики является увеличение количества выделяемых клеток на 1–2 порядка по сравнению с другими методиками [16]. Недостатком является контаминация первых порций фибробластов кератиноцитами.

Пролиферативная активность первичных клеточных культур является ограниченной. Данный феномен получил название предела Хейфлика, и для фибробластов предел составляет 50 ± 10 делений. Как правило, культура фибробластов выдерживает 3–5 пересевов, после чего деление клеток прекращается. На величину лимита Хейфлика оказывают влияние способ культивирования фибробластов, тип используемых питательных сред и сывороток, возраст донора, область проведения биопсии. Фибробласты, полученные от пожилых доноров, делятся медленнее и, кроме того, наблюдается более быстрое старение клеточных культур. Это связано с тем, что в клеточных культурах, полученных от пожилых доноров, преобладают более крупные зрелые фибробласты [18].

Возможность использования культур кератиноцитов для заживления ран рассматривалась еще с середины прошлого века. Препятствием к использованию кератиноцитов являлась их ограниченная пролиферативная активность и быстрая дифференцировка. Культуру кератиноцитов первоначально удалось получить лишь при их совместном культивировании с облученными фибробластами мыши, благодаря чему цитокины фибробластов стимулировали пролиферацию кератиноцитов [13].

Первый опыт успешного применения фибробластов при лечении ожогов кожи у человека был получен O'Conner в 1981 г. [6].

Пересаженные фибробласты синтезируют компоненты внеклеточного матрикса дермы и, кроме того, секретируют цитокины, стимулирующие пролиферацию собственных фибробластов реципиента. Это обеспечивает ускорение восстановления как самой дермы, так и эпидермального слоя за счет стимуляции фибробластами миграции и пролиферации кератиноцитов [5]. Дополнительным стимулом к использованию фибробластов в медицинской практике являются:

- сохранение ими диплоидного кариотипа в клеточной культуре;
- отсутствие у них антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС II) и низкий уровень экспрессии МНС I, что значительно снижает интенсивность возможных реакций отторжения трансплантата [19];
- отсутствие сведений о возможности опухолевого перерождения фибробластов [4];
- относительная простота культивирования и нетребовательность к питательным средам и факторам роста.

Кератиноциты после приживления в области раны начинают секретировать цитокины (FGF2, TGF α) и элементы внеклеточного матрикса (фибронектин, ламинин и др.). Совместное действие цитокинов и компонентов внеклеточного матрикса, выделяемых трансплантированными кератиноцитами, обеспечивает ускорение миграции и прикрепления собственных кератиноцитов реципиента из краевой зоны раны. Кроме того, кератиноциты стимулируют развитие сосудов [8]. Таким образом, эффект от трансплантации кератиноцитов заключается в ускоренной эпителизации раневой поверхности. В то же время, терапия кератиноцитами может оказаться малоэффективной при лечении глубоких ожогов. Пересаженные кератиноциты не оказывают существенного влияния на восстановление дермы, что может привести к стягиванию краев раны, ее рубцеванию и отслоению нарастающего слоя эпидермиса вследствие его слабого контакта с подлежащей тканью [9]. В связи с этим значительно большее распространение получили методики трансплантации с использованием культуры фибробластов кожи.

Для ускорения заживления ожоговых ран могут применяться культуры кератиноцитов и фибробластов как аллогенного, так и аутологичного происхождения. Преимуществом аутологичных культур является более продолжительный клинический эффект, исключается риск передачи реципиенту инфекционных агентов и развития аллергических реакций. Кроме того, аутологичные культуры обеспечивают лучший косметический эффект после использования. Основным недостатком аутологичных клеток является необходимость их длительного культивирования (от трех до шести недель) для получения достаточного количества клеточного материала.

Использование аллогенных культур также имеет ряд неоспоримых преимуществ. Клетки, выделенные из кожи здоровых доноров, обладают хорошим ростовым потенциалом, и, кроме того, существует возможность заблаговременной подготовки клеточного материала для трансплантации. Однако срок существования аллотрансплантата, несмотря на его стимулирующую активность в отношении собственных клеток реципиента, весьма ограничен. По истечении нескольких недель чужеродные фибробласты не обнаруживаются в ране даже при отсутствии видимых признаков отторжения [12].

Таким образом, терапевтический эффект от применения аллогенных клеточных культур при лечении ожоговых ран связан, в основном, с секрецией ими цитокинов и компонентов межклеточного матрикса, что обеспечивает ускорение миграции, деления и дифференцировки собственных клеток кожи реципиента. Кроме того, трансплантируемые клетки подавляют выделение провоспалительных и стимулируют выделение противовоспалительных цитокинов [7]. В то же время, колонизация этими клетками области раны носит временный характер, и через определенное время они подвергаются элиминации, замещаясь собственными клетками реципиента.

