

**Л. Ю. Прохоров**

**ВОЗМОЖНО ЛИ  
ПРЕОДОЛЕТЬ  
СТАРЕНИЕ?**

*Сегодня и завтра  
клеточной терапии*



---

МОСКВА — 2017

УДК 576  
ББК 28.703  
П84

Р е ц е н з е н т ы:

*Виталий Иванович Донцов*, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник  
Федерального информационного центра «Информатика и управление», лаборатории  
«Системный анализ и информационные технологии в медицине и экологии» РАН;

*Александр Александрович Згурский*, кандидат биологических наук,  
генеральный директор ООО «Медбиокор»

**Прохоров, Леонид Юрьевич.**

**Возможно ли преодолеть старение?** Сегодня и завтра клеточной терапии / Леонид Прохоров. – Москва : МАКС Пресс, 2017. – 88 с. : илл. [16 с. вкл.]

ISBN 978-5-317-05624-7

В книге описываются методы современной клеточной биологии, которые могут применяться для омоложения кожи человека с использованием его собственных клеток. Кратко рассматриваются внешние проявления старения, характеристика кожи человека и причины ее старения, методика получения и культивирования аутогенных (собственных) фибробластов кожи, процедура клеточной терапии, результаты применения аутогенных фибробластов. Показана необходимость долговременного хранения клеток в замороженном виде при низкой температуре (-196°С) в жидком азоте. Предполагается, что в дальнейшем клеточная терапия сможет применяться не только для омоложения кожи, но и для восстановления старых или больных органов человека, что позволит существенно увеличить продолжительность его жизни.

Также рассматриваются некоторые усовершенствования клеточной технологии, которые при реализации помогут существенно улучшить омоложение кожного покрова человека, а также других тканей и органов.

*Ключевые слова:* продолжительность жизни, омоложение, клеточная терапия, искусственные органы, теломеразы, гены теломераз, старые клетки, молодые клетки.

УДК 576  
ББК 28.703

В оформлении обложки использованы фотографии с сайта [www.radio-serov.ru](http://www.radio-serov.ru).  
Коллаж автора.

ISBN 978-5-317-05624-7

© Прохоров Л.Ю., 2017  
© Оформление. ООО «МАКС Пресс», 2017

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ВНЕШНИЕ И ВНУТРЕННИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА	7
ХАРАКТЕРИСТИКА КОЖИ ЧЕЛОВЕКА И ПРИЧИНЫ ЕЕ СТАРЕНИЯ	11
МЕТОДЫ ОМОЛОЖЕНИЯ КОЖИ	13
Методика получения и культивирования аутогенных фибробластов кожи	16
Процедура клеточной терапии	18
Результаты применения аутогенных фибробластов	19
КРИОХРАНИЛИЩЕ	22
ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ	24
Замедление старения (потенциальное увеличение средней и максимальной продолжительности жизни в 1,5–2 раза)	26
Радикальное решение проблемы старения (потенциальное увеличение средней и максимальной продолжительности жизни более чем в 1,5–2 раза)	31
Радикальное увеличение продолжительности жизни путем замены клеток	35
Радикальное увеличение продолжительности жизни путем замены органов на искусственные	39
СОПОСТАВЛЕНИЕ СПОСОБОВ ЗАМЕЩЕНИЯ СТАРЫХ КЛЕТОК НА МОЛОДЫЕ В ОРГАНИЗМЕ И В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК, РАСТУЩЕЙ БЕЗ КЛАССИЧЕСКОГО ПЕРЕСЕВА	41

О ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ВОЗМОЖНОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПИГМЕНТАЦИИ ВОЛОС В НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ПОСЕДЕНИЯ	58
ОБЩАЯ ТЕОРИЯ ОМОЛОЖЕНИЯ ОРГАНИЗМА	68
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	73
ЛИТЕРАТУРА	76
БЛАГОДАРНОСТИ	83
СПИСОК ТЕРМИНОВ	83
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	87

## ВВЕДЕНИЕ

Одна из основных актуальных проблем человечества – это старость и связанные с ней проблемы: старческие болезни, ухудшение внешнего вида, атеросклероз, слабоумие, канцерогенез, ишемическая болезнь, инфаркт миокарда и т.д. Что же делать? Ответ очень прост: надо всегда оставаться молодым, периодически делать омоложение стареющего организма и тогда не будет тех проблем, которые перечислены выше. Для большинства людей это фантастика, однако, уже сейчас есть методы, которые позволяют омолаживать кожу. На очереди омоложение других тканей и органов. Установлено, что число живых, работающих и способных к делению клеток с возрастом постоянно уменьшается (Стреллер, 1964). Отмершие клетки замещаются соединительной тканью. Соединительная ткань играет большую роль в процессе старения организма. В некоторых стареющих органах умершие специализированные клетки замещаются на клетки соединительной ткани, неспособные выполнять функции данного органа. Например, кардиомиоциты (мышечные клетки сердца) при их гибели в результате инфаркта могут замещаться фибробластами, образуя рубец, который лишен способности сокращаться.

Следовательно, важно заменять старые или погибшие клетки на молодые, полноценно функционирующие.

Другая задача – это устранение старой соединительной ткани и замена ее на молодую. Применение того и другого метода в комплексе может дать максимальный эффект.

Частная задача, которая уже решается сегодня – омоложение кожи. Для омоложения кожи, устранения морщин, рубцов после операций, угрей в настоящее время уже разработаны методы, которые дают однозначно положительный результат. Об этом и некоторых других темах, связанных с омоложением тканей и органов человека, будет идти речь в данной публикации.

## **ВНЕШНИЕ И ВНУТРЕННИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА**

С возрастом изменяются **общие размеры, форма и состав тела, мягкие части лица и кожный покров, изменяется костная система.**

► **Изменение кожи** начинается обычно после 40 лет, особенно это заметно на структуре верхнего (эпидермального) слоя, который **утончается и уплощается**. К 80 годам его толщина на 25% меньше, чем в 30 лет. Сглаживается рельеф кожного рисунка на ладонях, подошвах и пальцах рук и ног. Изменения затрагивают сосочковый слой собственно кожи (дермы), который также становится более тонким. Постепенно атрофируется подкожная **жировая клетчатка**, которая у долгожителей со временем **может исчезнуть совсем**. На коже появляются коричневые пигментные пятна, что характерно для тыльной стороны кистей, плеч, груди и т.д. (Хрисанфова, 1999).

По другим данным, видимое старение кожи проявляется уже с 25-летнего возраста, когда начинает истончаться подкожная жировая ткань, снижается эластичность коллагеновых структур (Руководство по геронтологии, 2005).

Из-за уменьшения числа потовых и сальных желез **кожа становится более сухой, утрачивается ее эластичность**. У мужчин понижение салоотделения происходит позже, чем у женщин. Наиболее наглядными признаками старения являются морщины. С возрастом появляются множественные морщины на коже, особенно на открытых участках, таких как лицо, например, так называемые «гусиные лапки» у наружного угла глаза. На рис.1 приведена фотография пожилой европейской

женщины, а на рис.2, для сравнения, - фотография молодой женщины. Лицо стареет быстрее, чем другие части тела (Хрисанфова, 1999). Объясняется это тем, что лицо больше подвержено атмосферным воздействиям,



Рис.1. Морщины в области глаз у пожилой европейской женщины (Фото из кн.: Хрисанфова, 1999).



Рис. 2. Вид кожи практически без морщин в области глаз у молодой европейской женщины (Фото из кн.: Хрисанфова, 1999).



в том числе солнечному свету, по сравнению с другими частями тела. Старение под воздействием солнечного света принято называть фотостарением, так как солнечный свет ускоряет старение кожи. Особенно влияет на этот процесс ультрафиолетовое излучение, входящее в состав солнечного спектра (Молочков и др., 2005). Ускоряет старение кожи также воздействие ветра, пыли, сухости, действие микроорганизмов, компоненты моющих средств и т.д.

**Температура кожи снижается**, особенно у долгожителей. Это объясняется общим понижением обменных процессов, но отчасти связано и с ухудшением кровоснабжения и изменениями в потовых железах. Из-за уменьшения их числа ослабляется выделительная функция кожи (Хрисанфова, 1999).

► Значительные изменения претерпевает и **волосной покров**. Начиная уже с 30 лет, уменьшается количество волос на коже (точнее их плотность – число волос на единице поверхности), они седеют, то есть перестают окрашиваться пигментом. Одной из причин поседения считается то, что клетки волосяных луковиц (меланоциты) теряют способность образовывать красящий пигмент. Однако, предполагается, что возможна еще и другая причина – нарушение процесса переноса пигмента от меланоцитов к растущему волосу (Прохоров, 2015б). Хотя рост волос снижается, у пожилых женщин нередко появляются волосы на лице (на верхней губе и на подбородке). В то же время волосы на теле, на конечностях и в области бровей после 60 лет могут исчезать.

► Ухудшается костная система, увеличивается **кривизна позвоночника**; уплощаются межпозвонковые диски и хрящ суставных поверхностей костей.

Постоянным признаком старения в возрасте старше 45–50 лет является **разрежение костной ткани — остеопороз**.

▶ С возрастом **изменяются общие размеры, форма и состав тела, мягкие части лица**.

▶ Уменьшается **рост** человека. По некоторым данным, после 60 лет рост мужчин и женщин уменьшается в среднем на 0,5–1 см за пятилетие. Это происходит из-за уплощения межпозвонковых дисков и увеличения сутулости.

▶ Изменяется соотношение компонентов тела – **мышечного и жирового**. Количество **мышечной ткани** максимально в 20–30 лет, затем начинается вначале слабое, а затем нарастающее ее снижение, особенно после 50 лет. В связи с этим происходит и снижение **мышечной силы**, примерно к 70–80 годам силовые показатели уменьшаются приблизительно в два раза. Уменьшается подкожный жировой слой и увеличивается объем внутреннего жира в брюшной области.

▶ **Старение нервной системы** проявляется многообразно. Это касается как центральной нервной системы (мозга), так и периферической нервной системы. Старение проявляется в функциональных и психологических изменениях, отражающихся на умственной и физической работоспособности, памяти, эмоциях, сложных поведенческих реакциях и других сторонах жизнедеятельности. Структурно старение выражается, прежде всего, в уменьшении количества нервных клеток — нейронов. Хотя некоторое снижение может происходить уже вскоре после рождения, заметная их потеря отмечается довольно поздно, начиная с 50–60 лет, и происходит неравномерно в разных зонах головного мозга. Утрата нейронов в коре головного мозга старых людей может достигать 40–50% и более. В старости снижаются плотность расположения и размеры нейронов,

в них откладывается пигмент. Возрастные явления отмечаются также в **спинном мозге и периферической нервной системе**, наблюдаются они и во всех звеньях **вегетативной нервной системы** (Хрисанфова, 1999).

► При старении ухудшаются состояние и функции других систем, тканей и органов организма, в том числе органы чувств, сердечнососудистая, вегетативная и иммунная системы, пищеварительные органы, органы эндокринной системы и др. (Руководство по геронтологии, 2005).

Сейчас уже можно однозначно утверждать, что старческие изменения не могут быть полностью устранены диетами, настоями трав, лекарствами, витаминами или препаратами, физическими упражнениями и тому подобным.

Как же можно остановить старение? В следующих разделах будет описано, что первый шаг уже сделан и это — клеточная терапия кожного покрова собственными клетками. Следующие шаги будут направлены на совершенствование такой методики и на распространение ее на другие ткани, системы и органы человека.

## **ХАРАКТЕРИСТИКА КОЖИ ЧЕЛОВЕКА И ПРИЧИНЫ ЕЕ СТАРЕНИЯ**

Основными клеточными элементами соединительной ткани являются фибробласты. Фибробласты – это клетки мезенхимального происхождения, круглой или удлиненной, веретенообразной плоской формы с отростками и овальным ядром (Рис. 3, цветная вкладка). Состояние и функция основных внеклеточных компонентов соединительной ткани, коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон и межклеточного матрикса зависят от

функциональной активности фибробластов. В результате дифференцировки фибробласты превращаются в менее активные зрелые клетки – фиброциты.

