

Киямова Марита Ринатовна

лаборант-исследователь

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический
университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический
университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

Фирсова Наталья Викторовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический
университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

Ленгесова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический
университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

Безрукова Ульяна Алексеевна

младший научный сотрудник
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет
им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Сихарулидзе Сергей Владимирович

пластический хирург

Многопрофильная больница «ВМ-клиник»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-102248

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ТОПОГРАФИЧЕСКИХ УЧАСТКОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация: на основе анализа протоколов отечественных и зарубежных исследований оптимизированы протоколы выделения и культивирования цитотипов различных топографических участков кожи человека с учётом количества выделенных клеток и сроков формирования монослоя. Определены оптимальный период работы с биоптатом с момента забора материала до введения его в работу, режим культивирования клеток и наиболее эффективный вариант механической и ферментативной дезагрегации биоптата кожи. Данная работа проводится в качестве начального этапа для дальнейшего изучения реактивности цитотипов кожи (фибробласты и меланоциты) в системе *in vitro* в ответ на внешние воздействия, такие как ультрафиолетовое облучение, в рамках проекта по изучению онкогенеза меланомы.

Ключевые слова: клеточные технологии, протокол выделения, клетки кожи, меланома, меланоциты, фибробласты.

Высокая перспективность применения клеточных линий для создания клеточного продукта в аспекте их использования в регенеративной медицине определяет важность и актуальность стандартизации и оптимизации процессов

выделения и культивирования клеток различных органов и тканей человека [12; 13; 21].

Идея культивирования, как и сами протоколы работы с клетками, претерпела ряд исторических этапов развития, методики культивирования постоянно оптимизируются в зависимости от направления исследования [6; 8; 9]. Клеточная система *in vitro* является модельной системой для изучения морфологических, метаболических показателей, динамики поведения клеток и их реакции на различные агенты, что актуально в аспекте изучения механизмов онкогенеза меланомы и других онкозаболеваний [7; 13].

8 июня 2016 года Государственной Думой был принят Федеральный закон №180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах», целью которого является обеспечение безопасного для пациентов применения новых высокоэффективных лечебных технологий [10]. К сожалению, в самом тексте Закона ничего не сказано про технологию получения клеточных линий и способы применения биомедицинских клеточных продуктов, в том числе, их использование в клеточной терапии.

На сегодняшний день большинство лабораторий либо используют готовые образцы из Коллекций культур клеток и других лабораторий, либо в каждой лаборатории разработаны свои протоколы по выделению и ведению клеточных линий, которые опираются на классические методики с модификациями в зависимости от конкретных целей исследования. Полный цикл работ (выделение, культивирование и хранение клеток), проводимый в одной лаборатории, является гарантом получения достаточного количества материала высокого качества для фундаментальных исследований и для клинического использования в регенеративной медицине. Культуры клеток, полученные из других лабораторий, несут высокий риск, поскольку они могут быть заражены как исходно, так и при транспортировке [11].

В связи с этим целью нашей работы является определение оптимальных параметров получения и культивирования клеток кожи человека – фибробла-

стов и меланоцитов, выделенных из топографически разных участков тела, для стандартизации протоколов по получению устойчивых линий клеток путем анализа различных методик культивирования, отраженных в отечественной и зарубежной литературе, для последующего изучения их реакции на внешние воздействия, в частности ультрафиолетового облучения.

