



Макеев Олег Германович

Заведующий лабораторией клеточной и генной терапии
Института медицинских клеточных технологий,
заведующий кафедрой биологии
ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский
университет» Минздрава РФ, г. Екатеринбург,
д. м. н., профессор

АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В КОСМЕТОЛОГИИ С ПОЗИЦИИ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

*Макеев О. Г., Улыбин А. И., Зубанов П. С., Зверева А. Е.,
Костюкова С. В., Коротков А. В., Малишевская Е. Г.,
Шабашова Н. П.*

Отдел молекулярных клеточных технологий ЦНИЛ ГБОУ ВПО УГМУ
Минздрава России;
Лаборатория технологий клеточной и генной терапии ГБУЗ СО ИМКТ
Екатеринбург, Россия

Одна из первых биомедицинских клеточных технологий, предназначенных для заместительной терапии, была разработана группой ученых под руководством William K. Boss в исследовательском центре Isolagen Technologies Inc. еще в начале 90х годов прошлого столетия. Запатентованные в 1995 году технология и клеточный продукт «Isolagen» [8–12] предусматривают получение аутологичных дермальных фибробластов из эксплантата заушной складки пациента, их наращивание в процессе культивирования и внутридермальное введение в проблемную зону кожи или нанесение фибробластов на рану.

За прошедшие десятилетия терапию по запатентованной технологии прошли более 3,5 тысяч пациентов, из которых почти 3 тысячи — коррекцию возрастных изменений и около 600 — лечение травматических повреждений кожи. Однако не все 20 лет были для Isolagen Inc. продуктивными. В общей сложности компания проработала на рынке 9 лет — 4 года в США и 5 — в Великобритании. Причинами перерывов послужил отзыв FDA выданного ранее разрешения на практическое использование технологии вследствие «...появления вопросов об обоснованности выводов и корректности клинических испытаний», а также многочисленные судебные иски как от сотен клиентов, недовольных косметическими последствиями терапии, так и от американских инвесторов Isolagen Inc., обвинивших компанию в искусственном завышении её

стоимости «на основании ложных заявлений по поводу эффективности лечения». В результате компания Isolagen Inc. объявила о банкротстве в 2009 году, возникнув вскоре в прежнем кадровом составе, с той же технологией и патентами уже в лице новой компании Fibrocell Science Inc., которой FDA разрешило проведение III–IV фаз клинических испытаний, но уже не в косметологии, а исключительно для терапии тяжелых кожных ран.

В ряде стран, в том числе в России, основополагающая технология W. K. Boss известна достаточно хорошо и применяется в практически неизменном виде [3, 4]. Анализ сведений о результативности применения технологии W. K. Boss, проведенный экспертами FDA, позволил сделать следующие выводы:

- эффективность применения технологии Isolagen можно считать подтвержденной при травматических и, в первую очередь, термических повреждениях кожи, а также в косметологии у пациентов в возрасте от 20 до 30 лет;
- в возрасте от 30 до 50 лет лечение «не всегда эффективно у всех пациентов», а в возрасте 50 лет и старше «не имеет клинической перспективы вследствие недостаточного количества в эксплантируемом участке кожи активных фибробластов».

За последнее десятилетие перечень препаратов на основе культивированных клеток для лечения травматических повреждений кожи пополнился более чем 15 продуктами, разрешенными к клиническому применению. Благодаря этому рынок клеточных продуктов для терапии повреждений кожи в известной мере сбалансирован. Однако в косметологии разработки William K. Boss до сих пор остаются практически единственной малоинвазивной клеточной технологией.

Означенное обосновало цель исследования: разработать методологию увеличения эффективности применения аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи у пациентов старших возрастных групп.

Материалы и методы

Для обоснования области взятия эксплантата кожи исследовались параметры 30 суточных культур фибробластов, полученных из кожных эксплантатов, взятых с кисти, предплечья, плеча, заушной складки, передней брюшной стенки, спины, ягодичной области, внутренней поверхности бедра и голени. В опытах кожные эксплантаты были получены от 75 различных доноров, возраст которых составлял 44–61 год, во время плановых оперативных вмешательств, предполагающих иссечение участка кожи. В качестве контроля использовали эксплантаты 5 различных доноров в возрасте 23–26 лет, взятые с внутренней поверхности бедра.