Одним из перспективных направлений, позволяющих улучшить терапевтический эффект аллогенных клеточных культур, является использова-

ние клеток кожи 18–24 недельного плода. Фетальные фибробласты и кератиноциты имеют очень низкий уровень экспрессии МНС и, кроме того, проявляют супрессивную активность в отношении Т-лимфоцитов реципиента, что увеличивает продолжительность их жизнеспособности после трансплантации. Кроме того, фетальные клетки кожи имеют более высокую пролиферативную активность и более высокий уровень экспрессии цитокинов по сравнению с клетками кожи взрослых [23].

Трансплантация клеточного материала может осуществляться различными способами:

I. Клеточные суспензии. Обычно используются для трансплантации культур аллогенных или аутогенных дермальных фибробластов, фетальных фибробластов, а также аутогенных кератиноцитов. Известны несколько вариантов использования клеточных суспензий:

– аппликация на раневую поверхность салфеток, пропитанных клеточной суспензией [3];

– подкожное введение суспензии аллогенных или аутологичных фибробластов. Данный способ используется в нескольких коммерческих продуктах (VAVELTA[®], ICX-TRC[®]), применяемых для коррекции структуры кожи;

– нанесение на раневую поверхность суспензии аутологичных кератиноцитов и фибринового уплотнителя. Данный способ применяется экспериментально, сведений о его применении в клинической практике в доступной литературе не обнаружено [14].

II. Клеточные пласты («sheet grafts»), представляющие собой «лоскуты» из 3–8 слоев выращенных *in vitro* аутологичных кератиноцитов. Выращенные пласты отделяются от подложки путем ферментативной обработки без нарушения межклеточных связей и помещаются на раневую поверхность. Недостатком данного метода является сложность проведения манипуляций с клеточными пластами, а также неоднозначные результаты применения: плохая приживляемость клеточного пласта и высокая частота отслоений [14]. Данная технология реализована в коммерческом продукте Epicel[®], представляющем собой пласт аутологичных кератиноцитов, выращенных в присутствии фибробластов мыши, который обычно применяется для лечения ожогов [10].

III. Заменители кожи. Состоят из 2 основных элементов: бесклеточного носителя и живых клеток. Бесклеточный носитель обычно имеет многослойную пористую или сетчатую структуру, на поверхности которой и внутри которой находятся живые клетки. Материал носителя обладает хорошими адгезивными свойствами в отношении клеток. Для изготовления носителя используются как компоненты биогенного происхождения (коллаген, фибрин, гиалуроновая кислота), так и синтетические компоненты (силикон, нейлон, викрил и др.) Бесклеточный носитель образует пространственную нишу для функционирования клеточных элементов, что позволяет значительно увеличить клиническую эффективность и продолжительность применения трансплантата. Клетки для использования в составе заменителя обычно первоначально выращиваются в культуральных флако-

нах, после чего вносятся в структуру заменителя кожи в виде суспензии и выращиваются непосредственно на носителе в виде вторичной культуры.

Можно выделить 3 основные группы живых заменителей кожи: эпидермальные, дермальные и комбинированные.

1. Эпидермальные заменители, содержащие кератиноциты. К ним относится Laserskin[®], который представляет собой перфорированную лазером мембрану из гиалуроновой кислоты с выращенными на ее поверхности аутологичными кератиноцитами [10].

2. Дермальные заменители, содержащие фибробласты, используются гораздо чаще.

– Transcyte[®], который состоит из 2 слоев: нейлоновой сетки и силиконовой мембраны. Аллогенные фибробласты размножаются в нейлоновом каркасе в течение 3–6 недель, продуцируя коллаген, фибронектин и факторы роста, после чего продукт замораживается до момента использования [15].

– Dermagraft[®] — представляет собой сетку из рассасывающегося материала викрила (полигликолевой кислоты), в структуре которой выращиваются аллогенные фибробласты [6].

– ICX-SKN[®] — основой его является фибриновая матрица, которая заселяется фибробластами, откладывающими коллаген и прочие компоненты межклеточного матрикса. После частичного замещения фибрина на коллаген, придающий структуре прочность и эластичность, матрица несколько раз подвергается переморозке и стерилизуется γ -излучением. Полученный полуфабрикат повторно заселяется фибробластами [11].