Фибробласты являются основными клетками среднего соединительнотканного слоя кожи, называемого дермой (Рис. 4, 5, цветная вкладка). Основная функция фибробластов дермального слоя кожи – участие в метаболизме клеточного вещества. Фибробласты кожи синтезируют и выделяют в окружающую среду большое количество биологически активных веществ, среди которых можно выделить различные факторы роста, компоненты внеклеточного матрикса и ферменты. Этот процесс происходит непрерывно, и благодаря ему межклеточное вещество постоянно обновляется. Особенно интенсивно протекает метаболизм гиалуроновой кислоты (Крихели и др., 2004). Как и во всех органах и тканях человеческого организма, в коже происходят возрастные изменения в течение жизни.

В стареющей коже уменьшается толщина дермы, содержание влаги в ней падает, в результате кожа теряет упругость и эластичность. Следствием этого является образование морщин. Старение кожи на различных участках тела протекает неравномерно. Особенно быстро стареют открытые участки кожи. Причина этого, как описывалось выше, – фотостарение (облучение солнечным светом), а также атмосферные воздействия. В то же время на закрытых областях возрастные изменения кожи менее выражены.

Существует мнение, что одной из основных причин старения кожи является снижение способности фибробластов кожи к делению с возрастом. В результате этого процесса количество фибробластов в коже уменьшается, и они становятся менее активны. Следовательно, если каким-либо образом стимулировать

пролиферативную и синтетическую активность фибробластов, то можно улучшить состояние кожи (Крихели и др., 2004).

Кроме того, в коже уменьшается количество коллагеновых волокон и снижается их гидратируемость, они утрачивают способность к разбуханию и становятся ригидными, в результате уменьшается тургор, происходит образование морщин. Одновременно кожа теряет липиды, нарушается ее защитная мантия, она становится легко ранимой, шелушится (Руководство по геронтологии, 2005).

Так как количество и активность фибробластов снижается, оставшиеся не могут компенсировать происходящие старческие изменения кожи. Поэтому, если увеличить число молодых активных клеток – фибробластов в коже, то логично ждать улучшения ее состояния вследствие того, что фибробласты будут вырабатывать молодой коллаген и эластин, а это повысит упругость кожи, ее тургор, в результате чего морщины разгладятся.

## **МЕТОДЫ ОМОЛОЖЕНИЯ КОЖИ**

Для коррекции возрастных изменений кожных покровов в настоящее время используются самые разнообразные методы (пилинги, шлифовка, лифтинг и др.) и препараты (токсин ботулизма, компоненты внеклеточного матрикса и соединительной ткани и т.д.). Многие из этих методов направлены на стимуляцию собственных клеток кожи, в частности, фибробластов. Однако можно решить проблему и другим образом – увеличить количество фибробластов в коже с помощью их пересадки в те места, где это необходимо.

Прежде чем пересадки фибробластов стали реальностью, исследователям пришлось решать много методических вопросов, в том числе вопросы безопасности подобных процедур.

Значительный прогресс в этом направлении был достигнут, когда исследователи научились культивировать, т. е. поддерживать жизнеспособность фибробластов вне организма, или другими словами *in vitro*. В 1961 г. L. Hayflick и P. S. Moorhead (Hayflick, Moorhead, 1961) представили данные о том, что даже в оптимальных условиях культивирования *in vitro* фибробласты эмбриона человека способны делиться только ограниченное число раз ( $50 \pm 10$ ). В последующих исследованиях это наблюдение было многократно воспроизведено. Последняя фаза жизни клеток в культуре была определена как клеточное старение, а сам феномен получил по имени автора название лимита Хейфлика.

После установления лимита Хейфлика в результате многочисленных исследований было выявлено, что нормальные фибробласты в культуре сохраняют диплоидный кариотип и имеют ограниченную продолжительность жизни. Кроме того, у нормальных клеток отсутствуют онкогенные потенции. Эти требования к культурам нормальных клеток были оформлены в виде нормативных документов.

При соблюдении этих требований появилась возможность использования культивируемых вне организма фибробластов человека для производства иммунологических медицинских препаратов, а затем и для терапевтических целей. Научные исследования и клинические разработки в данном направлении протекают очень интенсивно, что связано с общим подъемом клеточных технологий на основе стволовых клеток.

В настоящее время можно выделить два основных подхода к лечению кожи с помощью препаратов, содержащих живые фибробласты. С одной стороны, широкую известность получили методики и препараты для лечения дефектов кожи раневого и ожогового характера с помощью культур аллогенных (другого организма) эмбриональных фибробластов. Альтернативой этим методикам является возможность использования аутогенных (собственных) фибробластов человека для заместительной клеточной терапии кожных покровов (Згурский, 2004).

Считается, что наилучшие результаты клеточной терапии получаются при использовании культур эмбриональных фибробластов, которые имеют больший пролиферативный потенциал по сравнению с культурами от взрослых доноров. Однако применение клеток, полученных из эмбрионов, имеет ряд ограничений, в том числе этического характера. В то же время накапливаются данные, что собственные фибробласты сохраняют свой потенциал при старении, несмотря на уменьшение их числа в стареющем организме (Терехов, 1984).

Для достижения первичных результатов необходимо получить культуры фибробластов от взрослых доноров. Было установлено, что пролиферативные способности полученных фибробластов по сравнению с эмбриональными кожными фибробластами вполне достаточны, чтобы использовать их для клеточной терапии (Згурский, 2004).

## **Методика получения и культивирования аутогенных фибробластов кожи**

Клеточный материал для получения культуры аутогенных фибробластов берут путем биопсии кожи (срез небольшого участка кожи размером примерно 0,5 см<sup>2</sup>) пациента в области предплечья или в заушной области при местной анестезии.

Получение и культивирование фибробластов из биоптата кожи проводят по стандартной методике. Для получения первичной культуры клеток ткань промывают физиологическим раствором, содержащим антибиотики, помещают в стерильную чашку Петри и обрабатывают раствором, содержащим трипсин или коллагеназу (оба ферменты). Под действием раствора ткань размягчается, и из нее на дно чашки выходят живые клетки (фибробласты). Затем в чашку заливают питательную ростовую среду (см. ниже) и помещают в СО<sub>2</sub>-инкубатор (специальный плотно закрывающийся шкаф, в котором поддерживается постоянная температура 37°С и повышенная концентрация (5-7%) углекислого газа в воздухе (Рис. 7, цветная вкладка); обычная концентрация СО<sub>2</sub> в атмосфере 0,03–0,04%, при которой фибробласты расти не могут). Клетки начинают размножаться и после заполнения всей чашки фибробластами их снимают с ростовой поверхности смесью растворов Версена (раствор ЭДТА – этилен диамин тетрауксусной кислоты и неорганических солей) и трипсина. Клетки первичной культуры центрифугируют, отмывают от компонентов раствора и суспендируют в среде культивирования.

Далее клетки переносят в культуральные флаконы (Рис. 6, цветная вкладка), содержащие питательную ростовую среду. Ростовая среда содержит набор



аминокислот, глюкозу и др. питательные вещества для клеток и 10–20% эмбриональной телячьей сыворотки (плазма крови), содержащей необходимые ростовые факторы, обеспечивающие деление клеток. Сами флаконы помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Флаконы закрывают не плотно, а так чтобы воздух с повышенным содержанием углекислого газа из инкубатора мог поступать внутрь флакона. Можно использовать также флаконы с вентилируемыми крышками (с встроенным стерильным фильтром) через которые предусмотрен воздухообмен с воздухом в инкубаторе. Этим способом обеспечиваются условия для роста (деления) клеток.

Все работы проводятся в строго стерильных условиях в ламинарном шкафу (Рис. 8, цветная вкладка), в который вентилятором через стерилизующий воздушный фильтр, расположенный сзади или сверху шкафа, под небольшим давлением нагнетается стерильный (очищенный от бактерий) воздух. За счет избыточного давления внутри ламинарного шкафа внешний воздух с бактериями внутрь не проникает, поэтому культуры клеток остаются стерильными. Работа внутри шкафа осуществляется высококвалифицированным специалистом с использованием стерильной лабораторной посуды, в том числе флаконов, пипеток, чашек Петри и др. Дополнительная стерильность осуществляется за счет обжига поверхностей посуды (горлышка флаконов, рабочих частей пипеток) в пламени спиртовой или газовой горелки, которая установлена внутри ламинарного шкафа и включена постоянно в течение всего времени работы с биологическим материалом. Сам специалист находится вне шкафа, но все действия осуществляет руками в стерильных хирургических перчатках внутри ламинарного шкафа через открытую нишу, из которой постоянно

выходит стерильный воздух, не позволяющий поступать внутрь нестерильному воздуху (с бактериями) извне.

Полученные от пациентов культуры клеток используют для наработки необходимого количества клеток, достаточного для процедур (6–8 пассажей или делений клеток в культуре). Далее фибробласты тестируются на отсутствие контаминации (заражения) ВИЧ, гепатитов А, В и С, микоплазмы и хламидий. Тестирование проводится при помощи ПЦР (полимеразная цепная реакция) и иммуноферментными методами. Отсутствие онкогенных потенциалов клеток определяют на бестимусных (без иммунитета) мышах. Далее монослойные культуры клеток снимают с поверхности флаконов смесью растворов Версена и трипсина и суспендируют (перемешивают) с применением серологических пипеток в стерильном физиологическом растворе для инъекций. Затем 2–3 раза центрифугируют и отмывают клетки от Версена и трипсина в таком же физрастворе. Готовые суспензии сохраняют при +4 °С. Препараты клеток используют в течение 24 часов после получения суспензии.

Жизнеспособность клеток в суспензии определяют с помощью высевания суспензионной культуры через различные сроки инкубации и подсчета количества прикрепившихся клеток, по их способности к образованию колоний.

## **Процедура клеточной терапии**

Процедуру введения клеток пациенту проводят методом туннельных инъекций для крупных морщин или обкалыванием мелких морщин. Количество клеток в препаратах варьирует в зависимости от процедуры, объем

введенного препарата составляет в среднем 1–3 мл. на процедуру. Количество вводимых клеток составляет в среднем от 1 до 10 млн.

Метод введения клеток показан на рис. 9 (Цветная вкладка). Клетки вводятся с помощью инсулинового шприца в дермальный (средний) слой кожи (Згурский, 2004). Игла инсулинового шприца очень тонкая, поэтому процедура вызывает минимально неприятные ощущения.

Поверхность кожи, в которую вводятся клетки, обрабатывается стерилизующими растворами перед выполнением процедур, а все манипуляции исполнитель делает строго в стерильных резиновых перчатках и в марлевой повязке, закрывающей дыхательные органы.

## **Результаты применения аутогенных фибробластов**

По мнению одного из ведущих специалистов в области применения аутогенных фибробластов кандидата биологических наук А.А. Згурского (Згурский, 2004) процедура имеет несколько привлекательных моментов для косметолога и, соответственно, для пациента:

- используются собственные клетки пациента;
- обычно проводится однократное взятие биопсии;
- имеется небольшой дискомфорт в процессе применения процедур для пациента;
- эффект сохраняется длительное время;
- простота применения;
- проводится небольшое число процедур, необходимое для получения эффекта;
- отсутствуют осложнения и побочные эффекты.

Аутогенные фибробласты применяют для коррекции морщин, атрофических рубцов, атрофических участков кожи, нарушений структуры кожи (Boss et. al., 2000).

В результате применения:

- замедляется старение кожи;
- улучшается цвет кожного покрова;
- разглаживаются глубокие и исчезают мелкие морщины;
- повышается упругость и эластичность соединительной ткани кожи;
- имеется значительный эффект при коррекции рубцов и носогубных складок через 7 и 12 мес.