Специфическую функцию фибробластов для терапии возрастных изменений кожи оценивали по включению в макромолекулы меченых селективных предшественников синтеза ДНК (2^{14}C -тимидин), коллагена ($\text{L-U}^{14}\text{C}$ -пролин) и кислых ГАГов ($\text{D-6}^3\text{H}$ -глюкозамин гидрохлорид) (все радиофармпрепараты Amersham Pharmacia Biotech). Радионуклиды с активностью 37 кБк/мл среды вносили на 75 см^2 матрасы одновременно с $0,5 \times 10^6$ фибробластов из вторичной 30-ти суточной культуры. Эксперименты прерывали через трое суток культивирования, фибробласты снимали с флаконов раствором трипсина-версена по стандартной методике и подсчитывали на гематологическом анализаторе. Подсчет радиоактивности производили в спирито-толуоловом сцинтиллаторе на

жидкостном сцинтиляционном счетчике Бета-2 (эффективность счета по углероду — 98 %, по тритию — 56 %). Результаты выражали в беккерелях на 10^6 клеток.

Для изучения длины теломер клетки снимали с культуральных флаконов, определялось их количество. Клетки лизировали и после отжига цепей ДНК к полученному раствору добавляли ДНК-зонды (CCCTAA)_n, радиоактивно меченые по цитидину (³H дезоксицитидин, Amersham Pharmacia Biotech). После того, как зонды взаимодействовали с комплементарными участками ДНК (теломерные концы), хромосомы отмывали от излишков зондов, осаждали на нитроцеллюлозные фильтры (Millipore) и производили подсчет радиоактивности.

Активность металлопротеиназы 1 изучали с использованием коммерческих наборов MMPelisaKit (Cusabio) согласно протоколу изготовителя.

С целью изучения синтеза коллагена XI в клеточной культуре исследовались параметры 46 суточных культур фибробластов (7–8 пассаж), полученных из кожных эксплантатов, взятых с ягодичной области 21 донора, в возрасте 39–65 лет. В культуральную среду клеток опытной группы с первого дня культивирования дополнительно вносили интерлейкин 6, фактор хемотаксиса моноцитов MCP-1 и ингибитор циклооксигеназы 2-индометацин. В качестве контроля использовали клетки тех же доноров, культивированные в аналогичных условиях в отсутствие дополнительных факторов.

Степень экспрессии генов коллагена различных типов исследовали с использованием наборов TaqMan[®] Gene Expression Assays (Invitrogen).

Количество синтезируемых коллагенов различных типов определяли методом иммунофлюоресценции с применением моноклональных антител к эпитомам коллагенов человека (Blue Gene Biotech Co., Ltd). Вторичные антитела, конъюгированные с ALEXA FLUOR 350, получены от Sigma (Сент-Луис, Миссури) [28].

Клинические испытания и исследования способа проводили в отделе молекулярных и клеточных технологий Уральского государственного медицинского университета с 2005 г. с привлечением баз косметологических салонов и лечебно-профилактических учреждений г. Екатеринбурга. Работа выполнялась при одобрении Этического комитета и в соответствии с решением Ученого совета Уральского государственного медицинского университета, утвердившего программу научно-исследовательских работ и протоколы доклинических и клинических испытаний. С 2009 г., после внесения модификации, в выполнении работы участвует лаборатория технологий клеточной и генной терапии Института медицинских клеточных технологий.

Исследование осуществлялось с учетом международных норм GLP и GCP. В испытаниях принимали участие 83 пациента в возрасте от 43 до 65 лет, в том числе после внесения модификации метода — 41 пациент.

Выбор зон введения клеток для терапевтической коррекции кожи осуществлялся на основании субъективного определения наиболее проблемной области лица самим пациентом и мнения врача-косметолога.