Материалы и методы. Материалом для культивирования клеток служили кожные лоскуты различных топографических участков тела доноров (живот, веки, грудь, лицо) в возрасте от 38 до 63 лет после проведения реконструктивной и пластической хирургии в Многопрофильной больнице «ВМ-клиник» города Ульяновска. Кожные лоскуты после операции погружались в заранее приготовленную транспортную среду (ТС), состоящую из RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), амфотерицин 0,02% (Синтез, Россия) и 0,01% гентамицин (ПанЭко, Россия), и доставлялись в лабораторию клеточных технологий Научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова». Через 2 или 24 часа (в зависимости от протокола) ткань извлекали из ТС и проводили стандартные этапы механической и ферментативной дезагрегации. Все манипуляции с биоптатом и клеточным материалом проводились в асептических условиях ламинарного бокса MSC Advantage (Thermo Scientific, США) и боксированном помещении класса чистоты В. Полученный материал помещали в 0,25% раствор трипсина (ПанЭКО, Россия) или коллагеназы (ПанЭКО, Россия) при температуре 37°C в инкубатор СВ-53 (Binder, Германия) с содержанием CO₂ 5%. Центрифугирование суспензии клеток проводили на центрифуге ЕВА 200 (Hettich, Германия) при 1300 об/мин 5 минут. В качестве полных питательных сред были использованы RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (ПанЭко, Россия), или MGM (Cell, США), содержащей 5% ЭТС. Культивирование осуществляли во флаконах объемом 25 см² (ТТР, Швейцария). Для получения цитологических препаратов культивирование проводили в чашках Петри с размещенными в них покровными

ми стеклами (БиоВитрум, Россия). Подсчёт количества клеток осуществляли с использованием счетчика клеток Bio-Rad TC20 (Bio-Rad, Сингапур) и красителя трипановый синий этого же производителя. Замена среды проводилась каждые 2–5 дней. Формирования монослоя контролировали визуально на инвертированном микроскопе «Axio Vert. A1» (Zeiss, Германия).

Оценку эффективности протокола выделения и культивирования клеток кожи проводили относительно количества выделенных клеток, сроков образования монослоя, жизнеспособности и морфологии клеток в культуре.

В качестве базового протокола работы с клеточным материалом, включая протокол снятия клеток с культуральных флаконов, была использована методика, опубликованная Фрешни (Freshney) [11]. Основные этапы и модификации параметров каждого этапа включены в Таблицу 1.

Таблица 1

<i>Параметры</i>	<i>Вариации</i>
Период работы с биоптатом с момента забора материала до введения его в работу	2 часа
	24 часа
Механическая дезагрегация биоптата	Мелкая дезагрегация (3x3мм)
	Крупная дезагрегация (продольные полоски шириной 3–4мм)
	Без механической дезагрегации
	Удаление области среза биоптата
Ферментативная дезагрегация биоптата	Коллагеназа
	Трипсин (0,25%)
	Без ферментативной дезагрегации
Состав полной среды	RPMI-1640 (+20% ЭТС+АБ+АМ)
	MGM (+5% ЭТС+АБ+АМ)

Результаты и их обсуждение. Одним из важных параметров в протоколе работы с первичной культурой клеток является период времени от получения биоптата до начала работы с ним, который не должен превышать 24 часа [11].

В рамках нашего эксперимента было сформировано 2 подгруппы: в первой подгруппе послеоперационный материал находился в ТС в течение 2 часов; во второй подгруппе – материал находился в ТС 24 часа с момента окончания

биопсии до начала работы с ним. Сравнение протоколов с разным временем начала работы относительно количества жизнеспособных клеток и скорости формирования монослоя не выявило существенных различий. По литературным данным клетки кожи в образцах биоптата при условии хранения при 24⁰С выживают в течение как минимум 24 часов (или даже 3–4 дней) [11]. Анализ опубликованных работ с первичными культурами клеток показал, что авторы не всегда предоставляют данные о времени начала работы с биоптатом.