В первые часы после введения клеток наблюдаются местные эффекты в виде гиперемии (местное увеличение притока крови) и небольшого отека, которые исчезают через 2–3 ч. после процедуры. Положительный эффект начинает проявляться через 6–8 ч. после процедуры, что выражается в увеличении тургора (упругости) и эластичности кожи, ее кровоснабжения. Отмечен положительный эффект, заключавшийся в исчезновении мелких и уменьшении крупных морщин (Крихели и др., 2004). Улучшение кожи происходит в течение нескольких месяцев. Сохранение положительного эффекта прослеживается на протяжении 12 мес. Пример применения аутогенных фибробластов для лечения носогубных складок показан на рис. 10 (Цветная вкладка). На рисунке 11 (Цветная вкладка) приведен пример улучшения поверхности кожи около глаз: рис. 11 а) – область глаза до процедур, рис 11 б) – через несколько месяцев после применения терапии. Видно, что количество и глубина морщин после процедур заметно уменьшилось. На рис. 12 (Цветная вкладка) показан результат лечения лобных морщин.

Некоторые специалисты пришли к заключению, что лечение морщин с помощью аутологичных фибробластов является наименее трудоемким и наиболее эффективным методом коррекции морщин в клинической практике. Этот

метод представляется единственным, эффективно убирающим рубцовые изменения после угревой сыпи (Рис. 13, цветная вкладка). По данным доктора Арнольда Клейна (США) эффективность метода достигает 95%.

Основные свойства фибробластов сохраняются при культивировании их вне организма. Эти клетки:

- сохраняют диплоидный кариотип в течение жизни;
- имеют ограниченную продолжительность жизни;
- обладают свойством контактного торможения делений и требуют прикрепления к субстрату (дну культурального флакона) для пролиферации;
- у клеток отсутствует онкогенная потенция, т.е. имеется безопасность применения аутологичных фибробластов (Келлер и др., 2000), отсутствуют опухоли у бестимусных мышей через 2 мес. после введения 40 млн. клеток;
- имеют нормальную сократительную способность в отношении коллагена;
- сохраняют активный синтез коллагена I типа после культивирования *in vitro* в течение 6 пассажей.

В одной из фирм США утверждается, что ими выполнены уже тысячи подобных процедур, пролечены тысячи пациентов. С помощью подобных методик в косметологии исправляют возрастные изменения кожи лица, морщины, рубцы кожи. Применение собственных клеток оправдано тем, что отсутствует реакция отторжения, часто возникающая при использовании клеток других людей, как эмбриональных, так и тем более полученных от взрослых доноров. Кроме того, нет этических проблем, возникающих при использовании эмбриональных клеток.

Примеры применения методик показаны также на других рисунках. Так, на рис. 14 (Цветная вкладка)

показан вид лица пациентки с носогубной складкой (морщина) до процедуры применения аутогенных фибробластов (а), во время клеточной терапии (б) и спустя 6 месяцев после (в). Хорошо видно, что морщина значительно уменьшилась (разгладилась) и практически исчезла. Это произошло за счет того, что введенные аутогенные фибробласты прижились и начали вырабатывать новый, молодой коллаген и эластин.

На другом рисунке (Рис. 15, цветная вкладка) можно видеть часть участка лица пациентки до процедуры введения аутогенных фибробластов (а) и спустя 4–6 месяцев после выполнения терапии (б). Стрелкой показан дефект кожи до терапии и после. Дефект – рубцовая поверхность на щеке после удаления бородавки (Watson et al., 1999).

Возможны исправления иных подобных старческих изменений кожи (Weiss et al., 2007).

## **КРИОХРАНИЛИЩЕ**

После применения клеточной терапии часть клеток может оказаться неиспользованной. Эти клетки следует сохранить для того, чтобы повторять процедуры в отдаленном будущем.

Для сохранения собственных клеток необходимо поместить их в специальное криохранилище. Оно представляет собой дюралюминиевую или стальную емкость, выполненную по типу термоса, с двойными стенками, между которыми создается вакуум. В неё заливается жидкий азот, имеющий температуру минус 196°С (Рис. 16, цветная вкладка).

Перед замораживанием клетки отмывают от ростовой среды и выдерживают в защитном растворе, который предотвращает их от повреждения при низкой

температуре. Затем суспензию клеток заливают в специальные стерильные пластмассовые ампулы, закрывающиеся герметично. Эти ампулы с клетками внутри вначале подвергаются постепенному плавному охлаждению до минус 70–80° С, после чего погружаются в жидкий азот в криохранилище, где они сохраняется долгие годы и десятилетия. Каждой криобирке присваивается свой индивидуальный идентификационный номер, который заносится в компьютерную базу. Этот номер строго соответствует тому человеку, у которого взяли клетки. В базе содержатся следующие данные: имя, отчество и фамилия человека, дата рождения, характеристика крови, сведения о наследственных заболеваниях, дата взятия биопсии, некоторые другие сведения.

Компьютерная база существует не только в самом компьютере, но информация также дублируется на компакт диски или на USB-флэш-накопители (флэшки), которые хранятся в специально выделенном месте. Это исключает потерю информации. Само криохранилище постоянно находится под присмотром дежурного персонала, к нему исключен доступ посторонних лиц, а все манипуляции с контейнерами производит только тщательно обученный персонал, несущий личную ответственность за сохранность клеточного материала.

В таком криохранилище фибробласты или другие клетки могут храниться неограниченное время, а при необходимости часть их можно извлечь, разморозить и применить для клеточной терапии кожи, органов или других целей в будущем.

## ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Кожа – это очень важная ткань человека, которая несёт значительные функции организма: защищает от проникновения микроорганизмов, предотвращает высыхание мышечной ткани, регулирует температурный баланс путем потоотделения. Однако у человека имеются другие не менее важные ткани и органы. Все они также подвергаются старению.

Мы уверены, что метод клеточной терапии сможет в ближайшем будущем применяться и для восстановления других состарившихся или больных тканей или органов, например, таких как мышцы, печень, почки, сердце и др. (Прохоров, 2004).

Следует заметить, что практически весь более чем 2-кратный прирост средней продолжительности жизни (СПЖ) за последнее столетие, начиная с конца 19-го — начала 20-го века и до наших дней произошел благодаря успехам медицины. Весь прирост СПЖ произошел из-за улучшению лечения инфекционных болезней, болезней сердечно-сосудистой системы, онкологических заболеваний. Это дало возможность увеличить СПЖ человека в развитых странах с 30–40 лет в конце 19 века до 60–80 лет (мужчины и женщины) в конце 20 века. О том, как увеличилась максимальная продолжительность жизни (МПЖ) говорить трудно, т.к. зачастую нет уверенности в дате рождения того или иного долгожителя, родившегося ранее 20 века. Все-таки, с некоторой долей осторожности, можно сказать, что МПЖ, в отличие от СПЖ, за последнее столетие увеличилась несущественно и сейчас составляет примерно 115–120 лет. Достоверно зарегистрированный рекорд 121 год (Альперович, 1998). Считается, что в верхнем палеолите (30 000–12 000 лет



тому назад) МПЖ человека уже была 95 лет (Дильман, 1986).

Однако сейчас прирост СПЖ в развитых странах замедлился, т.к. успехи медицины привели к тому, что СПЖ человека постепенно приближается (сегодня СПЖ более 80 лет у женщин) к своему естественному видовому пределу, близкому к МПЖ, и для существенного, радикального ее увеличения необходимы прорывные идеи и решения. Развитие науки подошло к рубежу, когда возможен существенный прорыв в увеличении СПЖ и МПЖ в 1,5; 2; 3 и более раз. Необходимо также иметь в виду, что важны не только СПЖ или МПЖ, но и так называемая предстоящая продолжительность жизни (ППЖ). ППЖ характеризует теоретическую или предсказываемую продолжительность жизни с некоторого возраста организма. Это может быть, к примеру, возраст с которого применяется то или иное воздействие на организм. Такой параметр нужен еще и потому, что много предполагаемых геропротекторных (направленных против старения) воздействий в экспериментах на животных применяется в зрелом возрасте или в конце жизни, а по отношению к человеку это, практически, является правилом. Однако надо иметь ввиду возможность переоценки действенности того или иного средства, исследуемого по влиянию на этот параметр. Если, например, после воздействия в конце жизни у людей ППЖ увеличилась на 100% (в 2 раза) по сравнению с контролем, скажем, с 70 до 80 лет — при воздействии и с 70 до 75 лет — без него  $((80-70)/(75-70)=2$  раза или 100%), то СПЖ увеличилась под воздействием препарата в этом случае всего на 6,7%  $(100\% \times (80-75 \text{ лет})/75)$ .

Рассмотрим наиболее реальные, выполнимые и достоверно действующие способы увеличения СПЖ и

МПЖ, а также наиболее перспективные по перечисленным признакам.

Все методы по характеру воздействия можно разделить на две группы.

К одной группе относятся методы, которые могут только *замедлить старение* и увеличить СПЖ и МПЖ в 1,5–2 раза).

К другой группе относятся методы *радикального решения проблемы старения* (увеличение СПЖ и МПЖ более чем в 1,5–2 раза).

### **Замедление старения (потенциальное увеличение средней и максимальной продолжительности жизни в 1,5 –2 раза)**

Если проанализировать все имеющиеся данные о способах увеличения продолжительности жизни (ПЖ), то можно прийти к выводу, что многие из них совершенно разнородные и действуют на различные системы организма.

Как следует из анализа литературных данных, есть много различных факторов, увеличивающих ПЖ животных. Это, например, голодание, понижение температуры тела, увеличение двигательной активности, антиоксиданты, ингибиторы биосинтеза белка, биологически активные вещества, энтеросорбенты, ионизирующая радиация, витамины, этанол, ЭДТА, геровитал и т.д. (Никитин, 1984; Обухова, Эмануэль, 1984; Равин, 1984; Фролькис, Мурадян, 1988; Parsons, Spence, 1981). Поскольку природа этих воздействий чрезвычайно различна, а результат один – увеличение ПЖ, то логично предположить, что все они оказывают влияние на какой-то один механизм. После углубленного анализа всех

имеющихся в нашем распоряжении данных, своих и взятых из литературы, мы пришли к заключению, что все перечисленные факторы, увеличивающие ПЖ организмов, влияют на уровень обмена веществ в этих организмах, иначе говоря, на уровень или на скорость метаболизма (могут уменьшать). Причем, одним из следствий уменьшения уровня метаболизма является уменьшение средней скорости пролиферации (деления клеток). Проведенное изучение действия факторов, увеличивающих ПЖ организмов, показало, что у тех экспериментальных объектов, в которых оценивали уровень метаболизма при их применении, уменьшается скорость протекания биологических процессов, т.е. метаболизм, а также скорость деления клеток.

В результате теоретических и экспериментальных исследований мы сформулировали следующую гипотезу. Предполагается, что увеличение ПЖ организма, имеющего в своем жизненном цикле старение, может происходить в результате уменьшения средней скорости пролиферации (деления) составляющих организм клеток и замедления общего метаболизма в период его роста, а также из-за уменьшения общего метаболизма в период после окончания роста (Прохоров, 2000).

В пользу этой гипотезы может говорить, например, наличие корреляционной связи скорости метаболизма и ПЖ животных разных видов. Было установлено, что ПЖ млекопитающих разных видов обратно пропорциональна энергетическому обмену, выраженному как число потребляемых калорий в сутки на грамм веса тела животного (Cutler, 1984), или скорости метаболизма, оцененному по скорости потребления кислорода, выраженной в миллилитрах на грамм веса тела в час (Biology Data Book, 1973). Т.е. чем меньше скорость (уровень) метаболизма, тем больше ПЖ.

Calder W.A. (Calder, 1985) также пришел к выводу, что МПЖ млекопитающих отрицательно коррелирует с интенсивностью метаболизма. Некоторые исследователи отводят ведущую роль в старении накоплению повреждений, зависящих от скорости метаболизма (Segal, 1988).

Уровень метаболизма определяет скорость деления клеток в организме. Соответственно скорость деления клеток отражает скорость обмена веществ. Поэтому, зная скорость деления (пролиферации) клеток в организме, можно оценивать и уровень общего метаболизма.