Количество однократно вводимых клеток варьировало в зависимости от объема проблемной зоны и составляло в среднем от 10×10^6 до 30×10^6 . Разовый объем вводимого препарата — 1–3 мл. Клетки вводили пациентам методом «папулы» для крупных морщин, обкалывания мелких морщин или равномерно

ДОКЛАДЫ

на площадь проблемной зоны с помощью микроинъекций; введения повторялись 2–4 раза с 7–10 дневными перерывами.

Изменения кожи после трансплантации отслеживались в динамике на протяжении трёх лет. Степень внешней косметической коррекции оценивалась как специалистами, так и самими испытуемыми. Пациенты с периодичностью в 3 месяца заполняли специальную анкету, в которой отмечали динамику, побочные эффекты, их выраженность и продолжительность.

Испытуемые оценивали общую степень своей удовлетворенности косметическим эффектом по 10-балльной шкале. За «0» принималась субъективная оценка состояния кожи до начала испытаний.

Оценивались шесть признаков:

1. увеличение тургора и эластичности кожи;
2. улучшение цвета кожи;
3. разглаживание мелких морщин;
4. разглаживание крупных морщин;
5. коррекция косметических дефектов;
6. утолщение кожи.

Полная, с субъективной точки зрения пациента, ликвидация признаков старения кожи в зоне введения клеток оценивалась 10 баллами.

Экспертная оценка производилась по аналогичной шкале двумя специалистами с усреднением результатов на завершающем этапе испытания.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с использованием непараметрических критериев в программной оболочке Excell фирмы Microsoft. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Таблица 1

Интенсивность синтеза макромолекул фибробластами из эксплантатов кожи с различных участков тела

Область эксплантации / Показатель	Включение 2^{14}C -тимидина в ДНК клеток (в Бк на 10^6 клеток)	Включение D-6 ^3H -глюкозамин гидрохлорида в высокомолекулярные ГАГи (Бк/ 10^6 клеток)	Включение L- ^3H -пролина в коллаген (Бк/ 10^6 клеток / 10 см^2)
Контроль, n = 5	71,1 ± 1,4	4,9 ± 0,7	83,9 ± 5,2
С передней брюшной стенки, n = 9	69,7 ± 6,1	4,7 ± 0,3	69,3 ± 5,1
Со спины, n = 6	62,4 ± 3,2*	4,4 ± 0,2	66,3 ± 5,6*
С ягодичной области, n = 15	70,6 ± 4,9	4,8 ± 0,3	72,1 ± 3,4
С бедра, n = 6	63,7 ± 2,9*	4,2 ± 0,2	61,7 ± 5,6*
С голени, n = 5	56,6 ± 6,3*	3,8 ± 0,1*	52,7 ± 6,5*
С кисти, n = 10	46,0 ± 5,1*	2,9 ± 0,2*	44,3 ± 6,2*
С предплечья, n = 8	58,2 ± 4,6*	4,1 ± 0,2	73,2 ± 3,8*
С плеча, n = 7	65,5 ± 3,8*	4,2 ± 0,3	76,5 ± 5,
С заушной складки, n = 4	49,6 ± 5,3*	3,4 ± 0,4*	46,3 ± 6,4*

n — число исследованных эксплантатов

* — статистически достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$).

Результаты

Результаты изучения синтетической активности фибробластов представлены в таблице 1.

Полученные данные по оценке параметров синтеза ДНК, кислых гликозаминогликанов и коллагеновых волокон свидетельствуют о том, что характеристики дермальных фибробластов на разных участках кожи зрелых и пожилых пациентов существенно различаются. Так, исследуемые показатели оказались количественно наименьшими на кисти и далее: заушная складка < голень < предплечье < бедро < спина < плечо.

Особое место занимают параметры синтеза макромолекул фибробластами с передней брюшной стенки и ягодичной области, клетки с которых, несмотря на возрастные различия, достоверно не отличаются от параметров 20-ти летних доноров.

