

УДК 611.77.018:576.371

Н.А. Волкова\*, С.П. Мазур, В.С. Холодный, А.Ю. Петренко

## Стволовые клетки кожи как объект криоконсервирования.

### 1. Стволовой резерв кожи

UDC 611.77.018:576.371

N.A. Volkova\*, S.P. Mazur, V.S. Kholodnyy, A.Yu. Petrenko

## Skin Stem Cells as an Object for Cryopreservation.

### 1. Skin Stem Reserve

**Реферат:** Обзор содержит сведения о спектре, свойствах и локализации резидентных стволовых/прогениторных клеток кожи. Рассмотрены популяции эпителиальных и дермальных стволовых клеток (СК), стволовых клеток меланоцитов и подкожной жировой клетчатки. Они представляют собой перспективный объект для криобиологических технологий и организации низкотемпературных банков для нужд теоретической и экспериментальной биологии, общей и персонализированной медицины, а также для создания биоинженерных эквивалентов тканей и искусственных органов.

**Ключевые слова:** кожа, стволовые клетки, эпителий, дерма, подкожная жировая клетчатка, меланоциты.

**Реферат:** В обзорі наведено відомості про спектр, властивості та локалізацію резидентних стовбурових/прогениторних клітин шкіри. Розглянуто популяції епітеліальних і дермальних стовбурових клітин (СК), стовбурових клітин меланоцитів і підшкірної жирової клітковини. Вони є перспективними об'єктами для криобіологічних технологій і організації низькотемпературних банків для потреб теоретичної та експериментальної біології, загальної та персоналізованої медицини, а також для створення біоінженерних еквівалентів тканин і штучних органів.

**Ключові слова:** шкіра, стовбурові клітини, епітелій, дерма, підшкірна жирова клітковина, меланоцити.

**Abstract:** The review contains the data on scope, properties and localization of resident stem/progenitor cells of skin. The emphasis is given to populations of epithelial and dermal stem cells (SCs), as well as of melanocyte and subcutaneous fat SCs. The cells represent a prospective object for cryobiological technologies and establishing low temperature banks for use in theoretical and experimental biology, general and personalized medicine, development of bioengineered equivalents of tissues and artificial organs.

**Key words:** skin, stem cells, epithelium, derma, subcutaneous fat, melanocytes.

Прогресс биологических наук в последние десятилетия в значительной мере базируется на углублении знаний о закономерностях морфогенеза, регенерации и репарации многоклеточных организмов. Развитие и совершенствование методологии и технологий исследований *ex vivo*, главным образом выделения, идентификации и культивирования клеток, обеспечили возможность обнаружения резерва обновления дифференцированных клеток – пула стволовых клеток (СК) или «стволового резерва». При этом была установлена состоятельность таких методических подходов, основанных на проведении исследований в системах «вне организма», как для получения новых фундаментальных знаний о природе и биологии СК, так и расширения перспектив их использования в практике регенеративной медицины, биоинженерии и фармакологии [2]. Одновременно очевидны целесообразность и необходимость использования еще одного важного инструмента – криобиологических тех-

Recent progress of life sciences has been largely based on expansion of knowledge about the regularities of morphogenesis, regeneration and reparation in multicellular organisms. Development and improvement of *ex vivo* investigation methods and techniques, in particular isolation, identification and culture of cells, made possible to explore the reservoir of differentiated cells renewal, a stem cell (SC) pool or 'stem reserve'. The mentioned *ex vivo* methodological approaches were confirmed as consistent to obtain a new fundamental knowledge about the nature and biology of SCs, as well as to widen their prospective applications in the practice of regenerative medicine, bioengineering and pharmacology [22]. It is apparent as well that another important tool, the cryobiological technologies, could provide the preservation of biological objects properties and/or modification of their properties [16]. A combination of these approaches in relation to highly potent SCs allows to isolate these unique cell specimens from various sources, cryopreserve them, and after long

Отдел криобиохимии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;  
тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84,  
электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Поступила 14.01.2014  
Принята в печать 23.01.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №1. – С. 3–15.  
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryobiochemistry, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Received January 14, 2014  
Accepted January 23, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(1): 3–15.  
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

нологий, которые способны обеспечивать сохранение полноценности биообъектов или/и модифицировать их свойства [1]. Сочетание этих подходов в приложении к высокопотентным СК позволяет получить уникальный клеточный материал из различных источников, криоконсервировать его и после долгосрочного хранения вернуть в физиологические условия без утраты свойств. Благодаря успехам в изучении специфических качеств СК, в частности их пластичности, становится реальным совершенствование терапевтического мышления, прежде всего, в интересах персонифицированной медицины, а также расширяются диагностические и концептуальные аспекты коррекции ряда патологий человека.

Одним из наиболее доступных объектов для изучения СК является кожа. Основное свое предназначение в организме – служить многофункциональным барьером между внутренней средой организма и внешним миром – она выполняет благодаря присущему ей мощному регенеративному потенциалу, который обеспечивается резервом СК. В ходе восстановительных процессов происходит обновление клеточных и неклеточных элементов кожи и ее придатков за счет популяций мультипотентных региональных СК и их потомков, основной функцией которых является физиологическая замена отслуживших либо погибших дифференцированных клеток и поддержание постоянства клеточного состава. Регуляцию самоподдержания СК и дифференцировки дочерних транзиторных клеток обеспечивает их «ниша», то есть динамическое микроокружение СК, основными элементами которого являются базальная мембрана, молекулы внеклеточного матрикса, а также соседние клетки, продуцирующие факторы роста и другие регуляторные молекулы.

Анатомически кожа взрослых состоит из эпидермиса, дермы и гиподермы, ориентированных послойно (рис. 1), и построена примерно из 20 типов клеток, различающихся по гистогенетическому происхождению, потенциалу и степени зрелости, а также значительного количества компонентов внеклеточного матрикса. Прямого соответствия между перечисленными выше тканями, входящими в состав кожи, и нишами отдельных типов СК кожи не существует в силу специфики их организации. По мере развития и дифференцировки элементы одного и того же дифферона (совокупности клеточных форм от СК до высокодифференцированных клеток, составляющих определенную линию дифференцировки)

term storage to turn back in to physiological conditions without a significant loss of properties. The successful studies of specific features of SCs, in particular their plasticity, underlie the possibility of a feasible improvement of therapeutic thinking, primarily for the benefit of personalized medicine, as well as expanding of diagnostic and conceptual aspects of the correction of several human pathologies.

One of the most accessible sites to explore the SCs is the skin. Its main service area inside an organism, *i.e.* to be a multifunctional barrier between the internal environment of an organism and the external environment, the skin provides owing to its specific powerful regenerative potential, which is provided by the SC reserve. Any of recovery processes are accompanied with renewal of cellular and non-cellular components of skin and its appendages due to the populations of multipotent regional SCs and their descendants, which main physiological function is to replace dead or senile differentiated cells and maintain the persistence of the cell repertoire. Regulation of SCs' self-renewal and differentiation of daughter transient cells is provided by their 'niche', *i. e.* dynamic microenvironment of SCs, which main elements are the basal membrane, extracellular matrix molecules, as well as neighboring cells producing growth factors and other regulatory molecules.