3. Комбинированные заменители, содержащие одновременно эпителиальные клетки и фибробласты. Как показывает опыт клинического применения, наилучший терапевтический эффект обеспечивают двойные заменители кожи. Очевидно, эффективность двойных заменителей обусловлена не только одновременным воздействием двух видов клеток на ткани реципиента, но и взаимной стимуляцией аллогенных фибробластов и кератиноцитов в составе трансплантата.

– Apligraf[®] изготавливается путем заселения коллагеновой матрицы аллогенными фибробластами, которые продуцируют коллаген и фибронектин, формируя дермальный слой заменителя. Сформированный дермальный слой заселяется кератиноцитами, которые, в результате паракринного взаимодействия с фибробластами, формируют эпителиальный слой, подвергающийся ороговению *in vitro* [1].

– OrCel[®] — основой его является коллагеновая матрица, состоящая из двух слоев: пористого и непористого. Культивирование фибробластов осуществляется в пористом слое, а кератиноцитов — на поверхности непористого слоя [24].

Вопросы безопасности использования клеточных культур в клинической практике сводится к следующим проблемам:

1. Риск заражения реципиента инфекционными агентами, содержащимися во взятом от донора биопсийном материале. Перед взятием биопсий-

ного материала должно проводиться обследование донора на предмет инфицированности вирусом иммунодефицита человека, вирусами гепатита В и С, вирусами простого герпеса 1–2-го типов, цитомегаловирусом, вирусом Эпштейна-Барр, а также микоплазмами и токсоплазмой. Полученные клеточные культуры в обязательном порядке должны подвергаться обследованию методом ПЦР с целью выявления нуклеиновой кислоты перечисленных возбудителей [2].

2. Риск инфицирования клеточной культуры инфекционными агентами, содержащимися в сыворотке, добавляемой в питательную среду. Все используемые сыворотки должны проверяться на наличие вирусов и микоплазм методом ПЦР.

3. Риск развития интенсивной реакции отторжения трансплантата.

4. Риск опухолевой трансформации клеток. В настоящее время у культивируемых *in vitro* дермальных фибробластов человека не выявлено онкогенных свойств [4]. Аналогичных сведений в отношении культивируемых кератиноцитов в доступной литературе не выявлено.

В настоящее время одним из основных направлений развития клеточных технологий является усовершенствование заменителей кожи. Проводимые исследования ставят целью как улучшение свойств органического носителя (бесклеточной основы), так и включение в него не только фибробластов и кератиноцитов, но и других клеточных элементов кожи.

Еще одним перспективным направлением развития клеточных технологий является переход на питательные среды, не требующие добавления сыворотки. Использование таких сред позволит снизить риск контаминации клеточных культур вирусами и микоплазмами.

Использование аутологичного клеточного материала делает терапевтическое использование клеточных культур максимально безопасным и эффективным. Однако получение достаточного количества клеточного материала занимает более месяца, что ограничивает применение ауто трансплантатов. В связи с этим, возникает необходимость создания банка клеточных культур, содержащего индивидуальный клеточный материал в количестве, достаточном для его оперативного использования.

Практика культивирования клеток кожи и пересадки их пациентам с ожогами в России имеет более чем пятнадцатилетнюю историю. Однако, несмотря на бесспорные достижения в этой области, до настоящего времени доступность клеточной терапии ожогов остается весьма ограниченной, в первую очередь, из-за отсутствия стандартных протоколов лечения. В то же время, перспективность метода трансплантации клеток кожи больным с ожоговой травмой не вызывает сомнения, поскольку позволяет из небольшого по площади участка кожи размножить клетки, способные покрыть раневую поверхность, до 10000 раз превышающую площадь биоптата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов С.В. Клеточные технологии в разработке заменителей кожи / С.В. Анисимов // Цитология.– 2012.– Т. 54(3).– С. 193-199.

2. Бурунова В.В. Подходы к паспортизации и обеспечение безопасности при работе с клеточными материалами / Бурунова В.В., Суздальцева Ю.Г., Чеглаков И.Б., Холоденко И.В., Холоденко Р.В., Вахрушев И.В., Воронов А.В., Ярыгин К.Н. // Тезисы доклада на конференции «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества». – 2007.

3. Ледовской С.Н. Анализ клинической эффективности применения фетальных и зрелых аллогенных диплоидных фибробластов в лечении пограничных ожогов / С.Н. Ледовской, Ю.Е. Бурда, В.А. Лазаренко // Успехи современного естествознания. – 2008. – Вып. 9.

4. Зорина А. Аутологичные дермальные фибробласты в коррекции возрастных и рубцовых дефектов кожи / А. Зорина, В. Зорин, В. Черкасов. – Эстетическая медицина. – 2011. – Т. X (2).