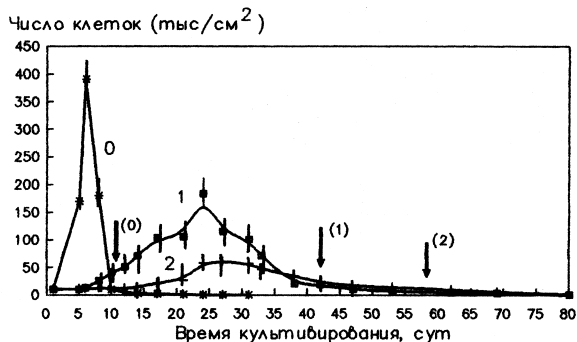
Эта логика прослеживается в наших работах, которые также свидетельствуют в пользу выдвинутой гипотезы. Нами показано, что МПЖ рыб, земноводных, пресмыкающихся, птиц и млекопитающих прямо пропорциональна числу удвоений (среднему числу делений) составляющих организм клеток и обратно пропорциональна скорости удвоения (средней скорости деления) этих клеток в эмбриональный период и за все время роста от зиготы до завершения формирования организма (Прохоров, 1999а,б; Прохоров, 2002б). Иначе говоря, чем меньше скорость деления клеток в период роста организма в эмбриональный период и от рождения до окончания роста, а значит меньше и скорость обмена веществ – общего метаболизма, тем больше его ПЖ.

Таким образом, проведенные эксперименты на животных (Фролькис, 1988) и на культурах клеток (Прохоров, 1999б,в; 2002) позволяют предполагать, что снижение метаболизма и скорости пролиферации может увеличить СПЖ и МПЖ животных. Как видно из полученных результатов экспериментов, в которых выявляли увеличение ПЖ животных, связанное с уменьшением уровня общего метаболизма и скорости деления клеток, увеличение СПЖ составляет не более 1,5–2 раз.

Это ограничение связано с тем, что при повышении степени воздействия на организм или культуру клеток выше некоторого оптимального значения (большое увеличение концентрации препарата, значительное уменьшение температуры и др.) начинают проявляться отрицательные характеристики факторов, например, они начинают уменьшать размеры животного при голодании (Никитин, 1984) или насыщающую плотность в культурах клеток животных (Прохоров, 2000). На культурах это хорошо видно на примере воздействия антиоксиданта дибунола. На рис. 17б хорошо видно, что при концентрации 30 мкг/мл в ростовой среде ПЖ культуры трансформированных клеток китайского хомячка примерно в 2 раза выше, чем в контроле, а насыщающая плотность не отличается от насыщающей плотности контрольной культуры (за ПЖ культуры принимали время от посева до ее гибели, а за гибель – момент, когда число живых клеток в культуре станет меньше 10% от их числа при насыщающей плотности). При больших концентрациях дибунола насыщающая плотность значительно уменьшена. На рис. 17а видно, что при концентрации дибунола 50 мкг/мл ПЖ культуры больше примерно в 4 раза, чем в контроле, но насыщающая плотность культуры ниже более чем в 2,5 раза, по сравнению с контрольной культурой. Это значит, что клетки делятся меньшее число раз и не достигают плотности контрольной культуры. При концентрации 100 мкг/мл ПЖ экспериментальной культуры по сравнению с контрольной еще больше — более чем в 5 раз, но культура растет гораздо хуже и насыщающая плотность почти в 8 раз ниже плотности контрольной культуры.

Такая ситуация *in vivo* (уменьшение числа делений клеток в организме от появления зиготы до окончания роста) приведет к замедлению развития, и главное к тому,

а



б

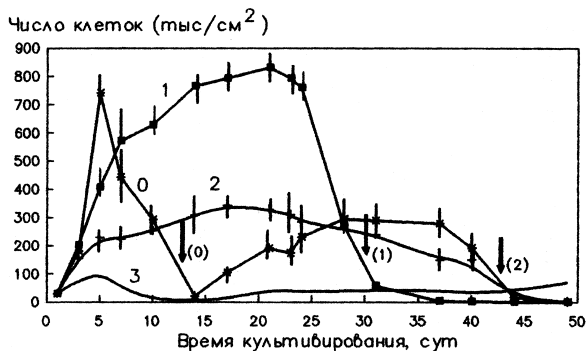


Рис.17. Изменение числа живых трансформированных клеток китайского хомячка при росте, в стационарной стадии и при последующей гибели непересеваемых культур этих клеток. Стрелками указаны моменты "гибели" культур. а – эксперимент № 1: 0,1,2 – концентрации дибутилола 0;50;100 мкг/мл в ростовой среде, соответственно; б – эксперимент № 2: 0,1,2,3 – концентрации дибутилола 0;30;50;100 мкг/мл в ростовой среде, соответственно (Прохоров, 2000).

что организм не достигнет нормального роста, что недопустимо, особенно для человека.

## **Радикальное решение проблемы старения (потенциальное увеличение средней и максимальной продолжительности жизни более чем в 1,5 –2 раза)**

Вероятнее всего, у сложных многоклеточных организмов полностью устранить старение невозможно, но вот периодически омолаживать организм, видимо, реально. Что необходимо сделать для реализации этой идеи?

Любой организм состоит в основном из клеток. Старение почти одновременно захватывает все органы и системы организма. Если рассмотреть отдельно каждый стареющий орган (печень, почку, сердце и т.д.) или систему организма (нервная, лимфатическая, иммунная, кровообращения), то все они, как правило, образованы теми или иными клетками, которые образуют соответствующие структуры. Хорошо известно, что при старении в органах уменьшается число здоровых, жизнедеятельных клеток, увеличивается число мертвых клеток, часть из которых замещается соединительной тканью (Стреллер, 1964). Как показали исследования, это происходит практически во всех органах.

Из этого следует вывод: для решения проблемы старения необходимо, чтобы клетки любого органа всегда состояли из жизнеспособных, молодых клеток, способных «вечно» выполнять «возложенные» на них функции.

Однако ясно, что на самом деле не существует негибнущих, «вечных» клеток, независимо от того, делятся они или нет. Даже в культурах трансформиро-

ванных или раковых клеток, в которых клетки могут делиться неограниченное число раз, последние постоянно гибнут. Место погибших клеток занимают молодые дочерние клетки и поэтому такая популяция живет неограниченное время при условии постоянства среды обитания и достаточности питания. Поэтому нужно говорить не о «вечных» отдельных клетках, а о «вечных» **популяциях** клеток.

Такие «вечные» популяции клеток существуют и они хорошо известны – это культуры трансформированных клеток разного происхождения, разных животных, например, трансформированные клетки китайского хомячка, а также культуры раковых клеток животных и человека, например, раковые клетки человека линии HeLa.

Правда, даже такие «вечные» популяции могут погибнуть, если у них не будет места для размножения и, соответственно, возможности делиться. Это очень важное замечание, как будет показано ниже, и без решения этой проблемы нельзя будет достичь цели – неограниченно увеличить ПЖ животных и человека.

Возвращаясь к вопросу: «Можно ли остановить старение?» следует признать очевидным, что для этого нужно сделать «вечно» жизнеспособной популяцию клеток, составляющую тот или иной орган.

Еще в 1984 г. автором книги был сделан доклад в Московском обществе испытателей природы (МОИП), который в то время некоторыми специалистами был воспринят как научно-фантастический (Прохоров, 1984). Сейчас то, о чем говорилось в докладе приближается к реальности и многие исследователи этим практически начинают заниматься. Что же вызвало такую недоверчивую реакцию у слушателей?



Суть доклада состояла в том, что для решения проблемы старения необходимо сделать клетки в органах «вечно» молодыми и способными к неограниченному числу делений. То есть, необходимо сделать нормальные клетки, например фибробласты кожи, похожими на раковые (трансформированные) по их свойству неограниченно делиться, но так, чтобы их деление было всегда подконтрольным, в отличие от поведения обычных раковых клеток. Именно это вызвало недоверие слушателей и послужило основанием для того, чтобы признать идеи автора невыполнимыми.

Действительно, в то время так это и обстояло на самом деле, т.е. реализовать предложенные автором идеи в тот период времени не было технической возможности. Но, как оказалось позже, со временем, развитие науки и технологий привело к тому, что часть идей, которые были высказаны ранее автором, стали возможными для реализации уже в настоящее время. Другие идеи реализовать пока не удалось, но думаю, что научный прогресс обеспечит воплощение их в реальность уже в обозримом будущем.

Возвращаясь к описанию высказанных автором идей в докладе, следует задуматься о том, как можно получить такие неограниченно делящиеся клетки и каким образом их контролировать, а точнее, как контролировать деление этих клеток? Было предположено, что в клетках организма существуют определенные вещества (факторы активаторы и факторы репрессоры — ФАР, такое название предложил автор — Л. Ю. Прохоров в 1984 г.), ответственные за активацию и подавление генетического аппарата, который в свою очередь, регулирует пролиферативную способность клеток и может обеспечить им неограниченное деление.

Если сделать все клетки организма «вечными», т.е. с бесконечным потенциалом деления, то органы из таких

клеток будут «молодыми» и организм из таких «молодых» (омоложенных) органов будет также «молодым». Необходимым условием является управляемость деления этих клеток, при этом они должны оставаться нормальными. Предполагалось на роль регуляторов деления клеток отнести выше названные факторы активаторы и репрессоры генетического аппарата.

В то время такие факторы активаторы и репрессоры не были известны, что и породило у слушателей доклада скептицизм по поводу предложенной идеи.

Но, как оказалось позже, подобное вещество, которое способно расширить пролиферативный потенциал нормальных клеток все-таки существует и этим веществом оказался фермент теломераза.

Открытие этого фермента было предворено теоретическими исследованиями нашего соотечественника Алексея Матвеевича Оловникова в начале 70-х годов 20 века (Оловников, 1983, 1988; Olovnikov, 1973). Он предсказал причину того, что диплоидные фибробласты делятся в культуре только ограниченное число раз. При каждом делении концевая часть ДНК сокращается и после нескольких десятков делений ДНК укорачивается настолько, что это вызывает остановку деления клеток. Напрашивался вывод, что для устранения блока деления клеток необходимо предотвратить укорочение ДНК. Как оказалось, эту роль в клетке выполняет фермент теломераза. Выяснилось, что в раковых клетках теломераза присутствует, а в нормальных клетках ее нет. В конце 90-х годов прошлого столетия американские исследователи (Vodnar et al., 1998), а несколько лет позже в начале 2000-х годов и российские ученые (Егоров и др., 2003) показали, что если в нормальные клетки человека (фибробласты), которые в норме совершают в культуре только примерно 50 удвоений после чего перестают

делиться, ввести ген, постоянно продуцирующий фермент теломеразу, то такие клетки приобретают способность делиться неограниченное число раз. Эти клетки в эксперименте совершили больше двухсот удвоений (Егоров и др., 2003), а контрольные (без гена теломеразы) — смогли сделать только примерно 50 делений.

Таким образом, идея, высказанная автором в 1984 г., может обрести реальные очертания. Поэтому следующим перспективным шагом является применение методов, увеличивающих, так называемый, пролиферативный потенциал клеток, применяемых для клеточной терапии.

Основываясь на вышеописанном открытии, можно повторить высказанное ранее предположение на другом уровне оптимизма. Органы, состоящие из «вечно» молодых клеток (с геном теломеразы), будут всегда «молодыми» и организм из таких омоложенных органов станет «вечно» молодым. Как будет описано ниже для реализации такого проекта необходимо выполнить еще одно открытие автора, которое заключается в том, чтобы принудительно устранять из органа старые плохо работающие клетки и ткани, мешающие функционированию молодых, полноценных клеток (Прохоров, 1999в, 2002а, 2004, 2015а, 2016а).

## **Радикальное увеличение продолжительности жизни путем замены клеток**

Таким образом, одним из самых перспективных методов радикального, многократного увеличения ПЖ может быть следующий – он проиллюстрирован на рисунке 18. Суть метода автора заключается в том, что из органа (старого или больного) извлекается часть здоровых клеток; некоторое время они растут в искусственной

питательной среде, их число увеличивается, потом в эти клетки вводится ген теломеразы и их возвращают в тот же орган, из которого они были взяты. Предполагается, что эти клетки приживутся и будут со временем замещать «старые» или «больные» клетки. После нескольких подобных операций орган будет состоять из «омоложенных» клеток с полноценными функциями и свойства органа будут также восстановлены.