Anatomically, the skin of an adult consists of epidermis, dermis and hypodermis oriented layerwise (Fig. 1), and contains approximately 20 cell types, differing by histogenetic origin, potential and maturity, as well as of significant amount of extracellular matrix components. There is no direct association between the mentioned tissues and certain types of skin SCs'

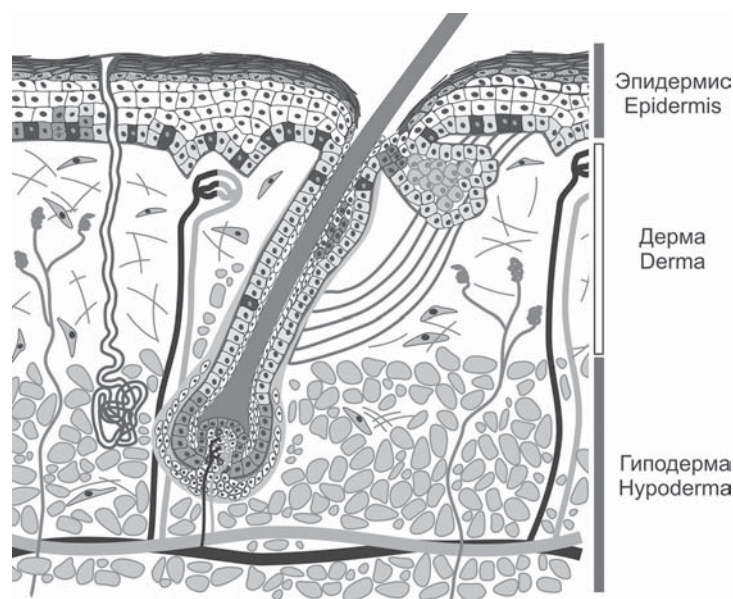


Рис. 1. Схематическое строение кожи.

Fig. 1. Schematic representation of skin.

могут находиться в разных слоях кожи. В настоящее время основной интерес исследователей привлекают эпителиальный и фибробластический диффероны в коже. Элементы первого из них сосредоточены преимущественно в эпидермисе и придатках кожи, второго – в дермальном слое и подкожной жировой клетчатке. В соответствии с тканевой топографией при изучении СК кожи можно выделить несколько ниш, главные из которых – это ниша эпителиальных (эпидермальных) СК, дермальная и жировая ниши [35].

### Эпителиальные стволовые клетки кожи

Наиболее изученный тип резидентных СК взрослой кожи – мультипотентные эпителиальные стволовые клетки (ЭпСК), которые в онтогенезе происходят от клеток нейроэктодермы. Во взрослой коже ЭпСК сосредоточены в виде трех основных пролиферирующих тканеспецифических субпопуляций: в базальном слое интерфолликулярного эпидермиса, выпячивании наружной оболочки (наружного эпителиального влагалища) волосяного фолликула и вблизи сальных желез (рис. 2) [18]. На протяжении всей жизни человека эти субпопуляции отвечают за физиологическое формирование многослойного ороговевающего эпителия, рост волос, образование кожного жира и восстановление целостности кожного покрова при повреждениях.

Субпопуляции ЭпСК являются частью эпителиального дифферона. Он представляет собой иерархическую структуру, в основании которой находятся медленно делящиеся базальные ЭпСК, поддерживающие свою жизнедеятельность в течение продолжительных периодов времени путем асимметричного деления. Стволовые клетки дают начало клеткам-предшественникам с коротким жизненным циклом, так называемым транзиторным амплифицирующимся клеткам (ТАК), представляющим собой дочернее поколение коммитированных клеток-предшественников, которые предназначены для конечной дифференцировки. В интерфолликулярном эпидермисе ТАК способны пройти 2–4 цикла деления, перемещаясь из базального слоя к поверхности кожи (рис. 3) [4]. Процесс дифференцировки базальных ЭпСК в зрелые кератиноциты-корнециты, происходящий при перемещении ТАК наружу, приводит к формированию шиповатого, зернистого, блестящего (тонкий слой клеток, на рис. 3 не показан) и рогового слоев. Именно ТАК, способные к быстрому делению, обеспечивают непрерывное обновление эпидермиса и прогрессивно гибнут в процессе апоптоза в течение жизни.

Эпителиальные СК интерфолликулярного эпидермиса, часто называемые эпидермальными, имеют несколько ограниченный дифференциро-

niches due to the specifics of their organization. As the elements of the same differon (set of cellular forms from SCs to highly differentiated cells forming a particular lineage) develop and differentiate, they appear in different layers of the skin. Currently, the main targets of researchers' interest are epithelial and fibroblast differons of the skin. The elements of the first one are found mainly in the epidermis and skin appendages, and components of the second differon are in the dermis and subcutaneous fat. In accordance with the tissue topography several skin SC niches could be distinguished, and the principal ones are epithelial (epidermal) SC niche, dermal and adipose niches [35].

### Epithelial stem cells of the skin

The most studied type of adult skin resident SCs are the multipotent epithelial stem cells (EpSCs), that originate ontogenetically from neuroectodermal cells. In adult skin the EpSCs exist as three main proliferating tissue-specific subpopulations: in the basal layer of the interfollicular epidermis, the hair follicle outer shell (the outer epithelial sheath) bulge, and near the sebaceous glands (Fig. 2) [15]. Through the whole life of a human these subpopulations are responsible for the physiological formation of a multilayer stratum epithelium, hair growth, formation of sebum and restoration of skin integrity in a case of damage.



Рис. 2. Схематическое строение волосяного фолликула.  
Fig. 2. Schematic representation of hair follicle.

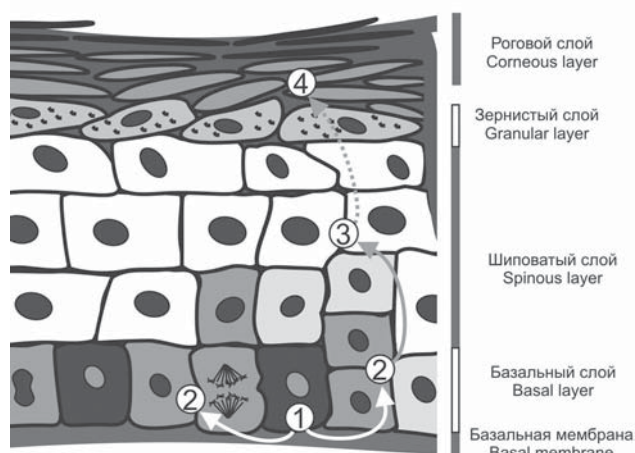
вочный потенциал, некоторые исследователи даже полагают, что они унипотентны, т. е. способны формировать только клеточную линию эпидермальных кератиноцитов [10].

Эпителиальные СК волосяного фолликула (ВФ) находятся в компартменте выпячивания (*bulge*) наружной оболочки корня волоса, под сальной железой (см. рис. 2). Они, как и все СК, являются медленно циклирующими клетками. Их потомки – ТАК наружной оболочки корня волоса – мигрируют к основанию волосяной луковицы и формируют активно пролиферирующий фолликулярный матрикс, который окружает дермальный сосочек ВФ. После всплеска пролиферации эпителиальные ТАК матрикса вступают в процессы дифференцировки и формируют волосяной канал, внутреннюю оболочку (внутреннее эпителиальное влагалитце) корня и стержень волоса. Как в физиологических условиях, так и после раневого повреждения происходит миграция ТАК из ВФ в интерфолликулярный эпидермис, сальные и потовые железы, и быстро делящиеся потомки ТАК образуют эпителиальные клеточные линии соответствующих структур кожи. Способность СК из области выпячивания наружной оболочки корня волоса формировать эпителиальные клеточные линии не только волосяного фолликула и сальной железы, но и интерфолликулярного эпидермиса свидетельствует об их высоком мультилинейном дифференцировочном потенциале.

Сальные железы кожи человека содержат небольшое количество ЭпСК и клеток-предшественников, локализованных вблизи или в основании сальной железы. Эти клетки пролиферируют, образуя дифференцированные клетки сальной железы – себоциты.

Таким образом, отдельные субпопуляции мультипотентных ЭпСК кожи различаются по своему исходному дифференцировочному потенциалу: ЭпСК интерфолликулярного эпителия и ЭпСК сальных желез дифференцируются соответственно в кератиноциты и себоциты, в то время как ЭпСК из выпячивания волосяного фолликула способны к поддержанию полного спектра эпителиальных дифференцировок кожи.