Образец биоптата забирали с соблюдением условий асептики в стерильной ТС, содержащей антибиотики, согласно рекомендациям Фрешни и ряду других работ [11; 19]. Контроль биологической безопасности культур клеток осуществлялся с клетками каждого пассажа и во время каждой смены среды даже в отсутствии видимых причин контаминации. По поводу использования антибиотиков и антимикотиков нет единого мнения, но предполагается, что они могут повлиять на результат работы [11]. Известно, что некоторые антибиотики, в частности амфотерицин В, являются токсичными, и их использование рекомендуется только при работе с первичной культурой [21]. По нашему опыту использование антимикотиков в составе полной питательной среды угнетает способность клеток к формированию фокальной адгезии с поверхностью культуральных флаконов и, как следствие, снижает скорость роста клеток. Для транспортировки биоптата также используют 0,9% раствор NaCl, раствор Хэнкса, Эрла и др. [11]. Тогда как наш опыт и анализ литературы указывает на то, что послеоперационный образец кожи до этапа выделения клеток должен находиться в полноценной ТС, в состав которой входят необходимые компоненты для поддержания функционирования клеток, а также антибиотики, предупреждающие обсемененность забранного операционного материала.

После получения материала проводили стандартные этапы выделения клеток из ткани. Успешное выделение клеток во многом зависит от способа разрушения внеклеточного матрикса, который состоит из соединительной ткани, гликопротеинов и специфических тканевых белков [16]. Дополнительные

сложности при выделении клеток включают в себя наличие в образцах послеоперационного материала клеточного дебриса и большого количества нежизнеспособных клеток в области резекции биоптата, которые влияют на пролиферативную активность клеток первичной культуры [25]. Существует несколько методов дезагрегации ткани для получения первичной культуры, однако не все они признаны перспективными в современном мире. Для каждого вида ткани требуется разработка оптимизированных методик для воспроизводимой генерации первичных клеточных линий. В настоящее время для дезагрегации образцов ткани используют такие методы как механическая, химическая и ферментативная дезагрегация, которые используются отдельно или в сочетании друг с другом.

Мы использовали разные варианты: механическую дезагрегацию до размера кусочков 3 x 3 мм, продольными полосками шириной 3–4 мм, удаление только места среза биоптата, где, по мнению Фрешни, могут быть погибшие клетки, присутствие которых плохо сказывается на пролонгации культивирования клеток. Кроме того, нами апробирован протокол выделения клеток из биоптата кожи без ферментативной дезагрегации. Метод разрезания образца кожи на полоски толщиной 3–4 мм также описан в работе Лью (Liu) [26]. После этапа дезагрегации образец отмывали от клеток крови в нескольких сменах стерильных растворов, а затем помещали в растворы ферментов (если это требуется по протоколу).

Существует большое количество вариантов получения клеток из биоптата, в частности Озерская и Щеголев (2008 г.), описывают способ выделения клеток путем нарезания образца кожи на несколько кусочков и распределения их по поверхности чашки Петри в каплях ростовой среды без ферментативной обработки [6]. Фернандес (Fernandes) с сотрудниками показали, что метод эксплантации не позволил выделить фибробласты из биоптата кожи паховой области человека [19]. Согласно нашим данным по количеству выделенных клеток с точки зрения способа механической дезагрегации ткани наилучшие показатели

общего выхода клеток были в протоколе с механической дезагрегацией до размера 3 x 3мм (максимум 6.9×10^5 клеток из биоптата кожи живота), чем в протоколе с нарезкой биоптата продольными полосками (2.1×10^4 клеток из биоптата кожи лица). Формирование монослоя в протоколе с мелкой гомогенизацией клеток также шло быстрее, чем без использования этой техники (рис. 1). Полученные первичные культуры клеток на 14 день культивирования представляли собой сокультуры двух цитотипов кожи: меланоцитов и фибробластов. Гетерогенность морфологии клеток описывалась следующими характеристиками, в частности клетки фибробластического дифферона представлены клетками веретеновидной формы, количество отростков варьировало от 2 до 5. Клетки меланоцитарного ряда веретеновидные с вытянутыми отростками и гранулами в цитоплазме.