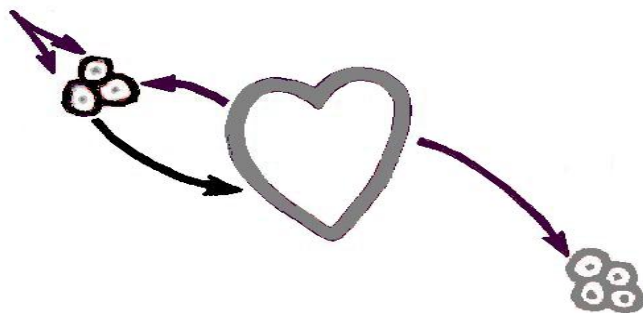
Основываясь на своих исследованиях, мы пришли к заключению, что необходимо будет выполнять также следующее действие (о чем упоминалось выше) – устранять старые клетки и старые межклеточные ткани, образующиеся в результате гибели «старых» клеток. Дело в том, что такие старые клетки и межклеточная ткань, остающаяся вместо разрушенных старых клеток занимают в органе определенное место и не позволяют «молодым», «здоровым» клеткам размножаться. Иначе говоря, «молодым» клеткам нет пространства для размножения.

Подобная необходимость присутствует и в лабораторных культурах клеток (*in vitro*). Если бесконечно делящиеся трансформированные или раковые клетки растут в стеклянных флаконах и после своей гибели по разным причинам открепляются от ростовой поверхности, лизируются и тем самым освобождают место для роста молодых клеток, то культура живет неограниченно долго и не гибнет. Но если в культуре «старые» клетки не открепляются от ростовой поверхности и не освобождают место «молодым» клеткам, то «молодые» клетки не имеют возможности делиться и гибнут. Из-за этого гибнет и вся популяция клеток (Прохоров, 1999в, 2002а, 2004, 2015а, 2016а).

Поэтому так важно устранять из старого органа «старые» клетки. Это необходимо для того, чтобы «молодые» клетки имели место для размножения.

## *Замена старых клеток на “молодые”*

**Извлечение клеток,  
наращивание, ввод гена  
теломеразы и возвращение  
обратно**



**Сердце**

**Удаление старых,  
неработающих клеток**

Рис. 18. Схема замены старых клеток в органах на “молодые” клетки на примере сердца. Те же действия могут осуществляться для печени, почек, мышц, мозга и др. (Прохоров, 2004; рисунок автора).

Устранять «старые» клетки можно вместе с частью «здоровых» клеток, которые изымаются для ввода гена теломеразы. Вероятно, можно придумать другие методы устранения «старых» клеток. Например, попытаться каким-то образом лизировать их с помощью некоторых ферментов, типа трипсина, коллагеназы и других (Прохоров, Згурский, 2005).

Достоинство рассмотренного в разделе метода в том, что восстановление органа происходит с помощью клеток того же органа, из которого они перед этим были

извлечены, тем самым решается серьезная проблемы медицины – отторжение чужеродных клеток. Клетки своего органа имеют аналогичный иммунный статус и не отторгаются.

В качестве альтернативного варианта предлагается вместо клеток «старого» органа для замены использовать клетки-предшественники (стволовые клетки).

Эти клетки можно получить из эмбрионов ранних сроков. Их, видимо, можно вводить в органы и они не будут отторгаться, если еще не успели приобрести иммунный статус растущего организма.

В эти же клетки можно внедрить ген теломеразы и после этого ввести в «старый» орган, предварительно устранив часть «старых», нефункционирующих клеток и соединительную ткань, образовавшуюся после гибели и лизиса части «старых» клеток.

К настоящему времени уже успешно сделаны пересадки клеток нервной ткани эмбриона животных в головной мозг крыс или мышей (Hu, 2004; Kawaguchi et al., 2004). Ткань росла, дифференцировалась и у животных восстанавливались двигательные функции.

Пересадка эмбриональных нервных тканей человека в спинной мозг восстанавливала мышечную активность у больных при травмах позвоночника (Rabinovich et al., 2003).

Необходимо только учитывать одну особенность, которая была обнаружена автором, что молодые клетки, помещенные в окружение старых, неделящихся клеток или старой ткани не могут делиться и не могут полностью реализовать свой пролиферативный потенциал (Прохоров, 2004).

Отсюда следует вывод, что для устранения этого негативного обстоятельства требуется особым образом подготовить ткань, которая будет подвергаться клеточной

терапии. Нужно «размягчить» дерму (соединительную ткань), например, коллагеназами или протеазами, или гиалуроновой кислотой, или другим способом, затем обеспечить ее питание и только потом внедрять молодые клетки (Прохоров, Згурский, 2005). Это следующий шаг в клеточной терапии, который сейчас разрабатывается автором.

## **Радикальное увеличение продолжительности жизни путем замены органов на искусственные**

Другим перспективным способом радикального увеличения ПЖ может быть полная замена органов на искусственные (Рис. 19). В настоящее время большинство людей с больным сердцем, но здоровых во многих других отношениях, гибнет в результате остановки сердца. Заменяв больное сердце на здоровое, можно сохранить их жизнь. Также можно поступить и с другими органами: печенью, почками, селезенкой, частично сосудами и т.д.

Таким образом, замена больных или старых органов на искусственные приведет к выздоровлению больного или старого человека и продлению его жизни.

Искусственные органы могут быть выполнены из полимерных материалов, а могут быть выращены из клеток того же или донорского организма. Кроме того, последние технические достижения позволят в ближайшее время конструировать органы из клеток на, так называемом, 3-D принтере.

Таким образом, с помощью описанных методик можно увеличить ПЖ человека в 2, 3 и более раз.

Сейчас дело за техникой, технологией и желанием людей заниматься этими конкретными проблемами, а

также наличием материального обеспечения и соответствующего финансирования.

***Замена старых органов на искусственные  
(механические или выращенные в лабораторных  
условиях)***

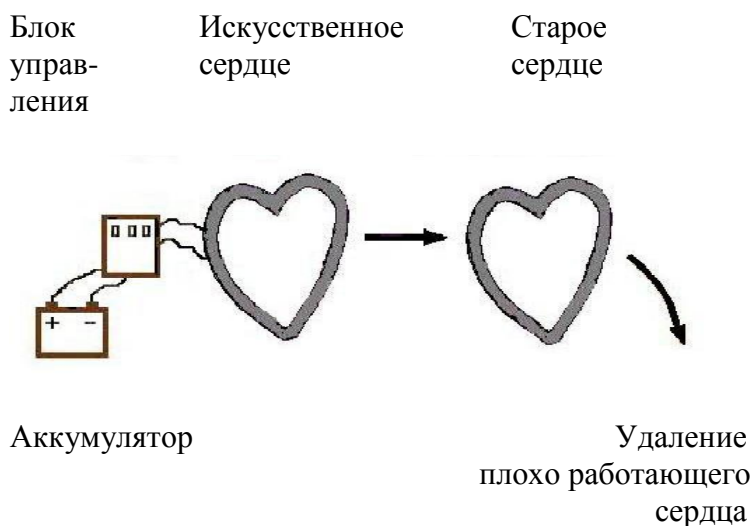


Рис. 19. Схема замены старых органов на искусственные на примере замены плохо работающего сердца. Аналогично можно заменить печень, почки и др. (Прохоров, 2004; рисунок автора).



## **СОПОСТАВЛЕНИЕ СПОСОБОВ ЗАМЕЩЕНИЯ СТАРЫХ КЛЕТОК НА МОЛОДЫЕ В ОРГАНИЗМЕ И В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК, РАСТУЩЕЙ БЕЗ КЛАССИЧЕСКОГО ПЕРЕСЕВА**

Известно, что для поддержания роста культуры клеток животных или человека и ее жизнеспособности необходимо производить так называемый пересев клеток. Обычно культура клеток растет в ростовой среде в специальных культуральных флаконах, точнее на дне этих флаконов. Изначально во флакон помещается небольшое количество клеток и поэтому, когда они прикрепляются к ростовой поверхности флакона, не заполняют полностью всю его площадь, а остается свободное место, на которое передвигаются дочерние клетки после деления. После нескольких делений, когда клетки заполнят всю ростовую поверхность, ростовую среду выливают из флакона и в него заливают смесь стандартных растворов Версена и трипсина (обычно 1:1) для того, чтобы открепить клетки от дна флакона и перенести их в другой флакон. Через некоторое время (1–2 мин.) смесь выливают и оставляют флакон в термостате, чтобы клетки начали открепляться от ростовой поверхности. Примерно еще через 15–20 мин во флакон заливают немного свежей среды и открепившиеся клетки суспендируют (перемешивают) в ростовой среде с помощью культуральной (серологической) пипетки или пипетки Пастера. Часть полученной суспензии (взвеси клеток в среде), например, половину, переносят в другой новый (чистый) флакон и в него заливают необходимое количество свежей ростовой среды. После этого клетки прикрепляются к ростовой поверхности нового флакона и вновь начинают делиться. Этот процесс автор и назвал

«классическим пересевом». Если переносят половину клеток, то это обозначают как пересев 1 к 2 или 1:2, если одну четвертую, то – 1 к 4 или 1:4 и т.д. Условно принимают, что пересев 1:2 означает, что все перенесенные в новый флакон клетки до состояния сомкнутого монослоя будут делиться примерно 1 раз. Это называют также словом «пассаж» и считают, примерно, что 1 пассаж равен одному делению.

В наших экспериментах клетки растут без «классического посева», т.е. после достижения монослоя клетки не снимают с ростовой поверхности и не переносят в новый флакон, а вместо этого из флакона периодически (2–4 раза в месяц) выливают «старую» истощенную ростовую среду и заливают новую. В такой культуре в стеклянном флаконе старые клетки после достижения монослоя начинают сами периодически открепляться от ростовой поверхности и при выливании «старой» среды вместе с ней удаляются из флакона. Таким образом, старые клетки освобождают место для роста молодых клеток. Открепляются старые клетки вследствие того, что у них со временем ослабевают или разрушаются белковые мостики, которые прикрепляют клетку к ростовой поверхности. Это возможно только в том случае, если такой поверхностью является стекло. При росте клеток на пластмассовой поверхности этого не происходит из-за того, что клетки более сильно прикреплены к этой поверхности и даже старые клетки не в состоянии открепиться от нее. Именно поэтому в пластмассовых флаконах или планшетах не получается долгое время содержать культуру клеток, меняя старую среду на свежую (Прохоров, 2005).

Автором (Прохоров, 2014; 2015а, 2016а) показано, что в культуре клеток, растущих без классического посева в стеклянных флаконах, клетки могут существовать, т.е.

оставаться живыми, неограниченное время. На момент издания данной книги культура клеток остается «живой» уже более 14 лет и 7 месяцев.

В организме человека для большинства типов клеток такого процесса замещения старых клеток на молодые нет. Для того, чтобы клетки нормально работали и обновляли популяцию клеток органа или ткани, нужно найти способ удаления из органа или ткани старых клеток. Для удаления старых клеток можно было бы попробовать применять некоторые ферменты, которые способны разрушать старые клетки, например, трипсин, коллагеназа, эластаза и др.

Необходимо отметить, что в природе все же есть организм, у которого такой процесс замены старых клеток на молодые при определенных условиях происходит, за счет чего этот организм может существовать неограниченное время, сохраняя свое тело в неизменном состоянии. При этом процессы старения у него компенсируются процессами омоложения, т.е. старые клетки постепенно удаляются, а вновь появившиеся молодые клетки их замещают. Таким образом, организм этого животного находится в равновесном состоянии, находясь постоянно в процессе обновления или омоложения. Речь идет здесь об одном из простейших организмов природы, у которого имеется возможность такого самоомоложения – о пресноводной гидре *Fuska*. Это водное кишечнополостное животное, у которого в центре тела имеются стволовые (интерстициальные) клетки, которые постоянно делятся, специализируются и мигрируют к концу тела, где они стареют и слущиваются в окружающую среду. Это происходит тогда, когда гидра находится в теплой воде и может размножаться почкованием. При похолодании гидра переходит к половому размножению и после этого гибнет. Как правило, продолжительность жизни гидры в природе составляет

менее года, но в искусственных условиях, в аквариуме, в теплой воде экспериментаторы содержали этих животных 4, 8 и более лет (в разных экспериментах) и не заметили признаков старения (Brien, 1965a,b; Martinez, 1998; Shaible et al., 2015).