При изучении программ эпидермального гомеостаза выяснилось, что в основе регуляции функционирования ЭпСК лежат сигналы микроокружения – ниш стволовых клеток. Для ЭпСК межфолликулярного эпидермиса клетки ниши, базальные эпидермоциты, формируют основные межклеточные сигналы Wnt, Notch [11], поскольку наиболее важными путями регуляции функционирования этих СК являются Wnt/ $\beta$ -катенин, Shh и TGF- $\beta$ /BMP [37]. Для СК волосяного фолликула клеточной нишей



**Рис. 3.** Схематическое строение эпидермиса. Дифференцировка эпителиальных стволовых клеток (1) в транзитные амплифицирующиеся клетки (2) и далее в кератиноциты (3) и корнеоциты (4).

**Fig. 3.** Schematic representation of epidermis. Differentiation of EpSCs (1) to transient amplifying cells (2), thereafter keratinocytes (3) and corneocytes (4).

Subpopulation of EpSCs is a part of epithelial differentiation. The latter is a hierarchy based on slowly dividing basal EpSCs, supporting their long-term vitality by asymmetric division. The stem cells give the origin to progenitor cells with a short life cycle, so-called transient amplified cells (TACs), being the filial generation of committed progenitor cells intended for the terminal differentiation. The TACs are able to undergo 2–4 division cycles in interfollicular epidermis, migrating from the basal layer towards the surface of the skin (Fig. 3) [1]. The process of basal EpSCs differentiation into mature keratinocytes-corneocytes, occurring when the TACs migrate outwards (ectad), results in the formation of thorny, granular, brilliant (thin layer of cells, not shown in Fig. 3) and the horny layers. Exactly the TACs, able for the rapid division, provide a continuous renewal of the epidermis and progressively die in the process of apoptosis during an individual's lifetime.

Epithelial SCs of interfollicular epidermis, called often epidermal ones, have rather limited differentiation potential, some researchers believe even that they are unipotent, *i. e.*, capable to form only cell line of epidermal keratinocytes [7].

Epithelial hair follicle (HF) SCs are found in a bulbar region (*bulge*) of hair root outer sheath near the sebaceous gland (see Fig. 2). Like all the SCs they are slowly cycling cells. Their descendants, TACs of hair root outer sheath, migrate to the bed of the hair follicle and form actively proliferating follicular matrix that surrounds the dermal papilla of HF. After the proliferation burst the matrix epithelial TACs start to differentiate and form the hair canal, the hair root inner

выступает сосудистая система фолликула, а основными межклеточными сигналами – Wnt, BMP, TGF- $\beta$  [9]. Помимо сложных внутриэпителиальных связей, процессы в ЭпСК регулируются сигналами из подлежащей дермы (например, периодической экспрессией BMP2 и BMP4).

Сведения о способности ЭпСК к дифференцировке, отличным от приведенных эпителиальных, практически отсутствуют, однако известно, что после соответствующей стимуляции они могут экспрессировать антигены, характерные для эмбриональных СК и СК гемопоэтических линий, а при экспериментальной ауотрансплантации обеспечивают восстановление поврежденной роговицы глаза [38]. Недавно было показано, что необратимо коммитированные ТАК из линии ЭпСК могут экспрессировать маркеры СК и возвращаться в свою нишу [19].

Современные методы культивирования *in vitro* позволяют получать популяции ЭпСК человека, обладающие способностью образовывать эпидермальные клетки (кератиноциты) в условиях дальнейшего клинического применения в составе биоинженерных эквивалентов кожи и ранозаживляющих продуктов.

#### **Стволовые клетки меланоцитов**

В областях кожи, сформированных преимущественно потомками ЭпСК, обнаруживаются меланоциты – потомки клеток нервного гребня, провизорного органа, возникающего в эмбриогенезе во время нейруляции зародыша [31]. Большинство меланоцитов содержится в базальном слое эпидермиса кожи, волосяных фолликулах, иногда в дерме, слизистых оболочках и др. Они ответственны за пигментацию волос, кожи и глаз, поскольку являются специализированными клетками, вырабатывающими пигменты меланины.

Впервые популяция стволовых клеток меланоцитов (МелСК) была идентифицирована в области выпячивания наружного эпителиального влагалища волосяных фолликулов, которое считают их основной анатомической нишей, резервуаром, обеспечивающим пигментацию кожи и волос [25]. Эти клетки находятся там вместе с ЭпСК, обеспечивающими образование волос. В ходе каждого нового цикла развития волос указанные две популяции СК синхронно активируются и в дальнейшем пролиферируют и линейное продвижение СК во время цикла развития волос регулируются сигналами микроокружения. На стадии перехода из периода покоя (телогена) в фазу роста (анаген) МелСК асимметрично делятся и производят клетки-предшественники меланоцитов (ТАК), способные к пролиферации и миграции к основанию волосяной луковицы, в

shell and hair shaft. Both in physiological conditions and post wound injury the ТАСs migrate from HF to interfollicular epidermis, sebaceous and sweat glands, and thereafter the rapidly dividing descendants of ТАСs form epithelial cell lines for relevant skin structures. Ability of СКs from hair root outer sheath bulbar region to form epithelial cell lines not only of the hair follicle and sebaceous gland, but of interfollicular epidermis indicates their high multilineage differentiation potential as well.

Human skin sebaceous glands contain a small amount of EpСКs and progenitor cells, localized near or directly in the bed of the sebaceous gland. These cells proliferate and form differentiated cells of the sebaceous gland, the sebocytes.

Thus, the subpopulations of skin multipotent EpСКs differ by their original differentiation potential: EpСКs of interfollicular epithelium and those of sebaceous glands differentiate respectively into corneocytes and sebocytes, while EpСКs of hair follicle bulbar region are able to provide a full range of epithelial differentiation of the skin.

Investigation of epidermal homeostasis pathways revealed that the EpСКs function control is based on the signaling of microenvironment, the stem cell niches. Interfollicular epidermis EpСКs are triggered by their niche cells, the basal epidermocytes, mainly using Wnt and Notch intercellular signals [8], as the most important pathways to control the functioning of these СКs are Wnt/ $\beta$ -catenin, Shh and TGF- $\beta$ /BMP [37]. Hair follicle СКs have their cell niche in follicle vascular system, and the main intercellular signals are Wnt, BMP, and TGF- $\beta$  [6]. Besides complex intraepithelial communications (signalling) the EpСКs activity is regulated by signals from the underlying dermis (*e. g.*, periodic expression of BMP2 and BMP4).

There are virtually no reports about the ability of EpСКs to differentiate into the lineages different from the mentioned above epithelial ones, but it is known that after appropriate stimulation they can express antigens characteristic of embryonic or hematopoietic stem cells and restore an injured cornea after experimental autologous transplantation [38]. Recently it has been shown, that irreversibly committed ТАСs of EpСКs lines could express СК markers and return to their niche [17].

Contemporary *in vitro* culture techniques allow to procure human EpСКs populations with the ability to form the epidermal cells (keratinocytes), which could be thereafter applied in clinics as a part of bioengineered skin equivalents and wound healing products.

#### **Melanocyte stem cells**

In areas of the skin, formed mostly of EpСКs descendants, one could find melanocytes, originating from

которой происходит процесс дифференцировки этих клеток-предшественников с образованием меланинов. Микроокружение МелСК способно как индуцировать, так и блокировать вступление в дифференцировку. Созревшие меланоциты могут передавать синтезированные ими меланины волосным клеткам, а клетки-предшественники меланоцитов – мигрировать сквозь дерму и эпидермис в составе развивающихся волосных фолликулов. Эта миграция и выживание зависят от рецептора c-Kit и его лиганда – фактора стволовых клеток SCF, в отсутствие которых наблюдается необратимая потеря пигментации у новорожденных грызунов и отсутствие меланоцитов у человека.