Таблица 2

Длина теломер фибробластов с различных участков тела и активность металлопротеиназы-1 в культуральной среде

Область эксплантации / Показатель	Включение зонда (СССТАА) ₃ в ДНК (в Бк на 10 ⁶ клеток)	Концентрация металлопротеиназы-1 (нг/мл среды)
Контроль, n = 5	18,4 ± 1,1	323,9 ± 5,2
С кисти, n = 10	10,1 ± 0,8*	541 ± 22*
С предплечья, n = 8	10,9 ± 0,9*	512 ± 31*
С плеча, n = 7	12,5 ± 1,2*	483 ± 29*
С заушной складки, n = 4	11,4 ± 1,1*	514 ± 18*
С передней брюшной стенки, n = 9	15,7 ± 1,1	346 ± 31
Со спины, n = 6	14,9 ± 0,8*	356 ± 18*
С ягодичной области, n = 15	16,6 ± 0,9	317 ± 27
С бедра, n = 6	13,7 ± 0,9*	385 ± 20*
С голени, n = 5	13,3 ± 0,7*	422 ± 19*

n — число исследованных эксплантатов

* — статистически достоверные отличия от контрольной группы (p < 0,05).

Согласно сведениям из литературных источников, наибольший пролиферативный потенциал имеют клетки, хромосомы которых отличаются большей длиной теломер.

Результаты проведенных нами исследований продемонстрировали (табл. 2), что наибольшее количество радиоактивно-меченого зонда включали фибробласты культур 23–26-летних испытуемых и фибробласты культур эксплантатов с ягодичной области и передней брюшной стенки тела испытуемых в возрасте от 44 до 61 года.

Темпы разрушения соединительной ткани также во многом определяются фибробластами путем синтеза последними металлопротеиназ, наиболее активной из которых является металлопротеиназа-1 – коллагеназа.

Исследования концентрации этой металлопротеиназы в изучаемых культурах фибробластов позволили заключить, что ее количество минимально в культурах клеток из эксплантатов с ягодичной области и передней брюшной стен-

ки (Таблица 2).

Отличия клеточной активности в опытной группе в отношении синтеза ДНК, макромолекул основного вещества соединительной ткани, а также длины теломер клеток из эксплантатов с ягодичной области и передней брюшной стенки от соответствующих показателей испытуемых в возрасте 23–26 лет (контроль) составляют менее 20 %, что может быть вполне объяснимо наличием закономерной возрастной тенденции к снижению этих показателей, остающихся, впрочем, в пределах естественных колебаний в пределах биологических норм. В свете изложенного интересным представляется значительно меньшая активность в культуральной среде первого фермента каскада цинковых металлопротеиназ – металлопротеиназы 1. Эти ферменты, продуцируемые фибробластами, в условиях старения обеспечивают ускоренную деградацию преимущественно минорных коллагенов, практически не оказывая влияния на упорядоченные «сшитые» коллагены I–II типа. Формирование тяжелой коллагенов этого типа, явившихся осложнением клеточной терапии по технологии Isolagen Inc., послужили мотивом почти четверти судебных исков к этой компании.

Таким образом, наиболее близкими по своим параметрам к показателям фибробластов, выделенных из кожи молодых доноров, были клетки, полученные с области ягодиц. Данная область отличается и наибольшей толщиной дермального слоя, что при равной площади эксплантации (10 мм²) дает возможность получить больше клеток фибробластического дифферона, чем с других участков. Означенное позволяет ускорить процесс получения необходимой клеточной массы. Наряду с этим некоторый косметический дефект ягодичной области, обусловленный эксплантацией, с эстетической точки зрения менее заметен, чем, например, передней брюшной стенки. Все перечисленное позволяет обосновать использование клеток из эксплантата с ягодичной области для проведения терапии.