## **Материалы и методы**

В эксперименте с культурами использовали спонтанно трансформированные клетки китайского хомячка (ТККХ), полученные из подкожной соединительной ткани, линия B11dii - FAF28, клон 431. Культуры клеток растили в стеклянных флаконах Карреля диаметром 54 мм, закрытых герметично резиновыми пробками (Рис. 20а, цветная вкладка) при температуре 37<sup>0</sup>С. Использовали среду Игла с 10% сыворотки крупного рогатого скота. ТККХ не пересевали, но один раз в 3-4 сут., позже 1 раз в неделю, а еще через какое-то время 2 раза в месяц меняли среду на свежую. В течение всего эксперимента с 2.11.2002 г., который продолжается и в настоящее время (более 14,5 лет — на год издания данной книги), считали число живых клеток в каждом флаконе.

## **Результаты**

На рисунке 21 показано изменение числа живых клеток в культуре ТККХ при замене ростовой среды, но без смены флаконов в течение более 13 лет и 7 месяцев (Прохоров, 2016а). На рисунке видно волнообразное изменение числа живых клеток в культуре. Это отражает процесс, который заключается в том, что «старые» клетки гибнут, открепляются от ростовой поверхности и переходят в ростовую среду. Тем самым они освобождают место для других живых «молодых» клеток, способных к



Рис. 21. Изменение числа живых клеток в культуре трансформированных клеток китайского хомячка, растущих без традиционного пересева, но при периодической замене ростовой среды на свежую. 1 – контроль (рост культуры без замены среды), 2 – эксперимент (периодическая замена среды).

делению, и за счет этого вся культура живет неограниченное время.

В контрольной культуре среда не менялась и клетки в ней погибли примерно за 1 месяц.

В более ранних экспериментах также делались попытки содержания культур этих и других клеток при периодической замене среды без классического пересева, которые длились меньшее время. В них аналогично обнаружили, что любые молодые и здоровые клетки, способные к быстрой пролиферации, не могут долго выживать в окружении старых, неделящихся клеток (Прохоров, 1999, 2004). Это открытие было сделано в

экспериментах, выполненных на культивируемых клетках, в частности, на тех же трансформированных клетках китайского хомячка, а также на раковых клетках человека линии HeLa и эмбриональных диплоидных фибробластах человека (Прохоров, 1999). В том случае, если культура клеток растет в культуральных флаконах без пересева и без периодической замены ростовой среды на свежую в течение всего времени эксперимента (примерно 1–1,5 мес.), после достижения клетками монослоя (насыщающей плотности) большинство клеток перестает делиться и начинает гибнуть. Причиной старения в данном случае является, так называемое «стационарное старение», которое начинается у клеток в результате контактного торможения деления, когда клетки находятся в монослое и не могут делиться из-за того, что нет места для размножения (Епифанова и др., 1983; Хохлов, 1988). При этом, часть клеток в монослое без деления остается еще какое-то время живой. Со временем все больше клеток становятся неспособными к размножению и, в конце концов гибнут, таким образом погибает и вся культура.

Вид культур ТККХ на разных стадиях роста и старения можно увидеть на рис. 22 (Цветная вкладка).

Если в момент достижения монослоя и далее, например, 1 раз в неделю производить замену старой ростовой среды на свежую, но не делать пересев клеток в чистый флакон, то в этом случае может наблюдаться разная судьба культур, в зависимости от материала из которого изготовлены культуральные флаконы. Оказалось, что если клетки растут в пластмассовых флаконах (Рис. 20б, цветная вкладка) или пластмассовых планшетах без пересева, то клетки долго не выживают, хотя производится периодическая замена ростовой среды на свежую. Т.е. постоянное присутствие свежей полноценной среды еще не гарантирует неограниченной ПЖ культуры, растущей

на пластмассовой поверхности. Иногда клетки в периодически заменяемой среде, могут жить лишь немного дольше, чем без замены среды, но все равно гибнут. Клетки погибают, если среду периодически менять на свежую сколько угодно раз.

Иная картина наблюдается если клетки растут на другой поверхности, но не на пластмассовой, а на стеклянной — на дне стеклянных флаконов Карреля (Рис. 20а, цветная вкладка). Оказывается, в этом случае культура клеток может жить в десятки и сотни раз дольше, чем на пластмассовой поверхности или в контроле на стекле, но без замены ростовой среды. Такое многократное увеличение ПЖ культур практически означает их потенциальную неограниченную ПЖ. Необходимым условием является стеклянная ростовая поверхность и периодическая (например, 1 раз в 1 или 2 недели) замена ростовой среды на свежую. При этом именно на стеклянной поверхности и при этих условиях клетки могут жить (делиться) в культуральных флаконах без пересева практически неограниченно долго.

Почему же имеется такая разница по ПЖ культур, живущих на стекле и на пластмассе? Чем стекло оказывается «лучше», чем пластмасса, для выживания культур клеток во времени?

Чуть ниже мы вернемся к обсуждению этого вопроса. Сейчас рассмотрим результаты некоторых конкретных экспериментов. На рис. 23 и 24 показано изменение числа живых клеток, растущих в пластмассовых планшетах в искусственной атмосфере с 5–7% CO<sub>2</sub>. Площадь лунки 2 см<sup>2</sup>. В эксперименте использовали трансформированные клетки китайского хомячка линии B11dii–FAF28 (клон 237, полученные из подкожной соединительной ткани взрослой самки китайского хомячка и претерпели спонтанную трансформацию) и раковые клетки человека

линии HeLa. Эти клетки не имеют ограничений по числу делений, если их периодически пересевать в новый флакон и использовать новую ростовую среду. В наших условиях культуры росли без пересева в ростовой среде Игла (MEM) с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Использовали по 3 лунки на каждый вид экспериментальной культуры. Подсчет клеток проводили непосредственно на ростовой поверхности с использованием инвертированного микроскопа при увеличении 120х.

Из рисунка 23 видно, что культуры клеток HeLa, растущие в пластмассовых планшетах, после достижения монослоя постепенно гибнут. Число живых клеток уменьшается, как без замены среды в контроле, так и при периодической замене ростовой среды на свежую.

Такая же картина наблюдалась в другом аналогичном эксперименте, проведенном на культурах трансформированных клеток китайского хомячка, растущих в пластмассовых планшетах, что отражено на рис. 24. Хорошо видно, что культуры гибнут как без замены среды (кривая 1), так и при периодической замене среды (кривая 2). Единственное отличие контрольных и экспериментальных кривых в том, что с заменой среды клетки растут немного дольше, достигают большего числа и живут только немного дольше, чем в культуре без замены среды.

В другом эксперименте (Рис. 25) наблюдали изменение числа эмбриональных диплоидных фибробластов человека, растущих в негерметичных пласт-массовых флаконах в искусственной атмосфере с 5–7% CO<sub>2</sub> при периодической замене (кривая 2) и без замены (кривая 1) ростовой среды на свежую. Клетки росли в среде ДМЕМ (с 40 мкг/мл гентамицина) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Замену среды во флаконах с фибробластами производили с интервалом



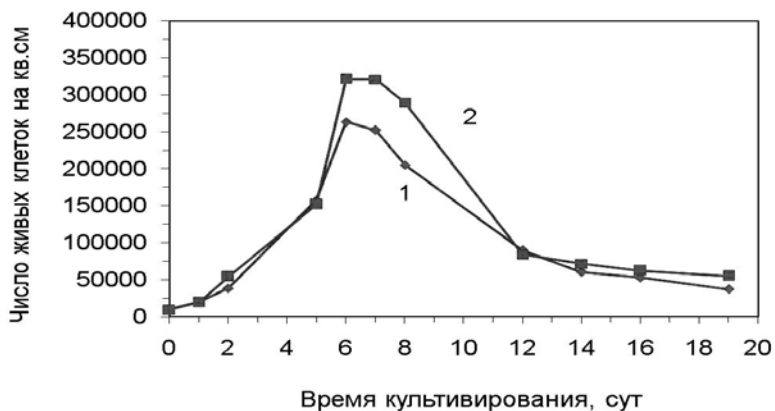


Рис. 23. Изменение числа клеток линии HeLa, растущих в пластмассовых планшетах (состав атмосферы постоянный), при периодической замене среды на свежую (2) и без замены (1).

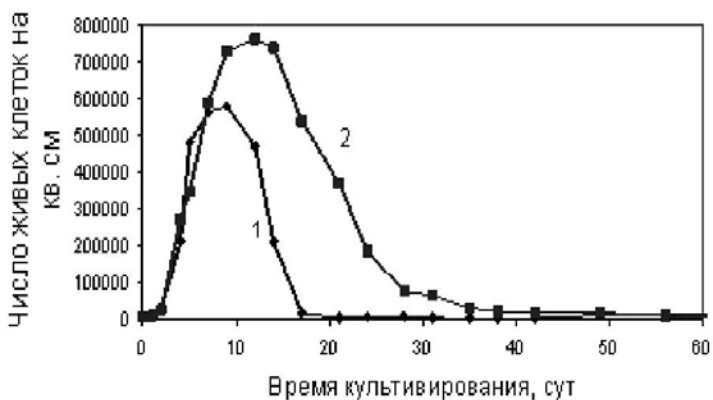


Рис. 24. Изменение числа трансформированных клеток китайского хомячка, растущих в пластмассовых планшетах (состав атмосферы постоянный), при периодической замене среды на свежую (2) и без замены (1).

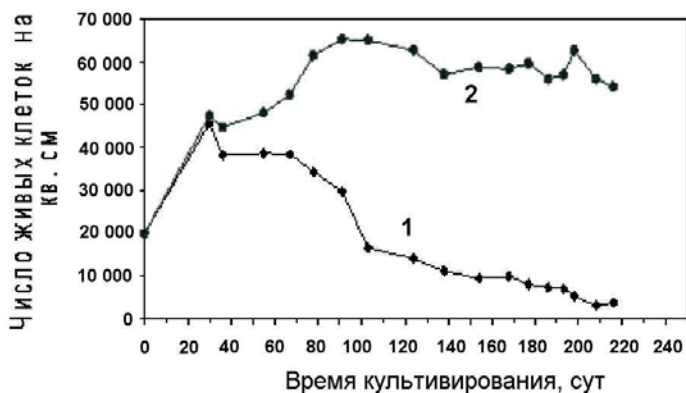


Рис. 25. Изменение числа эмбриональных диплоидных фибробластов человека, растущих в негерметичных пластмассовых флаконах (состав атмосферы постоянный), при периодической замене (2) и без замены (1) среды на свежую.

3–5 суток в первые 3 мес. и 7–9 суток — в последующие месяцы.

Видно, что замена среды меняет характеристики выживания клеток. ПЖ культур эмбриональных диплоидных фибробластов человека в условиях периодической замены среды незначительно возрастает, но при осмотре культуры выясняется, что клетки не делятся, а постепенно деградируют и культура не обновляется, т.е. клетки гибнут, не открепляясь от ростовой поверхности. И хотя их видимое число большое, но на самом деле это не живые, а мертвые клетки. В связи с этим такие культуры также не могут существовать неограниченное время (Прохоров, 1999).

Если ростовая среда не меняется, то питательные вещества постепенно расходуются и на поздней

стационарной стадии их недостаток может сказываться на способности клеток к делению. Периодическая замена сред означает, что в ростовой среде много питательных веществ и ростовых факторов для поддержания жизни клеток, но это не спасает клетки от гибели. Что же вызывает гибель клеток?

Известно, что когда клетки не делятся, то они находятся в, так называемом состоянии покоя, в фазе  $G_0$ . В это состояние они выходят из фазы  $G_1$  или  $G_2$  клеточного цикла. Фаза  $G_1$  следует за периодом деления (митоза)  $M$ , а  $G_2$  – после фазы синтеза ДНК  $S$ , поэтому было предложено именовать клетки, выходящие из разных стадий,  $R_1$  или  $R_2$ , соответственно (Епифанова и др., 1983).