Существуют предположения, что МелСК присутствуют не только в области выпячивания оболочки ВФ, но и в других тканевых нишах. Показано, что мультипотентные СК дермального происхождения, выделенные из человеческой крайней плоти, в которой ВФ отсутствуют, также способны дифференцироваться в меланоциты. Это указывает на существование ниш меланоцитов в собственно дермальном слое кожи, более защищенном от внешних воздействий, чем эпидермис [20], однако эти представления нуждаются в уточнении.

### **Стволовые клетки дермы**

Стволовые клетки дермы изучены гораздо меньше, чем эпидермальные и ассоциированные с волосными фолликулами эпителиальные СК. Это удивительно, так как дерма может представлять большой резервуар СК взрослых, чем эпидермис и ВФ вместе взятые [26].

Дермальный слой кожи содержит сравнительно небольшое количество свободных клеток и клеточных структур различного генеза, находящихся в объемном гетерогенном внеклеточном матриксе, состоящем преимущественно из коллагенов, эластина и гликозаминогликанов. Соединительнотканые клетки различной степени зрелости, клетки сосудистой сети и мышц, поднимающих волос, адипоциты подкожного жира и клетки иммунной системы, которые заселяют дерму, являются производными эмбриональной мезодермы. Помимо этого, взрослая дерма является своеобразной матрицей, содержащей волосные луковицы, потовые и сальные железы, сосудистую сеть, нервные окончания, а также свободные клеточные элементы, происхождение и цитотип которых не всегда можно однозначно определить. Непросто ответить и на вопрос, какие популяции стволовых/прогениторных клеток обеспечивают гомеостаз дермы и где они, собственно, локализованы.

В результате исследований начала XXI века в дерме были обнаружены мультипотентные клетки-

the neural crest cells, a provisional organ emerging throughout embryogenesis at the stage of embryo neurulation [30]. Most melanocytes are in the basal layer of skin epidermis, hair follicles, sometimes in the dermis, mucous membranes, *etc.* They are responsible for the pigmentation of hair, skin and eyes, as they are specialized cells producing the pigments melanins.

For the first time the stem cell population of melanocytes (MelSCs) was identified in the hair follicle outer epithelial sheath bulge, considered as their main anatomical niche, and a reservoir to provide pigmentation of skin and hair [25]. These cells are situated there together with EpSCs, which provide hair formation. During each new cycle of hair growth, these two populations of SCs are activated synchronously and further proliferation and advancement of SCs during a cycle of hair growth are regulated by microenvironment signals. After transition from the resting period (telogen) to the growth phase (anagen) the MelSCs are asymmetrically divided, and produce melanocytes progenitors (TACs) capable of proliferation and migration to the hair follicle bed, where the process of differentiation of progenitors occurs and melanins are produced. Microenvironment of MelSCs is capable both to induce and to block the onset of differentiation. Mature melanocytes could transmit the synthesized melanin to the hair cells, and melanocyte progenitors are able to migrate through the dermis and epidermis as a part of developing hair follicles. Their migration and survival depend on the c-Kit receptor and its ligand, stem cell factor (SCF), which absence is accompanied with irreversible loss of pigmentation in newborn rodents and lack of melanocytes in humans.

There are the hypotheses that MelSCs are present not only in the HF shell bulge but in other tissue compartments as well. Multipotent SCs of dermal origin were isolated from human preputium, where no HFs are present, and these cells were also capable to differentiate into melanocytes. This indicates the existence of melanocyte niches even in the dermal layer of the skin, being more sheltered from external influences than the epidermis [18], but these findings are to be refined.

### **Stem cells of the dermis**

Stem cells of the dermis are much less studied than epidermal ones and the SCs associated with the hair follicles. This is quite surprising, since the dermis may be a larger SC reservoir in adults than the epidermis and HF together [26].

Skin dermal layer contains a relatively small number of free cells and cell associates of various origins, that are located in voluminous heterogeneous extracellular matrix, composed mainly of collagen, elastin and glycosaminoglycans. Connective tissue cells of varying ma-



предшественники. По данным одних исследований, эти клетки находятся во фракции адгезивных к пластику фибробластоподобных клеток первичной суспензии клеток дермы [7]. В других экспериментах, напротив, клетки-предшественники выявлялись среди неадгезивных клеток дермы [30]. Это привело к представлениям о том, что в дерме имеется две субпопуляции мультипотентных дермальных клеток, которые обеспечивают ее гомеостаз и способны к мезодермальным дифференцировкам, а именно, адгезивные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), производные эмбриональной мезенхимы, и неадгезивные в первичной культуре мультипотентные клетки-предшественники кожи (*Skin-derived precursors*, SKPs), происходящие из нервного гребня эмбриона. Эти субпопуляции выделяют в условиях культивирования первичной суспензии клеток дермы *in vitro* в соответствии со свойствами каждой из них, причем уже разработаны методики параллельного получения обеих субпопуляций из одного и того же кожного лоскута [42].

Идентификация МСК кожи затрудняется из-за их фенотипического сходства с фибробластами, преобладающим клеточным типом адгезивных клеток дермы. Этот тип имеет еще не полностью изученную физиологическую гетерогенность, что обусловлено клеточным разнообразием фибробластического дифферона [28]. Даже спустя 50 лет после первого описания МСК костного мозга А.Я. Фриденштейном [17] не найден исчерпывающий набор поверхностных маркеров, специфичных для этого типа клеток, хотя и выработаны минимальные критерии соответствия ему, а именно: фибробластоподобный вид, адгезивность к пластику, мезодермальный дифференцировочный потенциал, определенный иммунофенотип [13], высокий пролиферативный потенциал и способность к колониеобразованию. Мезенхимальные СК дермы отвечают этим критериям, поскольку экспрессируют нестин и маркеры CD44, CD73, CD90 и CD105, негативны по CD34 и CD45, обладают способностью дифференцироваться в адипоциты, клетки гладких мышц, остециты, хондроциты, в дермальные фибробласты и нейроны.

Практически общепризнанным источником мультипотентных СК дермы считаются дермальный сосочек и волосяная сумка ВФ, из которых они могут быть получены при культивировании *in vitro*. Мигрировавшие из единичных волосяных фолликулов взрослого человека адгезивные фибробластоподобные клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом и могут проходить вне организма более 45 удвоений популяции, прежде чем начинают проявляться признаки клеточного

турити, the cells of the vasculature and muscles, raising the hair, subcutaneous fat adipocytes and immune system cells populating the dermis are derived from embryonic mesoderm. Moreover, adult dermis contains hair follicles, sweat and sebaceous glands, vasculature, nerve terminals, and free cell elements, which origin and cytotype could not be always clearly defined. It is also hard to say which populations of stem/progenitor cells provide homeostasis of the dermis and where they are actually localized.

At the beginning of the 21<sup>st</sup> century the researchers succeeded to reveal multipotent progenitor cells lines in the dermis. According to several studies, these cells were found among the fraction of fibroblast-like cells of the primary dermis cell suspension which were adherent to the plastic [4]. In other experiments, *vice versa*, the progenitor cells were identified among the non-adherent cells of the dermis [29]. This led to the idea that dermis contained two subpopulations of multipotent cells maintaining its homeostasis and being capable of mesodermal differentiation, and namely adhesive multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs), being the derivatives of embryonic mesenchyma, and, secondly, non-adherent in primary culture multipotent progenitor cells of skin (*Skin-derived precursors*, SKPs), originating from the embryonic neural crest. These subpopulations could be isolated by *in vitro* culturing from initial cell suspension of the dermis in accordance with the properties of each one, moreover there are the techniques, allowing to procure both subpopulations from the same skin graft simultaneously [42].