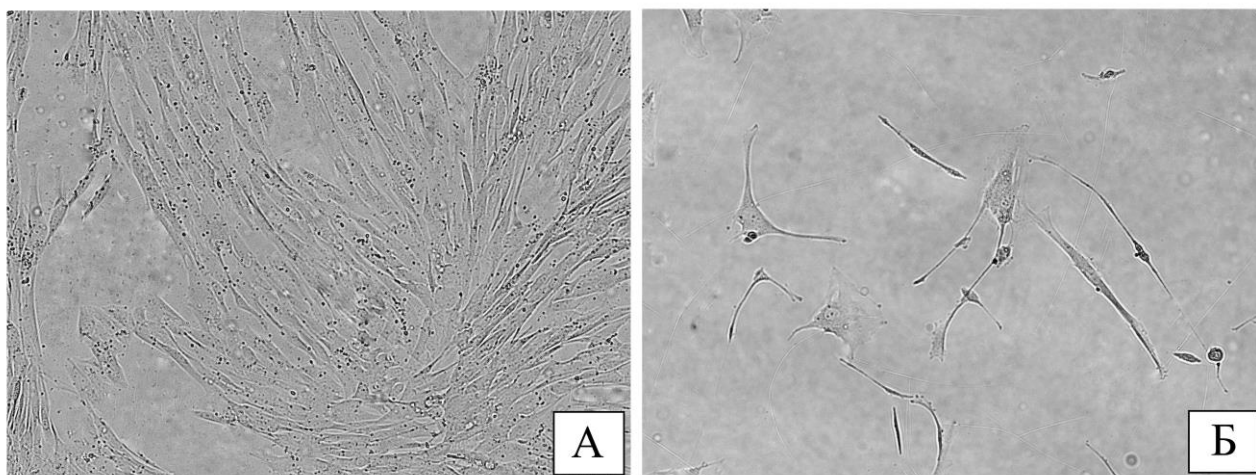


Рис. 1. Первичная культура клеток на 14 сутки культивирования, полученная из биоптата кожи живота с мелкой дезагрегацией (А) и из биоптата кожи лица с крупной дезагрегацией (Б). Увеличение ок 10хоб 20.

Механический способ дезагрегации клеток является неоднозначным методом с точки зрения его эффективности. Известно, что при механическом измельчении ткани повреждаются ядра клеток и «выпавшая» ДНК под воздействием трипсина «расплетается» и увеличивает вязкость раствора с клетками, что не дает в последующем выделить отдельные клетки фильтрованием через

сито. Поэтому иногда добавляют ДНКазу, которая разрезает эти нити и снижает вязкость раствора [25]. Кроме того, предполагается, что при механической дезагрегации клеток образуется большое количество мертвых клеток, а выделяющиеся из них ферменты деградации оказывают токсическое действие на окружающие клетки [18]. С другой стороны, показано, что механический способ является более щадящим по сравнению с ферментативным с точки зрения сохранения экспрессии поверхностных маркеров [20].

Основными ферментами, используемыми для обработки клеток, являются ферменты желудочно-кишечного тракта: трипсин, эластаза, проназа, коллагеназа. Коллагеназа является одним из наиболее часто используемых ферментов для тканей богатых коллагеновыми фибриллами. Шевченко (Shevchenko) с сотрудниками описали протокол выделения клеток из образцов подкожно-жировой клетчатки с помощью коллагеназы, который адаптирован для выделения адипоцитов [28]. Для выделения фибробластов и их дальнейшего практического применения также используется коллагеназа [9]. Существует методика по выделению меланоцитов из ткани с помощью совместного использования коллагеназы и диспазы [27]. В нашей работе использование коллагеназы для работы с образцом кожи живота, включающим кроме эпидермиса и дермы толстый слой гиподермы, не позволил получить большого количества живых клеток на выходе (6×10^4 клеток в мл). Возможно, это связано с с большим слоем подкожной жировой клетчатки (гиподермы) в области живота, и данный протокол требует использования специальных фильтров. Большое количество клеток гиподермы (липоциты) затруднило как гомогенизацию биоптата, так и получение однородной клеточной взвеси на этапе обработки ткани протеолитическими ферментами. В нашей работе в результате использования протокола с применением коллагеназы в качестве протеолитического фермента формирование монослоя наблюдалось только на 28 день культивирования (рис. 2).