Еще в 1974 г. была выдвинута гипотеза, в соответствии с которой неделящиеся клетки меняют свои характеристики таким образом, что чем дольше клетки находятся в этом состоянии, тем дольше их надо стимулировать, чтобы у них начался процесс деления (Augenlicht, Baserga, 1974). В конце концов, такие клетки настолько углубляются в это состояние покоя, что они уже не могут из него выйти и погибают. Было сделано важное наблюдение, что, находясь без деления, клетки приобретают некоторое сходство со старыми клетками (Evans, 1979a,b).

При этом, по мере пребывания клеток в покое, происходит процесс усиления прикрепления микротрубочек и микрофиламентов к ростовой поверхности за счет которых клетка к этой поверхности прикрепляется (Pasternak, 1976).

Однако существуют все же такие условия, при которых может быть практически бесконечная ПЖ культур. Это видно из нескольких экспериментов описанных ниже.

В одном из экспериментов трансформированные клетки китайского хомячка жили в культуре без пересева и без замены среды менее 1 мес, а при периодической замене среды – более 6 мес, т.е. в 6 раз больше, чем в контроле (Рис. 26) и также примерно в 6 раз дольше, чем в экспериментах, показанных на рис. 23 и 24. Отличие данного эксперимента от предыдущих состояло только в том, что клетки росли не на пластмассовой поверхности, а на стекле - на дне стеклянных флаконов Карреля (площадь флакона 23 см<sup>2</sup>). Для роста использовали ту же среду Игла с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Таким образом, ПЖ культуры на стеклянной поверхности при периодической замене среды была гораздо выше, чем без замены среды (Прохоров, 1999).

Другой эксперимент длился более 2-х лет, а результат эксперимента был еще более впечатляющий – клетки жили при тех же условиях, т.е. при периодической замене среды без пересева на стеклянных флаконах более чем в 20 раз дольше, чем в контроле (Рис. 27). Использовали также трансформированные клетки китайского хомячка. Культуры клеток росли в стеклянных закрытых герметично флаконах Карреля площадью 23 см<sup>2</sup>, в питательной среде Игла с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Кривая 1 показывает изменение числа живых клеток в контрольной культуре без замены среды и без пересева, кривая 2 — изменение числа живых клеток в опыте без пересева, но с периодической (1 раз в 5–7 сут.) заменой среды на свежую. Видно, что ПЖ контрольной культуры не превышает 35 суток. Напротив, в опыте ПЖ культуры несоизмеримо выше — более 800 суток, т.е. более 2-х лет и 2-х мес., что почти в 23 раза превышает жизнь культуры в контроле.

Таким образом видно, что культуры трансформированных клеток в стеклянных флаконах могут

существовать неопределенно долгое время, а вот в пластмассовых флаконах или в планшетах не могут. Почему? Визуальное наблюдение за клетками показало в чем отличие тех и других культур. Оказалось, что на пластмассовой поверхности клетки постоянно прикреплены к ней. Причем они, как правило, находятся на ней и тогда, когда погибают или уже будучи мертвыми и не способными к делению. Они не открепляются от ростовой поверхности и мешают делиться молодым клеткам. Не имея возможности делиться, молодые клетки лежат, постепенно стареют и потом погибают.

На стеклянной поверхности наблюдается другая картина. Как правило, старые, погибающие клетки, а тем более мертвые клетки округляются, прекращают распластываться, не могут удержаться на стекле и переходят в ростовую среду (всплывают, перекатываются по ростовой поверхности при покачивании флаконов). Это отличие и является определяющим. Именно это и позволяет объяснить, почему на стеклянной поверхности культуры клеток могут жить без пересева, но при периодической замене среды неограниченное время. Это происходит из-за того, что старые клетки отмирают, открепляются от ростовой поверхности и освобождают место молодым клеткам, способным делиться. Молодые клетки начинают делиться и дочерние клетки заполняют открывшиеся пространства.

В последующем такие старые, открепившиеся от ростовой поверхности клетки устраняются из флакона вместе со старой средой, при замене на свежую. При этом, из флакона устраняются и токсичные продукты распада погибших клеток, что также обеспечивает живым клеткам возможность делиться. Затем молодые клетки в свежей среде начинают делиться, достигают насыщающей плотности (монослоя), в свою очередь прекращают деле-

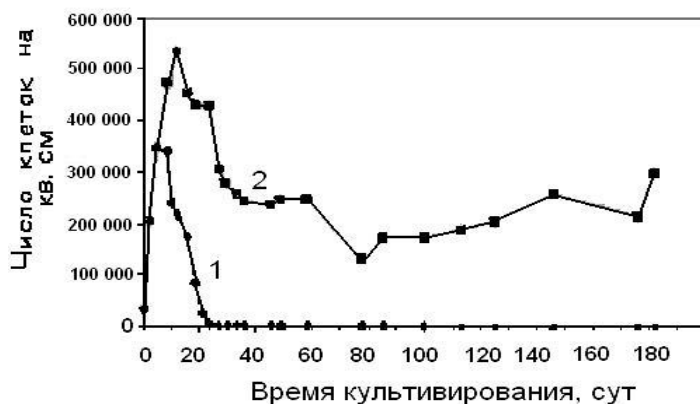


Рис. 26. Изменение числа трансформированных клеток китайского хомячка, растущих в стеклянных герметично закрытых флаконах при периодической замене среды на свежую (2) и без замены (1). Эксперимент 1.

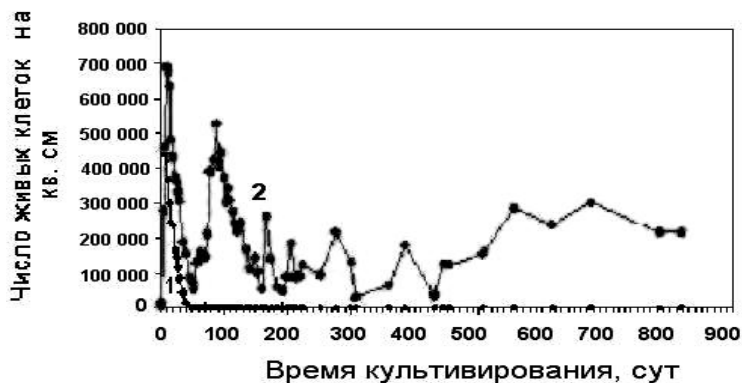


Рис. 27. Изменение числа трансформированных клеток китайского хомячка, растущих в стеклянных герметически закрытых флаконах при периодической замене (2) и без замены (1) среды на свежую. Эксперимент 2.

ние, начинают стареть, постепенно деградируют и гибнут, потом открепляются от стекла и освобождают место для роста способных к делению молодых клеток. Процесс может повторяться неограниченное число раз, благодаря чему клетки все время обновляются и культура остается живой в течение неограниченного времени.

В отличие от ситуации характерной для нахождения клеток на стеклянной поверхности, при росте клеток на пластмассовой поверхности старые клетки не открепляются от нее, поэтому молодые, способные к делению клетки не имеют возможности делиться, т.к. нет пространства для деления (им мешают неоткрепившиеся старые клетки) и культура не обновляется. В результате все молодые клетки в таких культурах постепенно стареют, гибнут и, соответственно, гибнет вся культура.

Похожая картина может наблюдаться и в организме. Даже если в органах есть много молодых, способных к делению клеток (в том числе стволовых), но если есть и старые клетки, которые не удаляются из органа, тогда молодые клетки (в т.ч. стволовые) не могут поделиться из-за отсутствия места для деления и не могут заменить дочерними клетками эти старые нефункционирующие клетки. В результате клетки в органе не обновляются, все большее число клеток гибнет, а орган, состоящий из старых, плохо работающих клеток или вообще не работающих, также сам становится плохо работающим и, в конце концов, перестает выполнять необходимые функции. Отказ работы одного органа может вызвать ухудшение работы других органов. Плохая работа органов отрицательно сказывается на жизнеспособности всего организма и может привести к его гибели. По этой же причине, вероятно, нет успехов в лечении болезни Альцгеймера, когда использовали имплантацию в мозг эмбриональных клеток. По нашему мнению эмбриональ-

ные клетки не делятся и погибают из-за недостатка места занятого старыми клетками.

Все же попытки лечения разных заболеваний стволовыми или эмбриональными клетками предпринимаются постоянно. Клеточные трансплантации осуществляются при лечении болезней сосудов (инсульт, инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность, вегетососудистая дистония и др.), при поражении центральной нервной системы, болезни Паркинсона, заболеваниях крови (в т.ч. анемии), болезнях печени и почек. Сделаны попытки лечения иммунодефицитных состояний, рассеянного склероза, онкологических заболеваний, сахарного диабета, пороков развития (Чернилевский, 2004; Kawaguchi, Iseda., Nishio, 2004; Oh, 2005; Partridge, 2004; Rabinovich et al., 2003; Vitry et al., 2003). Установлено, что имплантация стромальных стволовых клеток в искусственно поврежденные ткани животных приводит к восстановлению этих тканей. Таким образом удавалось восстанавливать нервные клетки, кардиомиоциты, клетки эндотелия, гепатоциты. Считается, что стволовые клетки костного мозга могут транспортироваться через кровоток в другие ткани и давать начало клеткам соответствующего фенотипа. Такие стволовые клетки были обнаружены в крови больных с первичной гиперлипидемией и ишемической болезнью сердца и предполагается, что атеросклероз и проникновение клеток из костного мозга как-то могут быть связаны, т.к. на стенках больных сосудов обнаруживаются скопления из гемопоэтических и стромальных клеток. Причем, стромальные стволовые клетки присутствуют у людей с ишемической болезнью сердца, и их нет у здоровых. Это может означать, что стволовые клетки мобилизуются в костном мозге из-за



атеросклероза и транспортируются в места повреждений сосудов (Габбасов, Соболева, 2003).

Однако, использование клеточной терапии пока не приносит массовых успехов, а оптимизм зиждется на предположениях и предварительных результатах. Мы полагаем, что больших успехов на этом пути можно будет добиться, если учитывать открытые автором деградацию и гибель молодых клеток в окружении старых клеток. Таким образом, напрашивается вывод, чтобы стволовые клетки нормально работали и обновляли популяцию клеток органа или ткани, нужно найти способ удаления из органа или ткани старых, нефункционирующих клеток. Механизм разрушения клеток в старом организме по механизму апоптоза естественным образом, видимо, также не работает. Было бы неплохо попробовать запустить его искусственным способом.

Клеточная культура может быть моделью, которая позволяет проводить аналогии свойств, имеющих в культуре и в целом организме (Прохоров, 2004). Например, и в культуре и в организме со временем неделящиеся клетки постепенно умирают. Для длительного сохранения клеток в культуре и в организме необходимо устранять старые клетки, нежизнеспособные и не способные к делению, чтобы они освобождали место молодым клеткам. Нами высказано предположение о том, как в организме можно реализовать схему обновления клеточной массы (Прохоров, 2014). Чтобы клетки нормально работали и обновляли популяцию клеток органа или ткани, мы предполагаем использовать, ферменты или другие вещества способные разрушать связи между старыми клетками, между клетками и соединительной тканью, разрушать саму старую соединительную ткань. Это могут быть коллагеназа, трипсин, пепсин, эластаза, химотрипсин, лидаза, бромелайн, уже готовые препараты, например, такие как,

белковый экстракт из улитки *Helix aspersa* или препарат с энзимами тыквы. После того, как старые клетки будут удалены или разрушены, удалена или разрушена старая соединительная ткань, в это место можно вводить молодые полноценно функционирующие клетки, которые приживутся и будут способны восстановить функции старого органа или старой ткани.

## **О ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ВОЗМОЖНОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПИГМЕНТАЦИИ ВОЛОС В НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ПОСЕДЕНИЯ**

Считается, что седина – это вторичный признак старения, и она не влияет на продолжительность жизни, однако корреляция с возрастом все-таки имеется и довольно высокая (Keogh, 1965). Поседение волос всегда интересовало человечество. Большое количество людей, многие из которых женщины, стремятся предотвратить процесс поседения волос, особенно тогда, когда этот процесс только начинается. Основным способом устранения седины, в настоящее время, является окрашивание волос.

Наша задача — выявить потенциальную возможность восстановления пигментации волос в тех волосяных фолликулах, где она уже была утрачена, и в которых растущие волосы стали расти седыми.