Identification of skin MSCs is hampered by their phenotypic similarity with fibroblasts, being the predominant cell type among the adhesive cells of the dermis. This cell type has a physiological heterogeneity not fully studied yet, that is preconditioned by a cellular diversity of fibroblastic differon [27]. Even 50 years after the first description of bone marrow MSCs made by Friedenstein [14], a comprehensive set of surface markers specific for this cell type is not found, although there are minimum eligibility criteria chosen, namely fibroblast-like appearance, adhesion to plastic, mesodermal differentiation potential, some specific immunophenotype [10], high proliferative potential as well as the ability to colony formation. Dermal mesenchymal SCs meet these criteria since they express nestin and CD44, CD73, CD90 and CD105 markers, are negative for CD34 and CD45, have the ability to differentiate into adipocytes, smooth muscle cells, osteocytes, chondrocytes, dermal fibroblasts and neurons.

Almost generally accepted source of multipotent SCs of the dermis are dermal papilla and hair sac of HF from which they can be derived during *in vitro* culturing. Adhesive fibroblast-like cells, migrated from



старения. В условиях соответствующей индукции такие клетки вступают в дифференцировку в остео-, адипо-, хондро- или миогенном направлениях, причем более 70% клонов СК обнаруживают би- или трилинейный дифференцировочный потенциал [5]. Таким образом доказано, что адгезивные стромальные клетки волосяного фолликула взрослого человека являются истинными мультипотентными мезенхимальными СК, а не представляют собой гетерогенную популяцию клеток-предшественников с ограниченной способностью к дифференцировке.

Другой тип дермальных мультипотентных клеток, происходящий из дермального сосочка ВФ, SKPs, обладает способностью не только к мезодермальным, но и к ряду нейтральных дифференцировок. В отличие от МСК, первичные SKPs в культуре в присутствии ростовых факторов не адгезируют к пластику, а образуют сфероиды [15, 29].

Клеточные популяции SKPs из дермальных сосочков ВФ могут подобно МСК производить клетки дермы и индуцировать морфогенез волос [8]. Они также способны дифференцироваться в нейроны без селекции и экспансии, а в условиях индукции – производить потомков с фенотипом адипоцитов, гладкомышечных клеток и клеток периферической нервной системы, таких как шванновские клетки и катехоламинергические нейроны.

Сравнение свойств СК, полученных из дермального слоя кожи, со свойствами МСК костного мозга, наиболее изученного источника этого типа клеток, показало сходство исследуемых клеточных субпопуляций по морфо- и иммунофенотипу, пролиферативному и дифференцировочному потенциалу, а также иммуносупрессивным свойствам. При этом мультипотентные SKPs имеют несколько ограниченный мезодермальный, но более широкий нейрогенный потенциал, чем МСК, что определяется их происхождением из нервного гребня [34].

Таким образом, анатомической нишей мультипотентных СК дермы являются дермальный сосочек ВФ и перифолликулярный слой дермальных клеток волосяной сумки [14]. В качестве возможного места локализации дермальных СК также называют периваскулярную зону, поскольку установлено, что примерно 20% адгезивных дермальных клеток экспрессируют CD146 [33], маркер перицитов [12] и эндотелиальных клеток [6]. Поскольку МСК дермы не экспрессируют эндотелиальные маркеры CD31 и CD34, то наличие CD146 указывает, скорее всего, на их структурно-функциональное сродство с перицитами. Подобное предположение недавно нашло свое подтверждение

single hair follicles of an adult, possess a high proliferative potential and could undergo *ex vivo* more than 45 population doublings before appearance of first signs of cellular aging. In appropriate induction conditions such cells start to differentiate into osteogenic, adipogenic, chondrogenic or myogenic directions, whereat more than 70% of the SC clones exhibit bi- or trilinear differentiation potential [2]. In other words, it was proved that the adhesive stromal cells of the hair follicle of an adult were true multipotent mesenchymal SCs, and did not represent a heterogeneous population of progenitor cells with limited capacity for differentiation.

Another type of dermal multipotent cells derived from the HF dermal papilla, the SKPs, has the ability not only to mesodermal but to a number of neural differentiation directions as well. Unlike MSCs, when cultured in the presence of growth factors the primary SKPs do not adhere to the plastic but form spheroids [12, 28].

Cell populations of SKPs from HF dermal papillae can produce dermal cells and induce hair morphogenesis like MSCs do [5]. They are also capable of differentiating into neurons without selection and expansion, and under induction conditions they produce an offspring with phenotypes of adipocytes, smooth muscle cells and the cells of peripheral nervous system such as Schwann cells and catecholaminergic neurons.

Comparing the properties of SCs obtained from the skin dermal layer with the properties of bone marrow MSCs, being the most studied source of this type of cells, revealed the similarities of studied cell subpopulations by morpho- and immunophenotype, proliferative and differentiation potential and immunosuppressive properties as well. Herewith, multipotent SKPs have narrower mesodermal, but wider neurogenic potential, that is quite expectable due to their neural crest origin [34].

Thus, anatomical niche of dermal multipotent SCs are the HF dermal papilla and perifollicular layer of dermal cells in the hair sac (Fig. 4) [11]. As another possible localization of dermal SCs one distinguished a perivascular zone, as it was established that approximately 20% of adhesive dermal cells expressed CD146 [33], pericyte [9] and endothelial cell [3] markers. Since dermal MSCs do not express endothelial markers CD31 and CD34, the expression of CD146 likely indicates their structural and functional affinity with pericytes. Such an assumption has been confirmed recently: a small population of adherent cells was revealed along the blood vessels of the papillary layer in the skin dermis of the human head, mostly around the hair follicles; these cells possessed the properties characteristic for MSCs from perivascular areas of adipose tissue. The found cells also had fibroblast-like appearance, had the ability to form colonies, to dif-





дение: вдоль кровеносных сосудов сосочкового слоя дермы кожи головы человека, в основном вокруг волосяных фолликулов, выявлена немногочисленная популяция адгезивных клеток со свойствами, описанными для МСК периваскулярных зон жировой ткани. Обнаруженные клетки так же имели фибробластический вид, проявляли способность к колониеобразованию, дифференцированию в остео-, хондро- и адипогенном направлениях, экспрессировали маркер перicyтов NG2 и маркер гемопоэтических СК CD34. Эти наблюдения позволяют рассматривать периваскулярные зоны дермы как еще одну нишу МСК [36], хотя не исключается наличие и других сайтов СК дермы, что требует дальнейшего изучения.

### **Стволовые клетки подкожной жировой клетчатки**

Подкожная жировая клетчатка состоит в основном из жировых клеток адипоцитов, организованных в дольки, которые занимают более 90% объема ткани, и поддерживающей волокнистой стромы. Кроме того, жировая клетчатка содержит преадипоциты, фибробласты, гладкомышечные клетки сосудов, перicyты, эндотелиальные клетки, резидентные моноциты/макрофаги, лимфоциты и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани (ЖТ). После ферментативной обработки жировой клетчатки с целью удаления зрелых адипоцитов оставшиеся клетки представляют собой стромально-васкулярную фракцию (СВФ), из которой в результате процессинга или при культивировании могут быть выделены МСК ЖТ. Они в настоящее время являются одной из наиболее изучаемых и перспективных популяций мультипотентных мезенхимальных стромальных стволовых клеток человека и животных. Это связано с тем, что процедура извлечения исходной жировой ткани сравнительно малоинвазивна, возможно получение больших объемов липоасpirата без ущерба для пациентов, относительно количество МСК в жировой ткани на порядок выше, чем в костном мозге – «золотом стандарте» для получения МСК. Эти особенности, а также выявленный высокий потенциал дифференцирования в жировые, хрящевые, костные, гладкомышечные и эндотелиальные клетки [21] обуславливают несомненное преимущество МСК ЖТ по сравнению с клетками, полученными из других тканевых источников.