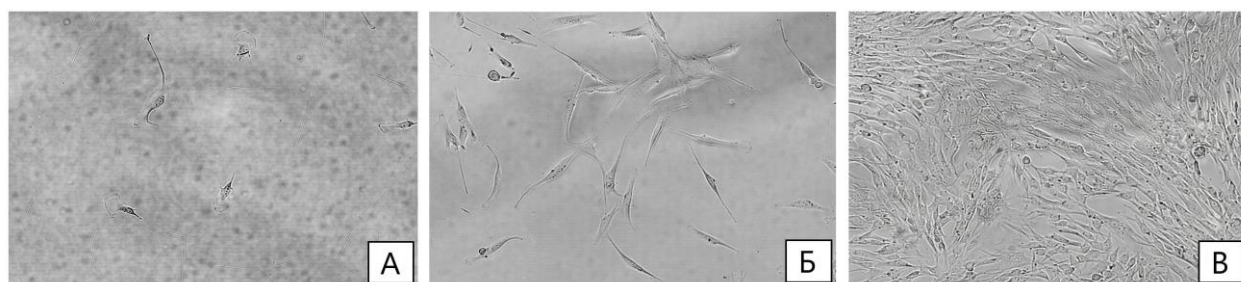


Рис. 2. Первичная культура клеток, полученная из биоптата кожи живота на 10 (А), 18 (Б) и 28 (В) сутки культивирования. Увеличение: ок 10 х об 20.

Совместное использование механической и ферментативной дезагрегации включено в классический протокол работы с клетками по Фрешни, поскольку считается, что данная методика увеличивает количество выделенных клеток. Использование только механического способа дезагрегации приемлемо, когда количество жизнеспособных клеток на выходе не является существенным [11].

Еще одним из самых часто используемых ферментов для дезагрегации образцов ткани является трипсин. Согласно методическим рекомендациям Фрешни возможно использование теплого ($+37^{\circ}\text{C}$) и холодного ($+4^{\circ}\text{C}$) трипсина [11]. По нашим наблюдениям использование холодного трипсина позволяет получить более высокий выход жизнеспособных клеток. Для оптимизации протокола на этапе ферментативной обработки мы помещали гомогенизат в холодный раствор трипсина 0,25% на 30 мин, 1 ч 30 мин и 24 часа. Наиболее высокий выход клеток отмечался в протоколе с обработкой трипсином в течении 1 ч 30 мин, что согласуется с данными литературы [26].

Экспериментальные исследования, проведенные Чен (Chen) с сотрудниками, с изменением классического протокола культивирования путем увеличения времени обработки раствором трипсина 0,25% до 2 часов, выявили изменение морфогенетических характеристик меланоцитов [17]. Меланоциты контрольной группы, выделенные с использованием протокола без обработки трипсином, имели характеристики зрелых клеток, большинство из которых имели множественные отростки, многие из которых были многополярными. При увеличении

времени обработки трипсином до 2 часов меланоциты человека приобретают веретенообразную форму, уменьшаются в размерах, некоторые имели только 1–2 дендрита, что характерно для незрелых меланоцитов. Анализ жизнеспособности показал, что сохранность меланоцитов после обработки трипсином в течение 2 часов не отличалась от контрольной группы и составила около 80%, однако показатели пролиферативной активности были снижены в сравнении с контрольной клеточной линией. Кроме того, при увеличении времени обработки трипсином наблюдалась активация гибели меланоцитов по пути аутофагии. Эти результаты показали, что обработка трипсином в течение 2 часов вызывает дедифференцировку зрелых эпидермальных меланоцитов *in vitro*. Возможно, это связано с адаптивной реакцией меланоцитов в ответ на воздействие внешнего фактора. В связи с этим очевидно, что время воздействия ферментативными агентами является важным фактором при оптимизации протоколов работы с культурами клеток.