Подтверждением сделанного заключения явилось исследование известной группы ученых под руководством Chang H. Y. из Стэнфордского университета [14], выполненное на человеческих фибробластах из 42 областей тела по исследованию степени экспрессии свыше 7 тысяч генов. Оказалось, что среди всех участков кожного покрова тазовый пояс, включающий ягодичную и паховую области, отличается от других участков интенсивностью экспрессии около 300 генов. Это и минимальная экспрессия онкогенов, в то время как у фибробластов с других участков она значительно выше (особенно конечностей и головы), более высоким уровнем экспрессии генов сигнальных путей, обеспечивающих межклеточное взаимодействие, и самым высоким уровнем экспрессии генов Coll11 (в 2,13 раза), что с позиции практического использования клеток с косметическими целями представляется наиболее перспективным.

Синтезируемый коллаген данного типа играет роль своеобразного пептидного скелета дермы и определяет механическую прочность и упругость ягодичной области тела, что принципиально важно для обеспечения эффективности заместительной терапии возрастных изменений кожи с использованием клеток самого пациента.

Результаты исследования экспрессии генов Coll11 продемонстрировали, что внесение в культуральную среду интерлейкина-6, фактора хемотаксиса моноцитов MCP-1 и индометацина в клетках опытной группы не оказывает зна-

чимого влияния на величину экспрессии генов, за исключением генов Coll11, в отношении которых был зарегистрирован рост этого показателя на 43,2 % по отношению к величине экспрессии в культурах клеток тех же доноров, культивированных без дополнительных индукторов.

Таким образом, на доклиническом этапе было определено и обосновано экспериментальными данными два пути повышения эффективности технологии коррекции возрастных изменений кожи — использованием дермальных клеток с годичной области и применением методологии усиления образования культивируемыми клетками минорных коллагенов XI типа.

Усиление экспрессии генов Coll11 сопровождается увеличенным синтезом коллагена данного типа на 48 % в опытной группе по сравнению с контрольной, что было показано с использованием конъюгированных с красителем антител к различным типам коллагена.

После детальной отработки в лабораторных условиях методик забора экплантата, подготовки к культивированию и наращиванию массы фибробластов были проведены клинические испытания предложенного способа. Исследование выполнялось в два этапа — 2005–2009 гг. — до внесения модификации в виде введения в культуральную среду интерлейкина 6, фактора хемотаксиса моноцитов и индометацина (42 пациента) и после внесения — с 2009 г. (41 пациент).

Основные показатели и ограничивающие параметры заявляемого способа, такие как содержание дополнительных компонентов при культивировании фибробластов, хранение плазмы, полученной из крови пациента, количество культивируемых клеток, вводимых в кожу пациента от 10×10^6 до 30×10^6 , разовый объем вводимого препарата 1–3 мл — определены и обоснованы практическим путем в результате многочисленных лабораторных опытов с учетом теоретической проработки аналогов, прототипов и опыта предыдущих исследований и клинических испытаний.

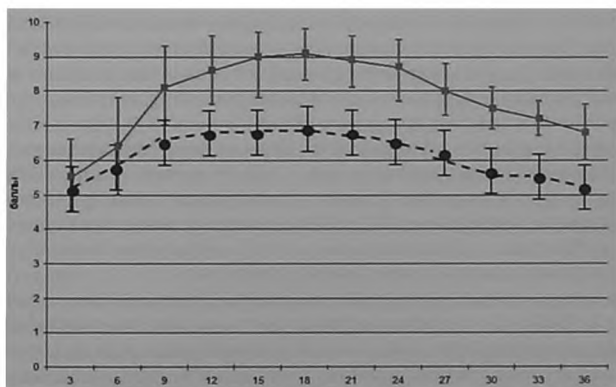


Рисунок 1. Динамика изменения суммарной оценки удовлетворенности косметическим эффектом по 10-балльной шкале. За «0» принималась субъективная оценка состояния кожи до начала испытаний. За «10» — максимальная удовлетворенность. ■ Исследования с 2009 г. ● Исследования 2005–2009 гг.

Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Все испытуемые после введения аутофибробластов отмечали положительный косметический эффект в проблемной области, заключающийся в уменьшении выраженности крупных и мелких морщин, кожных дефектов, а также в общем улучшении состояния кожи лица в области трансплантации фибробластов.

На рисунке 1 представлена динамика косметической эффективности в баллах по каждому этапу исследований с определением абсолютного диапазона колебаний показателей по всем пациентам в течение 3-х лет (3–36 месяцев).