5. Фёдоров В.Д. Применение культивированных фибробластов при ожогах кожи / В.Д. Фёдоров, Д.С. Саркисов, А.А. Алексеев, В.П. Туманов, Г.Г. Серов // Врач. – 1993. – Вып. 11, С. 26-28.

6. Alrubaiy L. Skin Substitutes: A Brief Review of Types and Clinical Applications / L. Alrubaiy, KK. Al-Rubaiy // Oman Medical Journal – 2009. – V. 24(1).

7. Arno A. Stem Cell Therapy: A New Treatment for Burns? A. Arno, A. Smith, P. Blit, M. Al Shehab, G. Gauglitz, M. Jeschke Pharmaceuticals 2011, 4, 1355-1380; doi:10.3390/ph4101355.

8. Ballaun C. Human keratinocytes express the three major splice forms of vascular endothelial growth factor / C. Ballaun, W. Weninger, A. Uthman, H. Weich, E. Tschachler // J. Invest. Dermatol. – 1995. – V.104(1). – P. 7-10.

9. Clark R. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds / R. Clark, K. Ghosh, M. Tonnesen J. Invest. Dermat. – 2007. – V. 127. – P. 1018-1029.

10. Cronin H. Biologic Skin Substitutes and Their Applications in Dermatology / H. Cronin, G. Goldstein // Dermatol. Surg. – 2012. – DOI: 10.1111/j.1524-4725.2012.02561.x.

11. Flaszka M. Development and manufacture of an investigational human living dermal equivalent (ICX-SKN) / M. Flaszka, P. Kemp, D. Shering, J. Qiao, D. Marshall, A. Bokta, P. Johnson // Regen. Med. – 2007. – V. 2(6). – P. 903–918.

12. Griffiths M. Survival of Apligraf in acute human wounds / M. Griffiths, N. Ojeh, R. Livingstone, R. Price, H. Navsaria // Tissue Eng. – 2004. – V.7-8. – P.1180-95.

13. Ho W-S. Skin substitutes: An overview / W-S. Ho // Ann. Coll. Surg. H.K. – 2002. – V. 6. – P.102–108.

14. Horch R. Tissue engineering of cultured skin substitutes / R. Horch, J. Kopp, U. Kneser, J. Beier, A. Bach // J. Cell. Mol. Med. – 2005. – V. 9(3). – P. 592-608.

15. Hrabchak C. Biological skin substitutes for wound cover and closure / C. Hrabchak, L. Flynn, K. Woodhouse // Expert Rev. Med. Devices. – 2006. – V. 3. – P. 373-385.

16. Huschtscha LI. Enhanced isolation of fibroblasts from human skin explants

/ LI. Huschtscha, CE. Napier, JR. Noble, K. Bower, AYM. Au, HG. Campbell, AW. Braithwaite, RR. Reddel // *BioTechniques*.– 2012.– V. 53.– P.239-244.

17. Maas-Szabowski N. Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism / N. Maas-Szabowski, A. Shimotoyodome, N.E. Fusenig // *J. Cell. Sci.*– 1999.– V. 112 (12).– P. 1843-53.

18. Schneider E.L. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age / E.L. Schneider, Y. Mitsui / *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.– 1976.– V. 73(10).– P. 3584-8.

19. Theobald V.A. «Neutral allografts» – lack of allogeneic stimulation by cultured human cells expressing MHC class I and class II antigens / V.A. Theobald, J.D. Lauer, F.A. Kaplan, K.B. Baker, M. Rosenberg // *Transplantation*.– 1993.– V. 55(1).– P.128-33.

20. Wang Z. Enhanced Keratinocyte Proliferation and Migration in Co-culture with Fibroblasts / Z. Wang, Y. Wang, F. Farhangfar, M. Zimmer, Y. Zhang // *PLoS ONE*.– 2012.– V. 7(7).– e40951.

21. Werner S. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing / S. Werner, T. Krieg, H. Smola // *J. Invest. Dermatol.* – 2007.– V. 127(5).– P.998-1008.

22. Yu F-SX. Growth factors and corneal epithelial wound healing / F-SX. Yu, J. Yin, K. Xu, J. Huang // *Brain. Res. Bull.*– 2010.– V. 81(2-3).– P. 229–235.

23. Zuliani T. Fetal Fibroblasts and Keratinocytes with Immunosuppressive Properties for Allogeneic Cell-Based Wound Therapy / T. Zuliani, S. Saiagh, A-C. Knol, J. Esbelin, B. Dreno // *PLOS ONE*.– 2013.– V. 8(7).– e70408.

24. www.forticellbioscience.com