Для разных типов клеток необходимы свои особенности культивирования, в частности культуральные среды с оптимальным составом питательных добавок. Ранее в наших исследованиях показано, что оптимальной средой для культивирования клеточных линий меланоцитов является среда Melanocytes Growth Medium (MGM) с содержанием ЭТС 20%; жизнеспособность меланоцитов составляет 94% [1]. По литературным данным для успешного культивирования клеток кожи содержание сыворотки также может составлять 5% и 12% [8; 9; 23]. Обогащение среды питательными веществами возможно не только путем добавления сыворотки, но и других активаторов. Лью (Liu) с сотрудниками в 2020 году разработали метод по выделению меланоцитов с использованием Y-27632, ингибитора Rho-киназы, в ростовую среду TEVA [26]. Авторы представили данные с высокими показателями количества и жизнеспособности меланоцитов, выделенных из образца кожи, с использованием этого протокола. В своей работе мы использовали среды RPMI-1640, обогащенные ЭТС 20%, и Melanocytes Growth Medium (MGM) с содержанием ЭТС 5%. Известно, что вы-

сокий уровень пролиферации клеток поддерживается при минимальном добавлении сыворотки [12]. В результате использования в нашей работе протокола с применением среды MGM с содержанием ЭТС 5% формирование монослоя наблюдалось уже через 16 суток культивирования, что свидетельствует о хорошем приросте клеточной массы за счет повышенной пролиферативной активности клеток (рис. 3).

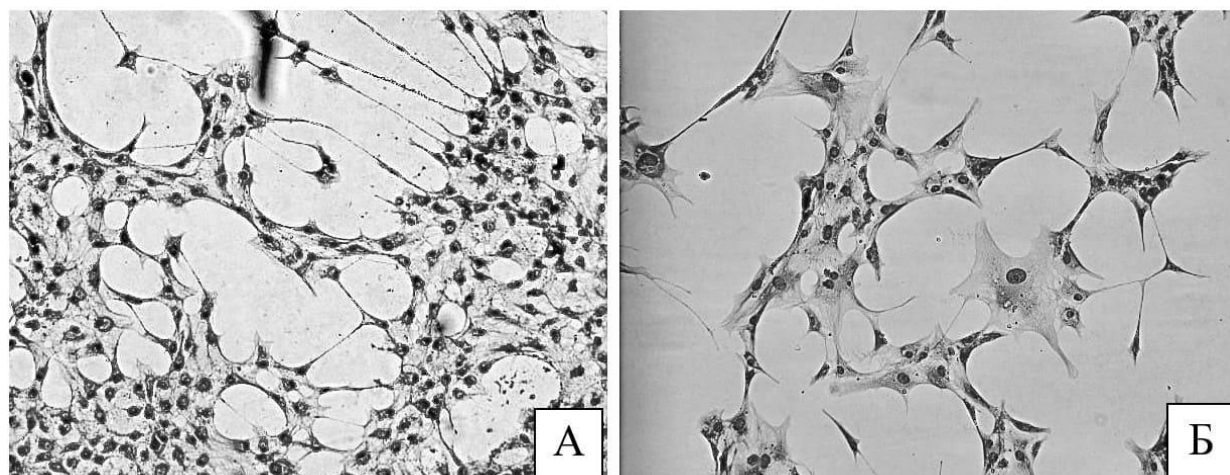


Рис. 3. Культура клеток, полученная из биоптата кожи век на 16 сутки культивирования (Первый пассаж). Окраска – гематоксилин-эозин.