Наблюдалась стойкая динамика прогрессирования положительного косметического эффекта с течением времени (Рисунок 1). Наибольшая его выраженность отмечена к 15–18 месяцам после терапии с последующим снижением в течении трёх лет. Важным представляется, что сравнение эффективности технологии до внесения усилителей образования коллагенов XI типа и после модификации продемонстрировали явный прирост оценки по принятой шкале. При этом лишь в первое полугодие после начала терапии различия эффективности не были значимыми, но в дальнейшем применение усилителей коллагенообразования демонстрировало более высокий оценочный уровень. Примечательно, что 43 пациента обратились повторно (12 — из первой группы, 31 — из второй), а 26 — более двух раз с целью косметической коррекции других зон тела (кисти рук, зона декольте, передняя брюшная стенка, колени). Среди обратившихся более двух раз 1 пациент из первой группы, 25 — из второй. Это свидетельствует об эффективности и перспективности разработанной методологии клеточной терапии возрастных изменений кожи и востребованности его у пациентов в косметологических салонах и клиниках.

Обсуждение

Известно, что при биологическом старении, наряду с уменьшением количества фибробластов в коже, последние характеризуются снижением пролиферативной активности и восприимчивости (реакционноспособности) к факторам роста [13]. В результате снижается синтез фибробластами белков коллагена и эластина, а также компонентов аморфного вещества соединительной ткани дермы и в тоже время интенсивность синтеза металлопротеиназ, разрушающих коллаген и эластин, возрастает [20, 30].

Известно также, что в фибробластах кожи по мере старения изменяется соотношение коллагенов различных типов, при этом синтез упорядоченных коллагенов и в первую очередь I–II типов, формирующих рубцовую ткань, остается практически неизменным [5, 19]. Преобладание таких коллагенов, образующих грубые тяжи в стареющей коже, наряду с дефицитом минорных коллагенов, определяет развитие косметических дефектов.

При этом именно минорный коллаген XI типа (кодируемый генами COL11A1, COL11A2), будучи распространенным в мягких тканях, ответственен за формирование прочной сетчатой фибриллярной структуры, препятствующей возрастному гравитационному птозу кожи и деформации подлежащих тканей [7, 18].

Известны результаты применения основополагающей разработки W. K. Bosсdля клеточной коррекции возрастных изменений кожи, а также ее модификации [1, 3, 6, 24, 25, 26]. При этом наибольшая эффективность у па-

циентов старших возрастных групп продемонстрирована в модификации Maslowski [26]. Однако данный способ отличается также невысокой эффективностью (57–59 % — по оценке косметологов и 67 % при самооценке пациентов) [17]. Последнее обусловлено тем, что в основу способа положено использование аутологичных клеток, получаемых из эксплантатов кожи головы, шеи, конечностей, стимулированных добавлением в культуру 10 % фетальной бычьей сыворотки по стандартному протоколу, то есть клеток того же возраста, что и сам пациент и, следовательно, характеризующихся сниженным восстановительным потенциалом в отношении компонентов стареющей кожи при отсутствии селективной стимуляции синтеза отдельных типов коллагенов.

Означенное обуславливает сравнительно низкую эффективность клеточной терапии возрастных изменений кожи у лиц старших и средних возрастных групп, с одной стороны, вследствие использования аутологичных клеток с количественным снижением их восстановительной активности, а с другой — возрастным качественным изменением соотношения синтезируемых макромолекулярных структур [27, 28].

Принципиально важно, что третичная структура коллагена состоит из трех полипептидных молекул (трипептид), упакованных в микрофибриллы за счет образования водородных и ковалентных связей. Объединения микрофибрилл создают коллагеновые тяжи. Упорядоченность сформированных параллельно друг другу тяжей определяет высокую прочность коллагеновой структуры «на разрыв», что наблюдается в рубцовой ткани, в которой преобладают упорядоченные коллагены (в основном тип I и II) [30]. Такие структуры устойчивы к действию металлопротеиназ, характеризуются медленной обновляемостью и образуют грубые неровности кожи, выступающие над ее поверхностью.