Содержание и свойства МСК в жировой ткани зависят от донорского участка: их максимальная концентрация отмечена в подкожной клетчатке рук, а наибольшая пластичность – у клеток, выделен-

ferentiate into osteo-, chondro- and adipogenic directions, expressed NG2, a pericyte marker, and CD34, a marker of hematopoietic SCs. These observations allow to consider dermal perivascular zones as another niche of MSCs [36], although the existence of other sites of dermal SCs could not be excluded, and requires further study.

### **Stem cells of subcutaneous fat**

Subcutaneous adipose tissue consists primarily of adipocytes, or fat cells, organized into lobes occupying more than 90% of the tissue, and supporting fibrous stroma. Furthermore, it contains preadipocytes, fibroblasts, vascular smooth muscle cells, pericytes, endothelial cells, resident monocytes/macrophages, lymphocytes and multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue (AT). As a result of enzymatic treatment of adipose tissue in order to remove mature adipocytes the remaining cells represent stromal-vascular fraction (SVF), which could be processed or cultured to isolate AT MSCs. The latter is currently one of the most studied and prospective populations of multipotent mesenchymal stromal stem cells from humans and animals. This is due to the fact that the procedure of initial adipose tissue extraction is rather low invasive, it is possible to procure voluminous lipoaspirates without prejudice to the patients, and the relative amount of MSCs in adipose tissue is much higher than in the bone marrow, being the ‘gold standard’ for MSCs. These features, as well as revealed high potential of differentiation into adipose, cartilaginous, osseous, smooth muscle and endothelial cells [19], determine an undoubted advantages of AT MSCs if compared with the cells derived from other tissue sources.

The content and properties of MSCs in adipose tissue depend on the donor site position: their maximum concentration was observed in the subcutaneous tissue of the hands, and the greatest plasticity was found in the cells isolated from the inguinal region [24]. Precise localization of AT MSCs anatomical niches needs to be justified: some researchers indicate that these cells are found in the perivascular areas, as they are capable of expressing cell surface antigens characteristic of pericytes [31]. Immunophenotypic study of freshly isolated SVF of adipose tissue confirmed that it had heterogeneous composition and included main subpopulations of stem/progenitor cells, closely associated with small blood vessels: endothelial progenitor cells of the vessel lumen, adventitious pericytes, and supraadventitious AT MSCs surrounding the vessel like an envelope [40, 41]. Using the technique of organ culture of adipose tissue the MSCs were isolated from the interstitium between adipocytes and endothelium, which also indicated their origin from perivascular areas [39].

ных из паховой области [24]. Точная локализация анатомических ниш МСК ЖТ нуждается в уточнении: некоторые исследователи указывают, что эти клетки находятся в периваскулярных областях, поскольку способны экспрессировать поверхностные клеточные антигены, свойственные перицитам [32]. Иммунофенотипическое исследование свежeweделенной СВФ жировой ткани подтвердило, что она является гетерогенной по составу и включает основные субпопуляции стволовых/прогениторных клеток, тесно связанные с мелкими кровеносными сосудами: эндотелиальные клетки-предшественники просвета сосуда, перициты, входящие в адвентициальный слой, и супраадвентициальные МСК ЖТ, которые окружают сосуд в виде оболочки [40, 41]. При помощи методики органного культивирования жировой ткани МСК были выделены из интерстиция между адипоцитами и эндотелием, что также свидетельствует об их происхождении из периваскулярной зоны [39]. Иммуногистохимический анализ показал, что маркеры СК (например, STRO-1, Wnt5a, SSEA1) в жировой ткани дифференцированно экспрессируются в капиллярах, артериолах и артериях. Это дало основание предполагать, что МСК ЖТ могут фактически быть сосудистыми СК на различных стадиях дифференцировки [22]. С другой точки зрения, взаимная конкуренция между эндотелиальными клетками и МСК ЖТ может регулировать образование кровеносных сосудов, а незрелые адипоциты продуцируют ростовые факторы, контролирующие активность СК волосяного сосочка [16]. В совокупности эти результаты показывают, что МСК ЖТ тесно связаны с сосудистым и фолликулярным гомеостазом, но необходимы дальнейшие исследования для точного определения их месторасположения и роли в нем [21].

Монослойное культивирование или другие методы получения МСК из свежeweделенной СВФ ЖТ в конечном итоге приводят к получению преимущественно гомогенной популяции адгезивных к пластику высокопотентных фибробластоподобных клеток, соответствующих критериям МСК [43]. Морфофункциональные характеристики этих изолированных клеток активно изучаются, однако попытки установить их точный иммунофенотип и определить четкие различия между ними и фибробластами пока не увенчались успехом [23]. Очевидно, что методы получения МСК ЖТ существенно влияют на соотношение различных типов присутствующих клеток. В свою очередь, условия культивирования, в частности состав среды культивирования и механофизиологическое окружение (трехмерное культивирование, введение механической нагрузки на клетки и степень оксигенации) отражаются на профиле экспрессии генов МСК ЖТ.

Immunohistochemical analysis revealed that SC markers (*e. g.*, STRO-1, Wnt5a, SSEA1) of adipose tissue are expressed differentially in capillaries, arterioles and arteries. This gave the reason to believe that AT MSCs might actually be a vascular SCs at various stages of differentiation [20]. From another point of view, a mutual competition between endothelial cells and AT MSCs could trigger the formation of blood vessels, and immature adipocytes could produce growth factors controlling the activity of hair papilla SCs [13]. Taken together, these hypotheses indicate that AT MSCs are closely associated with vascular and follicular homeostasis, but further studies are needed to pinpoint their location and their responsibilities [19].

Monolayer culture or other methods of procurement of MSCs from freshly isolated AT SVF finally result in a predominantly homogeneous population of adherent to plastic highly potent fibroblast-like cells meeting the criteria of MSCs [43]. Morphological and functional characteristics of these isolated cells are actively studied, but the attempts to establish their comprehensive immunophenotype and to define a clear distinction between them and fibroblasts were to the moment unsuccessful [21]. Obviously, the methods of obtaining the AT MSCs significantly affect the ratio of different types of present cells. In turn, the culture conditions, in particular, the composition of culture medium and mechanophysiological environment, such as three-dimensional culturing, applying of mechanical stress on the cell and the degree of oxygenation are reflected in the gene expression profile in AT MSCs.

Although the AT MSCs are of mesodermal origin, it was found that they could differentiate, along with mesodermal, to ectodermal and endodermal directions [43]. Mesodermal potential of AT MSCs allows them to differentiate into adipo-, osteo-, chondro-, myo-, angio-, periodontogenous and cardiomyocytic lineages [23]. In appropriate microenvironment, they may express the ectodermal phenotype markers, *e. g.* cytokeratins 8 and 18, inherent to the epithelial cells, could differentiate into neurons or neuronal progenitor cells. Of undoubted interest is an endodermal potential of AT MSCs, which allows them to enter the induced differentiation into hepatocytes and insulin-producing cells [21].

Collectively, the described data indicate that the skin is a complex set of tissues with a high restoration potential, contains a wide repertoire of SCs, among which are the resident epithelial stem/progenitor cells, mesenchymal stromal cells, dermal progenitor cells with neural-mesenchymal potential (SKPs), melanocyte stem cells and blood-vessel-associated multipotent mesenchymal stem/progenitor cells of subcutaneous fat.