Увеличение А – ок. 10 х об. 20; Б – ок. 10 х об. 40

Одним из факторов, который является предметом для обсуждения целого ряда работ является возраст доноров исследуемой ткани. В нашей работе возраст доноров, от которых после косметических вмешательств получены образцы кожи топографически разных участков тела составлял от 38 до 63 лет. Нами отмечаются особенности в приросте клеток от пассажа к пассажу, которые отражаются на сроке формирования монослоя, что согласуется с данными литературы [5]. Крылова с сотрудниками (2016) провели сравнительный анализ ростовых характеристик и дифференцировочного потенциала неиммortalизованных клеточных линий человека из кожи век трех взрослых доноров в возрасте 37, 45 и 53 года [5]. Выявленные различия по ростовым характеристикам авторы связывают не с возрастом, а с генетическими особенностями доноров. Анализ по-

верхностных маркеров, характерных для мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека, выявил их экспрессию во всех исследованных культурах. Наличие экспрессии маркера недифференцированных эмбриональных стволовых клеток – SSEA-4 – и маркеров их ранней дифференцировки обеспечивает широкие возможности использования этих клеток в регенеративной медицине. Молекулярно-генетические характеристики культивируемых клеток являются важным этапом не только с точки зрения фундаментальных исследований биологии клеток, но и в аспекте адекватности использования данного протокола культивирования для дальнейшего применения этих клеток в регенеративной медицине.

Таким образом, полученные нами данные по культивированию клеток кожи различных топографических участков с использованием различных протоколов выделения и культивирования позволили оптимизировать параметры для планирования более развернутых исследований с целью получения большего числа жизнеспособных клеток и их дальнейшую сохранность в процессе ведения культуры как объекта для моделирования воздействия УФ-облучения в различном режиме. Перспективным направлением исследования полученных культур клеток кожи является анализ их морфогенетических изменений в аспекте изучения онкогенеза меланомы.

Список литературы

1. Антонова Е.И. Клеточные линии меланоцитов и их биология при меланоме / Е.И. Антонова, С.А. Бармина, Е.С. Волкова, О.М. Костина // Научное обозрение. Педагогические науки. – 2019. – №5 (2). – С. 15–18.

2. Джусоева, Е.В. Изучение функциональной активности меланоцитов, культивированных *in vitro* в 2D и 3D условиях: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.03.03. – М., 2020. – 27 с.

3. Доклад Министра здравоохранения Скворцовой В.И. на заседании Коллегии Минздрава РФ «Об итогах работы Министерства в 2014 и задачах на 2015 год [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/>

news/2015/04/15/2300-ministr-veronika-skvortsova-vystupila-na-kollegiiminzdravarossiiobitogah-raboty-ministerstva-v-2014-godu-i-zadachah-na-2015-god

4. Колокольцова Т.Д. Современные способы выделения и культивирования клеток человека и животных: учебное пособие / Т.Д. Колокольцова, И.Н. Сабурина, А.А. Кубатиев. – М., 2016. – 50 с.

5. Крылова, Т.А. Получение и характеристика неиммортизированных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста / Т.А. Крылова, А.С. Мусорина, В.В. Зенин, [и др.] // Цитология. – 2016. – Т. 58. №11. – С. 850–864.

6. Озерская О.С. Экспериментальные подходы к обоснованию применения клеточных композиций на основе фибробластов в дерматокосметологии / О.С. Озерская, В.В. Щеголев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3. №2. – С. 66–67.

7. Пинаев Г.П. Клеточная биотехнология: учебно-метод. пособ. / Г.П. Пинаев, М.И. Блинова, Н.С. Николаенко [и др.]. – СПб., 2011. – 209 с.

8. Фадеев Ф.А. Адгезия фибробластов кожи человека на модифицированном для применения в имплантологии титане с анодированным нанотрубчатый покрытием / Ф.А. Фадеев, Ю.Я. Хрунык, С.В. Беликов [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2019. – Т. 486. №1. – С. 123–126.

9. Фадеев Ф.А. Разработка и оптимизация технологии автоматизированного культивирования клеточных линий для терапевтического применения / Ф.А. Фадеев, А.В. Сулимов, А.В. Штукатуров [и др.] // Сборник научных работ. Клеточные технологии – практическому здравоохранению / под общ. ред. проф. Леонтьева С.Л. – Екатеринбург: Вестник Уральской медицинской академической науки – 2016. – С. 68–73.