В отличие от структур, образованных упорядоченными коллагенами, включение в фибриллы минорных коллагенов с низкой упорядоченностью микрофибрилл, формирует ровную, пластичную сеть. Это достигается за счет «вплетания» микрофибрилл одной фибриллы в соседние фибриллы.

В результате образуется достаточно прочная сетчатая структура [16, 21, 23]. Примером таких структур, которые формируются при посредстве преобладающего коллагена XI типа, объединяющих фибриллы коллагенов в сеть, являются фасции лица, передней брюшной стенки и ягодиц [23].

В свою очередь, целенаправленное изменение соотношения синтезируемых трансплантируемыми клетками коллагенов способно обеспечить лучший косметический эффект и предотвратить формирование неровностей кожи из упорядоченного коллагена в местах введения аутологичного клеточного материала.

Заключение

Таким образом, низкая эффективность интрадермального введения аутологичных фибробластов пациентам старше 30 лет и отсутствие эффекта в более старших возрастных группах обусловлено низкой пролиферативной и синтетической активностью фибробластов.

Наиболее физиологически сохранные фибробласты (по показателям пролиферативной и синтетической активности) находятся в области ягодиц. Именно этот участок кожных покровов в наибольшей степени подходит для выделения из них фибробластов с целью их последующего использования для терапии

возраст-зависимой патологии кожи.

Дополнительная стимуляция синтеза фибробластами коллагенов XI типа еще более повышает эффективность применения аутологичных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гришанина С. В., Ручко А. Ю., Уразбахтин Р. К., Мирхайдаров Р. Ш. Способ биологического омоложения кожи (RU 2289417) // <http://www.findpatent.ru/patent/228/2289417.html>
2. Зорин В. Л., Зорина А. И., Терехов С. М. и др. Патент РФ № 2281776. // <http://www.findpatent.ru/patent/228/2281776.html>.
3. Зорин В. Л., Зорина А. И., Черкасов В. Р. Дермальные фибробласты: разнообразие фенотипов, физиологических функций, возможности терапевтического применения. // *Косметика & медицина*. 2011.-N 2.-С. 12-24.
4. Зорина А. И., Зорин В. Л., Черкасов В. Р., Исаев А. А. Метод коррекции возрастных изменений кожи с применением аутологичных дермальных фибробластов. // *Клиническая дерматология и венерология*. 2013.-N 3.-С. 30-37.
5. Смирнова Г. О., Мантурова Н. Е., Топчиева Г. В., Ступин В. А. Прогнозирование результатов эстетических вмешательств по механизмам старения кожи и соотношению коллагена I/III типов // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 7 (часть 1). – стр. 190-194
6. Basri F. Composition of cosmetic or pharmacological application for stimulation of synthesis of collagen. 2007/07/05/<https://www.google.com/patents/WO2006045963A3?cl=en>
7. Bernard M., Yoshioka H., Rodriguez E., et al (Dec 1988). Cloning and sequencing of pro-alpha 1 (XI) collagen cDNA demonstrates that type XI belongs to the fibrillar class of collagens and reveals that the expression of the gene is not restricted to cartilagenous tissue. // *J. Biol. Chem.* 263 (32): 17159–66.
8. Boss William K., Jr. The use of autologous dermal fibroblasts for the repair of skin and soft tissue defects 2007/09/11//<https://www.google.com.ar/patents/CA2228138C?cl=en>
9. Boss W. K. Autologous dermal fibroblasts for the repair of skin and soft tissue defects. 1997/09/09/<https://www.google.com.ar/patents/US5665372>
10. Boss W. K. The use of autologous dermal fibroblasts for the repair of skin and soft tissue defects. 2003/09/24/<https://www.google.com.ar/patents/EP0845963B1?cl=en>
11. Boss W. K. Injecting suspension of cells, cultured from skin biopsies of subject and treated with proteolytic enzymes, into defects or voids using hypodermic needles/ 1997/08/26/<https://www.google.com.ar/patents/US5660850>
12. Boss W. K. The use of autologous dermal fibroblasts for the repair of skin and soft tissue defects. 1997/02/13/<https://www.google.com.ar/patents/WO1997004720A1?cl=en>
13. Campisi J. Molecular mechanisms of intrinsic aging // *Ann. Dermatol. Venerol.* – 2002. – Vol. 129. – P. 1100.
14. Chang H. Y., et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2002 Oct. – vol. 1.99. (20). – p. 12877-12882; 2(7).