Хотя МСК ЖТ имеют мезодермальное происхождение, установлено, что они могут дифференцироваться, кроме мезодермального, в эктодермальном и энтодермальном направлениях [43]. Мезодермальный потенциал МСК жировой ткани позволяет им дифференцироваться в адипо-, остео-, хондро-, мио-, ангио-, периодонтогенном и кардиомиоцитарном направлениях [3]. В условиях соответствующего микроокружения они могут экспрессировать маркеры эктодермального фенотипа, например, цитокератины 8 и 18, свойственные эпителиальным клеткам, способны дифференцироваться в нейроны или нейрональные клетки-предшественники. Представляет несомненный интерес энтодермальный потенциал МСК ЖТ, который позволяет им вступать в индуцированную дифференцировку в гепатоциты и инсулинпродуцирующие клетки [23].

Таким образом, изложенные материалы свидетельствуют о том, что кожа, как сложный комплекс тканей с высоким восстановительным потенциалом, содержит широкий репертуар СК, среди которых присутствуют резидентные эпителиальные стволовые/прогениторные клетки, мезенхимальные стромальные клетки, дермальные клетки-предшественники с нейтрально-мезенхимальным потенциалом (SKPs), стволовые клетки меланоцитов и связанные с кровеносными сосудами мультипотентные мезенхимальные стволовые/прогениторные клетки подкожной жировой клетчатки.

Благодаря активному интересу к изучению особенностей восстановительного потенциала кожи в последние годы разработаны современные методы и технологии адекватного выделения СК из этого органа и дана характеристика его стволового резерва [27]. Дальнейшее изучение и практическое использование изолированных популяций СК кожи в значительной мере зависят от достижений криобиологии. На основании применения теоретических постулатов и практических разработок криобиологической науки возможно создание низкотемпературных банков криоконсервированных суспензий высокосохранных СК кожи различного генеза и искусственных эквивалентов, включающих эти клетки. Полноценные криоконсервированные высокопотентные СК кожи могут найти применение при изучении нормальной, а также патологической физиологии и биохимии покровных тканей, при исследовании влияния различных химических соединений или лекарств на СК кожи, для синтеза в клеточных культурах ростовых факторов и цитокинов, получения клональных и iPS-клеток, а также в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Owing to an active interest to the investigation of peculiarities exhibited by skin restoration potential, modern methods and technologies have been developed recently to adequately isolate SCs from this organ and characteristics of its stem cell reserve were described [27]. Further study and practical use of skin isolated SC populations are largely dependent on the achievements of cryobiology. Basing on the application of theoretical postulates and practical developments of cryobiological science one could establish low-temperature banks of cryopreserved suspensions of vital skin SCs of various origins, as well as synthetic equivalents comprising these cells. Full value cryopreserved highly potent skin SCs may find their applications in studies of normal and pathological physiology and biochemistry of epithelial tissues, during studying the effects of various chemical compounds or drugs on the skin SCs, for cell-culture-based synthesis of growth factors and cytokines, obtaining of clonal and iPS-cell, and finally, in tissue engineering and regenerative medicine.

## References

1. Alonso L., Fuchs E. Stem cells of skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(Suppl 1): 11830–11835.
2. Bajpai V.K., Mistriotis P., Andreadis S.T. Clonal multipotency and effect of long-term in vitro expansion on differentiation potential of human hair follicle derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res* 2012; 8(1): 74–84.
3. Bardin N., Anfoso F., Masse J.M. et al. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood* 2001; 98: 3677–3684.
4. Bartsch G., Yoo J.J., De Coppi P. et al. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev* 2005; 14(3): 337–348.
5. Biernaskie J., Paris M., Morozova O. et al. SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5(6): 610–623.
6. Blanpain C., Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 339–373.
7. Blanpain C., Lowry W.E., Geoghegan A. et al. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 2004; 118(5): 635–638.
8. Clayton E., Doupe D.P., Klein A.M. et al. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* 2007; 446(7132): 185–189.
9. Crisan M., Yap S., Casteilla L. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 301–313.
10. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–317.
11. Driskell R.R., Clavel C., Rendl M., Watt F.M. Hair follicle dermal papilla cells at a glance. *J Cell Sci* 2011; 124: 1179–1182.
12. Fernandes K.J.L., Toma J.G., Miller F.D. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Phil Trans R Soc B* 2008; 363(1489): 185–198.
13. Festa E., Fretz J., Berry R. et al. Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell* 2011; 146(5): 761–771.



## Литература

1. Грищенко В.И., Гольцев А.Н., Щегельская Е.А. и др. Криоконсервирование стволовых клеток // *Достижения биологии та медицини*. – 2006. – Т. 7, №1. – С. 4–9.
2. Петренко А.Ю., Хунов Ю.А., Иванов Э.Н. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения. – Луганск, 2011. – 368 с.
3. Петренко Ю.О., Домбровский Д.Б., Салютин Р.В. та ін. Формування капілярноподібних структур стромальними клітинами жирової тканини і фетальної печінки людини в процесі культивування // *Львівський медичний часопис/Acta Medica Leopoliensia*. – 2010. – Т. 16, №1. – С. 40–45.
4. Alonso L., Fuchs E. Stem cells of skin epithelium // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. –2003. – Vol. 100 (Suppl 1). – P. 11830–11835.
5. Bajpai V.K., Mistriotis P., Andreadis S.T. Clonal multipotency and effect of long-term in vitro expansion on differentiation potential of human hair follicle derived mesenchymal stem cells // *Stem Cell Res*. – 2012. – Vol. 8, №1. – P. 74–84.
6. Bardin N., Anfosso F., Masse J.M. et al. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion // *Blood*. – 2001. – Vol. 98. – P. 3677–3684.
7. Bartsch G., Yoo J.J., De Coppi P. et al. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors // *Stem Cells Dev*. – 2005. – Vol. 14, №3. – P. 337–348.
8. Biernaskie J., Paris M., Morozova O. et al. SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells // *Cell Stem Cell*. – 2009. – Vol. 5, №6. – P. 610–623.
9. Blanpain C., Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. – 2006. –Vol. 22. – P. 339–373.
10. Blanpain C., Lowry W.E., Geoghegan A. et al. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche // *Cell*. –2004. – Vol. 118, №5. – P. 635–638.
11. Clayton E., Doupe D.P., Klein A.M. et al. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis // *Nature*. – 2007. – Vol. 446, №7132. – P. 185–189.
12. Crisan M., Yap S., Casteilla L. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs // *Cell Stem Cell*. – 2008. – Vol. 3, №3. – P. 301–313.
13. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. – 2006. – Vol. 8, №4. – P. 315–317.
14. Driskell R.R., Clavel C., Rendl M., Watt F.M. Hair follicle dermal papilla cells at a glance // *J. Cell Sci*. – 2011. – Vol. 124. – P. 1179–1182.
15. Fernandes K.J.L., Toma J.G., Miller F.D. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential // *Phil. Trans. R. Soc. B*. – 2008. – Vol. 363, №1489. – P. 185–198.
16. Festa E., Fretz J., Berry R. et al. Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling // *Cell*. – 2011. – Vol. 146, №5. – P. 761–771.
17. Friedenstain A.J., Shapiro-Piatetzky I.I., Petrakova K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells // *J. Embryol. Exp. Morphol*. – 1966. – Vol. 16, №3. – P. 381–390.
18. Fuchs E., Horsley V. More than one way to skin... // *Genes Dev*. – 2008. – Vol. 22, №8. – P. 976–985.
19. Hsu Y.C., Pasolly H.A., Fuchs E. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle // *Cell*. – 2011. – Vol. 144, №1. – P. 92–105.
20. Li L., Fukunaga-Kalabis M., Yu H. et al. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes // *J. Cell Sci*. – 2010. – Vol. 23, №6. – P. 853–860.
21. Lin C.S., Xin Z.C., Deng C.H. et al. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture // *Histol. Histopathol*. – 2010. – Vol. 25, №6. – P. 807–815.
22. Friedenstain A.J., Shapiro-Piatetzky I.I., Petrakova K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp. Morphol* 1966; 16(3): 381–390.
23. Fuchs E., Horsley V. More than one way to skin... *Genes Dev* 2008; 22(8): 976–985.
24. Grischenko V.I., Goltsev A.N., Shchegelskaya Ye.A. et al. Cryopreservation of stem cells. *Dosyagnennya Biologii ta Medytsyny* 2006; 7(1): 4–9.
25. Hsu Y.C., Pasolly H.A., Fuchs E. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. *Cell* 2011; 144(1): 92–105.
26. Li L., Fukunaga-Kalabis M., Yu H. et al. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *J Cell Sci* 2010; 23(6): 853–860.
27. Lin C.S., Xin Z.C., Deng C.H. et al. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol* 2010; 25(6): 807–815.
28. Lin G., Garcia M., Ning H. et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev* 2008; 17(6): 1053–1063.
29. Mizuno H., Tobita M., Uysal A.C. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 2012; 30(5): 804–810.
30. Petrenko A.Yu., Khunov Yu.A., Ivanov E.N. Stem cells. Features and perspectives of clinical application. *Lugansk*; 2011.
31. Petrenko Yu.O., Dombrovsky D.B., Salyutin R.V. et al. Capillary structure formation by cultivated human stromal cells from fatty tissue and fetal liver. *Acta Medica Leopoliensia* 2010; 16(1): 40–45.
32. Prunet-Marcassus B., Cousin B., Caton D. et al. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res* 2006; 312(6): 727–736.
33. Sarin K.Y., Artandi S.E. Aging, graying and loss of melanocyte stem cells. *Stem Cell Rev* 2007; 3(3): 212–217.
34. Sellheyer K., Krahl D. Skin mesenchymal stem cells: prospects for clinical dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63(5): 859–865.
35. Sorrell J.M., Baber M.A., Caplan A.I. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult dermis. *Cell Tissue Research* 2007; 327(3): 499–510.
36. Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001; 3(9): 778–784.
37. Toma J.G., McKenzie I.A., Bagli D., Miller F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 2005; 23(6): 727–737.
38. Thomas A.J., Erickson C.A. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21(6): 598–610.
39. Traktuev D.O., Merfeld-Clauss S., Li J. et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 2008; 102(1): 77–85.
40. Turksen K., editor. *Skin stem cells*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013.
41. Vaculik C., Schuster C., Bauer W. et al. Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets. *J Invest Dermatol* 2012; 132(3): 563–574.
42. Vishnubalaji R., Al-Nbaheen M., Kadalmani B. et al. Skin-derived multipotent stromal cells – an archival for mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 2012; 350(1): 1–12.
43. Wong V.W., Levi B., Rajadas J. et al. Stem cell niches for skin regeneration. *International Journal of Biomaterials* 2012; Article ID 926059.
44. Yamanishi H., Fujiwara S., Soma T. Perivascular localization of dermal stem cells in human scalp. *Exp Dermatol* 2012; 21(1): 78–80.
45. Yang L., Peng R. Unveiling hair follicle stem cells. *Stem Cell Rev* 2010; 6(4): 658–664.