10. Федеральный закон «О биомедицинских клеточных продуктах» от 23 июня 2016 г. №180-ФЗ (с изменениями и дополнениями от 3 августа 2018 г., 27 декабря 2019 г.).

11. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
12. Черкасова Е.И. Работа с культурами клеток: учебно-метод. пособ. / Е.И. Черкасова, А.А. Брилкина. – Н. Новгород, 2015. – 57 с.
13. Banakh I. A comparative study of engineered dermal templates for skin wound repair in a mouse model / I. Banakh, P. Cheshire, M. Rahman [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – 21 (12). – P. 2–15.
14. Bertolotti A. Assessment of non-cultured autologous epidermal cell grafting resuspended in hyaluronic acid for repigmenting vitiligo and piebaldism lesions: a randomized clinical trial / A. Bertolotti, G. Leone, A. Taïeb [et al.] // *Acta Derm Venereol.* – 2021. – 101 (7). – P. 1–7.
15. Carvalhães J.L. The effect of aging in primary human dermal fibroblasts / J.C. Lago, M.B. Puzzi // *PLoS One.* – 2019. – 14 (7). – P. 1–14.
16. Castell J.V. Liver cell culture techniques / J.V. Castell, M.J. Gomes-Lechon // *Hepatocyte transplantation.* – 2009. – P. 35–46.
17. Chen R. Dedifferentiation of human epidermal melanocytes in vitro by long-term trypsinization / R. Chen, L. Xiao, R.Z. Zhang [et al.] // *Cell Tissue Bank.* – 2021. – 22 (1). – P. 67–75.
18. Cunningham D.E. Blocking resolution. How external states can prolong civil wars // *J. Peace Res.* – 2010. – V. 47. №2. – P. 115–127.
19. Fernandes I.R. Fibroblast sources: Where can we get them? / I.R. Fernandes, F.B. Russo, G.C. Pignatari [et al.] // *Cytotechnology.* – 2016. – 68(2). – P. 223–228.
20. Francesco F.D. Non-Enzymatic Method to obtain a fat tissue derivate highly enriched in adipose stem cells (ASCs) from human lipoaspirates: preliminary results / F.D. Francesco, S. Mannucci, G. Conti [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. №7. – P. 2061.
21. Freshney R. Cell line provenance // *Cytotechnology.* – 2002. – 39. – P. 55–67.

22. Fusenig N. Culture of keratinocytes on collagen gels and use of transplantation chambers for grafting onto mouse skin. In: «Keratinocyte methods» ed by Leigh I.M. and Watt F.M // Cambridge University Press. – 1994. – P. 57–61.

23. Herlyn M. Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression / M. Herlyn, J. Thurin, G. Balaban [et al.] // Cancer Research. – 1985. – 45. – P. 5670–5676.

24. Hirata E. Tumor Microenvironment and differential responses to therapy / E. Hirata, E. Sahai // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2017. – 7 (7). – P. 1–14.

25. Janik K. Efficient and simple approach to in vitro culture of primary epithelial cancer cells / K. Janik, M. Popeda, J. Peciak [et al.] // Biosci. Rep. – 2016. – 36 (6).

26. Liu C. Y-27632 enriches the yield of human melanocytes from adult skin tissues / C. Liu, S. Wang, M. Liu [et al.] // Biology. – 2020. – P. 1–5.

27. McNeal A. BRAFV600E induces reversible mitotic arrest in human melanocytes via microRNA-mediated suppression of AURKB Cancer Biology / A. McNeal, R.L. Belote, H. Zeng [et al.] // Genetics and Genomics. – 2021. – C. 1–20.

28. Shevchenko E.K. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle / E.K. Shevchenko, P. Makarevich, Z. Tsokolaeva [et al.] // Journal of Translational Medicine. – 2013. – 11 (138). – P. 1–18.