15. Dogru A. G., Tunik S., Akpolat V., et al. The effects of pulsed and sinusoidal electromagnetic fields on E-cadherin and type IV collagen in gingiva: a histopathological and immunohistochemical study. // *Adv. Clin. Exp. Med.* 2013 Mar-Apr; 22(2):245-52.
16. Eyre D., Wu J.-J. Type XI or $\alpha 2\alpha 3\alpha$ collagen. // In Burgeson R., Mayne R. Structure and Function of Collagen Types. // Orlando, Academic Press, 1987, 261–281.
17. FDA Cellular Tissue and Gene Therapies Advisory Committee <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/CellularTissueandGeneTherapiesAdvisoryCommittee/UCM185519.pdf>
18. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL11A1>, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL11A2>;
19. <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/9171/aging>
20. Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. // *Mech. Ageing. Dev.* 2002 Apr; 123(7):801-10; Sárdy M. Role of matrix metalloproteinases in skin ageing. // *Connect Tissue Res.* 2009; 50(2):132-8.
21. Keene D. R., Oxford J. T., Morris N. P. Ultrastructural localization of collagen types II, IX, and XI in the growth plate of human rib and fetal bovine epiphyseal cartilage: type XI collagen is restricted to thin fibrils. // *J. Histochem. Cytochem.* 1995, 43:967–979.
22. Klatte-Schulz F., Pauly S., Scheibel M., et al. Characteristics and stimulation potential with BMP-2 and BMP-7 of tenocyte-like cells isolated from the rotator cuff of female donors. // *PLoS One.* 2013 Jun 25; 8(6):e67209.
23. Li Y., Lacerda D. A., Warman M. L., et al (1995) A fibrillar collagen gene, *Coll11a1*, is essential for skeletal morphogenesis. // *Cell*, 1995, 80:423–430
24. Markoll R. Electromagnetic stimulation of cartilage tissue. 2003/02/25/ <https://www.google.com/patents/US6524233>.
25. Maslowski J., Thomas M. F., Lindner M. A. Methods for culturing minimally-passaged fibroblasts and uses thereof 2014/05/20/ <https://www.google.com/patents/US8728819>.
26. Maslowski J., Thomas M. F., Lindner M. A. Methods for Culturing Minimally-Passaged Fibroblasts and Uses Thereof 2010/11/25/ <https://www.google.com/patents/US20100297088>.
27. Minaker K. L., Common clinical sequelae of aging. In: Goldman L., Schafer A.I., eds. Cecil Medicine. 24th ed. Philadelphia, Pa: SaundersElsevier; 2011:chap 24.
28. Morris P., Julia T., Gillian B. M. et al. Developmentally Regulated Alternative Splicing of the $\alpha 1(XI)$ Collagen Chain: Spatial and Temporal Segregation of Isoforms in the Cartilage of Fetal Rat on Bones. // *J. Histochem. Cytochem.* June 2000 vol. 48 no. 6 725-741.
29. Rinn J. L., Chanda Bondre, Hayes B Gladstone, Patrick O Brown, and Howard Y. Chang. Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs // *PLoS Genet.* - 2006 July. - vol. 2 (7). 119-124.
30. Sárdy M. Role of matrix metalloproteinases in skin ageing. // *Connect Tissue Res.* 2009; 50(2):132-8.
31. Tang S. J., Hu S. L., Pang S. F. Content changes of type/collagen in tissues of hypertrophic scar and keloid its clinical significance. // *J. Clin. Res.* 2004, 21: 366-368.