22. Lin G., Garcia M., Ning H. et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue // *Stem Cells Dev.* – 2008. – Vol. 17, №6. – P. 1053–1063.
23. Mizuno H., Tobita M., Uysal A.C. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine // *Stem Cells.* – 2012. – Vol. 30, №5. – P. 804–810.
24. Prunet-Marcassus B., Cousin B., Caton D. et al. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences // *Exp Cell Res.* – 2006. – Vol. 312, №6. – P. 727–736.
25. Sarin K.Y., Artandi S.E. Aging, graying and loss of melanocyte stem cells // *Stem Cell Rev.* – 2007. – Vol. 3, №3. – P. 212–217.
26. Sellheyer K., Krahl D. Skin mesenchymal stem cells: prospects for clinical dermatology // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2010. – Vol. 63, №5. – P. 859–865.
27. *Skin Stem Cells* / Ed. by K. Turksen. – Totowa: Humana Press, 2013. – 320 p.
28. Sorrell J.M., Baber M.A., Caplan A.I. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult dermis // *Cell Tissue Research.* 2007. – Vol. 327, №3. – P. 499–510.
29. Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin // *Nat. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 3, №9. – P. 778–784.
30. Toma J.G., McKenzie I.A., Bagli D., Miller F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin // *Stem Cells.* – 2005. – Vol. 23, №6. – P. 727–737.
31. Thomas A.J., Erickson C.A. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest // *Pigment Cell Melanoma Res.* – 2008. – Vol. 21, № 6. – P. 598–610.
32. Traktuev D.O., Merfeld-Clauss S., Li J. et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 102, №1. – P. 77–85.
33. Vaculik C., Schuster C., Bauer W. et al. Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets // *J. Invest. Dermatol.* – 2012. – Vol. 132, №3. – P. 563–574.
34. Vishnubalaji R., Al-Nbaheen M., Kadalmani B. et al. Skin-derived multipotent stromal cells—an archrival for mesenchymal stem cells // *Cell Tissue Res.* – 2012. – Vol. 350, №1. – P. 1–12.
35. Wong V.W., Levi B., Rajadas J. et al. Stem cell niches for skin regeneration // *International Journal of Biomaterials.* – 2012. – Article ID 926059.
36. Yamanishi H., Fujiwara S., Soma T. Perivascular localization of dermal stem cells in human scalp // *Exp. Dermatol.* – 2012. – Vol. 21, №1. – P. 78–80.
37. Yang L., Peng R. Unveiling hair follicle stem cells // *Stem Cell Rev.* – 2010. – Vol. 6, №4. – P. 658–664.
38. Yang X., Moldovan N.I., Zhao Q. et al. Reconstruction of damaged cornea by autologous transplantation of epidermal adult stem cells // *Mol. Vis.* – 2008. – Vol. 14. – P. 1064–1070.
39. Yang Y.I., Kim H.I., Choi M.Y. et al. Ex vivo organ culture of adipose tissue for in situ mobilization of adipose-derived stem cells and defining the stem cell niche // *J. Cell Physiol.* – 2010. – Vol. 224, №3. – P. 807–816.
40. Zimmerlin L., Donnenberg V.S., Pfeifer M.E. et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue // *Cytometry A.* – 2010. – Vol. 77, №1. – P. 22–30.
41. Zimmerlin L., Donnenberg V.S., Rubin J.P., Donnenberg A.D. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells // *Cytometry A.* – 2013. – Vol. 83, №1. – P. 134–140.
42. Zong Z., Li N., Ran X., Su Y. et al. Isolation and characterization of two kinds of stem cells from the same human skin back sample with therapeutic potential in spinal cord injury // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, №11. – e50222.
43. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies // *Tissue Eng.* – 2001. – Vol. 7, №2. – P. 211–228.
38. Yang X., Moldovan N.I., Zhao Q. et al. Reconstruction of damaged cornea by autologous transplantation of epidermal adult stem cells. *Mol Vis* 2008; 14: 1064–1070.
39. Yang Y.I., Kim H.I., Choi M.Y. et al. Ex vivo organ culture of adipose tissue for in situ mobilization of adipose-derived stem cells and defining the stem cell niche. *J Cell Physiol* 2010; 224(3): 807–816.
40. Zimmerlin L., Donnenberg V.S., Pfeifer M.E. et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A* 2010; 77(1): 22–30.
41. Zimmerlin L., Donnenberg V.S., Rubin J.P., Donnenberg A.D. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A* 2013; 83(1): 134–140.
42. Zong Z., Li N., Ran X., Su Y. et al. Isolation and characterization of two kinds of stem cells from the same human skin back sample with therapeutic potential in spinal cord injury. *PLoS One* 2012; 7(11): e50222.
43. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2): 211–228.