Если присмотреться к волосам взрослого человека, у которого начинается процесс поседения, то можно увидеть, что большинство волос окрашены, а часть волос седые (белые), при этом, внимательное рассмотрение седых волос приведет нас к заключению, что все они седые целиком. Невозможно найти какой-нибудь волос

седой частично. Все седые волосы – седые (белые) полностью от корня. На седом волосе нет участка с окрашенной поверхностью. Очень редко можно найти волос седой снизу от корня и пигментированный сверху, что говорило бы о постепенном начале поседения. За 12,5 лет исследований обнаружен только один волос на бровях, который был наполовину седой от корня и пигментированный сверху.

Для большинства людей это открытие довольно странное. Кажется очевидным и логичным, что когда волос начинает седеть, то он должен сесть от корня, поэтому в начале он должен быть седой, а на конце – пигментированный. Однако этого не наблюдается. Отсюда возникает желание изучить такое явление и попытаться получить достоверный ответ на вопрос, седеет ли волос одновременно по всей длине или волос растет от корня седой, а часть волоса остается пигментированной (окрашенной).

После анализа литературных данных и собственных наблюдений, мы предлагаем несколько гипотез, которые могут объяснить это явление. Детальное исследование процесса поседения по каждой гипотезе может принести данные, которые позволят признать справедливой одну из них.

Мы предлагаем следующие гипотезы, которые одновременно являются и темами для исследования: 1) волос седеет целиком и сразу под влиянием **появления** какого-то фактора, синтезируемого в волосяном фолликуле, и разрушающего пигмент меланин; 2) волос седеет целиком и сразу в результате **утери** какого-то фактора, сохраняющего меланин; 3) окрашенный волос выпадает естественным образом и на его месте начинает расти седой волос, в результате включения механизма по типу гипотезы 1 или 2.

На наш взгляд, интересно было бы получить ответы и на другие вопросы.

○ Почему наблюдается разница в возрасте начала поседедения у людей одной расы?

○ Почему наблюдается разница (в среднем) начала поседедения у людей разных рас?

### **Краткая характеристика волос**

Волос по своему строению делится на ствол (видимая над поверхностью кожи часть волоса) и корень (часть волоса, расположенная в дерме, в корневом влагалище). Корень и корневое влагалище вместе образуют волосяной фолликул (Рис. 28, цветная вкладка).

Внутри ствола волоса находится мозговое вещество, среднее корковое вещество и кутикула. Мозговое вещество представляет собой не до конца ороговевшие клетки, корковое вещество – это ороговевшие клетки, в которых находятся пигменты, отвечающие за цвет волос (эумеланин или феомеланин). Эумеланин отвечает за черно-коричневый цвет, а феомеланин за желто-красный. Считается, что в разном соотношении эти пигменты придают волосам определенный цвет: коричневый, черный, блонд, рыжий, пепельный, а также их различные оттенки. Пигменты вырабатываются особыми клетками, которые называются меланоциты. Эти клетки располагаются внутри фолликула и прилегают к сосочку (Рис. 29, цветная вкладка).

Кутикула представляет собой несколько слоев клеток, напоминающих чешуйки, направленные от корня волоса к центру. Что касается волосяного фолликула (его еще называют луковицей), то это наиболее важная часть волоса, так как именно в корне волоса находятся клетки, которые, усиленно делясь, образуют сам волос, а также

множество сосудов, обеспечивающих питание волоса. К луковице примыкает волосяной сосочек, который содержит в себе кровеносные сосуды и отвечает за контроль состояния и роста волоса (Рис. 28, 29, цветная вкладка).

Волосяной сосочек крайне важен во всей волосяной системе, так как без него волос погибает (при этом если сосочек остается даже при вырывании волоса с корнем, то он обеспечит рост нового волоса). К волосяному фолликулу кроме сосочка, примыкают также сальные железы (количество желез может достигать 200 000, а количество вырабатываемого сала 50 г), потовая железа, а также поднимающая мышца. Работа сальных желез может зависеть от множества факторов: от питания, стадии менструального цикла, пола, возраста и так далее. Сальные железы весьма важны, так как с их помощью на поверхности кожи создается водно-липидная пленка, которая выполняет защитную функцию. Эта пленка состоит из отмерших клеток эпидермиса, секрета сальных и потовых желез и имеет слабокислую среду (которая препятствует размножению микроорганизмов). Также пленка обладает водоотталкивающим эффектом, предотвращает высыхание эпидермиса и защищает от вредного воздействия ультрафиолетовых лучей. Кроме всего прочего, в волосяном фолликуле содержится множество нервных волокон, которые тянутся от луковицы до эпидермиса.

Каждый волос существует от нескольких месяцев до 4 лет и более, затем выпадает и заменяется новым (Большая медицинская энциклопедия, 1976, т.4).

Поседение представляет собой обесцвечивание волос в результате утраты пигмента и заполнения их пузырьками воздуха. Поседение может быть частичным и общим, врожденным и приобретенным. Врожденное поседение –

стойкая непрогрессирующая депигментация отдельной пряди или пучка волос. Приобретенное поседение может быть старческим (сенильным) и преждевременным. Старческое поседение развивается после 40–50 лет и сопровождается возрастными изменениями кожи – снижением эластичности, сухостью, истончением, появлением морщин. Преждевременное поседение может возникнуть в 20–30 лет и ранее, в ряде случаев носит наследственный характер, но может быть обусловлено функциональным расстройством нервной и эндокринной систем, длительными истощающими заболеваниями, хронической интоксикацией и др. (Большая медицинская энциклопедия, 1976, т.20).

В 40–50 лет в среднем начинается возрастное поседение. Вначале седеют борода и усы. В 50–60 лет седеют волосы головы, в 60–70 лет – брови (Большая медицинская энциклопедия, 1976, т.4).

Выявлено, что существует много отличий между пигментированными и непигментированными волосами. Эти различия, как правило, более выражены внутри, чем на поверхности. Имеются различия в механических свойствах, в том числе устойчивости, поглощении влаги. В частности, седые волосы более сухие и менее эластичные (Kaplan et al., 2011). Проводили и другие исследования свойств пигментированных и непигментированных волос (Hollfelder et al., 1995).

Известно, что сам по себе волос не содержит живых клеток, поэтому даже при удалении его вместе с луковицей, клетки, генерирующие кератин, остаются в коже. Именно поэтому удаленный с корнем волос со временем может отрасти.

## Попытки лечения поседения

Для предотвращения преждевременного поседения показана укрепляющая терапия (препараты, содержащие фосфор, витамины В1, В6, В15, РР), возможная коррекция невротических и эндокринных расстройств. Лечение сенильного поседения проводят с меньшим успехом (Большая медицинская энциклопедия, 1976, т. 20).

В литературе встречаются описания экспериментов, в которых разрабатываются методы восстановления естественного цвета волос. В одной из статей отмечается, что с возрастом ухудшается функционирование волосяных фолликул, что ведет к замедлению роста волос, снижению их качества и поседению. Восстановление функционирования фолликул попытались сделать в Китае. Там изучали механизмы регенерации волосяного фолликула путем инъекций фолликулярных клеток, выделенных из мышиной кожи и получали положительные результаты (Sun et al., 2012).

Совершались попытки прямого воздействия на волосы с целью восстановления пигментации. Например, в одной из работ 45-летний мужчина был подвергнут множественной лекарственной терапии. Применяли ежедневно высокие дозы клофазимина. В связи с ожидаемым эффектом пигментации кожи пациент заметил потемнение седых волос. Этот цвет сохранялся восемь месяцев после лекарственной терапии (Philip et al., 2012).

В интернете можно прочитать несколько высказываний о причинах и способах предупреждения поседения. Так присутствует мнение, что «появление ранней седины может быть вызвано повышенной кислотностью и расстройством половых функций, диабетом и недостаточным снабжением сердца кровью, что ведет к

снижению рециркуляции в мелких капиллярах, питающих волосяные луковицы».

Также, например, люди считают, что «продолжительная болезнь, душевные переживания, постоянные заботы могут стать причиной поседения волос. Но одна из самых частых причин этого явления - возраст. Седые волосы выглядят тусклыми и безжизненными. Ни в коем случае не следует вырывать седые волосы. Каждый раз, вырывая седой волос, вы способствуете увеличению их количества. Это происходит потому, что корень у основания фолликула выделяет сыворотку, которая, просачиваясь на участке кожи вокруг волосяной сумки, заражает окружающие волосы. Если вам очень нужно избавиться от седого волоса, его следует осторожно срезать маленькими ножницами. Если седой волос вычесывается, то незачем сильно беспокоиться, так как он уже слабый и не может удержаться в волосяной сумке».

Мы считаем, что последнее является недостаточно обоснованным утверждением и заблуждением, что будет видно из проведенных нами экспериментов. Основной задачей наших исследований является выяснение возможности восстановления пигментации волос и восстановления их естественного цвета после начала поседения.

### **Авторская методика регенерационной активации для восстановления окрашивания седых волос**

Метод регенарационной активации подробно описан в предыдущих работах автора (Прохоров, 2015, 2016б). Осматривали волосы на голове пациента с применением увеличительного стекла, выявляли отдельные седые волосы и с помощью косметического пинцета удаляли их.



Волосные фолликулы в некоторых случаях обрабатывали фиторастворами (настои или отвары листьев и цветов крапивы двудомной и некоторых других растений) на воде, на слабых концентрациях уксусной кислоты или на этиловом спирте. В течение всего эксперимента среди удаленных седых волос выявляли частично седые волосы, т.е. окрашенные от корня и седые сверху, что означает начало восстановления пигментации. Такие частично окрашенные волосы имеют естественный первоначальный цвет неседых волос на некотором протяжении, начиная от корня и частично седые сверху (Рис. 30–33, цветная вкладка). Наличие подобных волос означает, что восстановление пигментации происходит не сразу после начала роста нового волоса вслед за удалением «старого», а через некоторое время. Подробнее это будет обсуждаться ниже. Такие частично окрашенные волосы сохраняли для фотографирования и изучения. Фотографировали цифровым фотоаппаратом с разрешением 7,2 Мп. Использовали также микроскоп Биолам с видеосистемой, подключенной к компьютеру. Велся компьютерный учет всех удаленных седых волос с разными характеристиками с использованием программы Excel. Заполняли соответствующие таблицы и строили необходимые графики. Исследования проводились более 12,5 лет и продолжаются в настоящее время.

## **Результаты**

Ранее автор начал разрабатывать общую теорию борьбы со старением (Прохоров, 2004), которая получила развитие в последующих публикациях автора и в более завершенном виде представлена в данной книге в разделе «Общая теория омоложения организма». В соответствии с теорией, была предпринята попытка использовать ее

принципы для установления потенциальной возможности восстановления пигментации седых волос. Частичный успех этого могут подтвердить несколько фотографий на рис. 30–33 (Цветная вкладка).

Одним из главных аспектов теории омоложения является устранение старых клеток и клеточных структур, старых тканей и пр., после чего требуется активация и увеличение числа жизнеспособных молодых клеток (см. разделы «Радикальное увеличение продолжительности жизни ...», «Общая теория омоложения...» и статью: Прохоров, 2004). Выполнив такие действия для волосяных фолликул, вероятно, возможно возобновить процесс естественного окрашивания волос, хотя требуются дальнейшие исследования. Надо иметь ввиду, что после проведения соответствующих процедур окрашиваются не первоначально седые волосы, а те, которые начинают расти вновь из фолликул после удаления из них седых волос.

Методику применяли в течение более 12,5 лет и ее эффективность, по оценкам автора, приближается к 97%. Из волосяных фолликул после удаления седых волос и последующей обработки фиторастворами начинают расти окрашенные волосы естественного цвета, свойственного волосам до поседения (Прохоров, 2015а, 2016б).

На рис. 30 (Цветная вкладка) показаны 2 волоса, у которых восстановился процесс пигментации и растущие волосы начали окрашиваться от корня по мере роста.

На рисунках 31а и 31б (Цветная вкладка) в верхних частях фотографий показан обычный седой волос, а в самом низу обычный полностью неседой волос. Второй сверху на рис. 31а, а также второй и третий сверху на рис. 31б – это волосы, которые стали расти в фолликулах, из которых были удалены седые волосы, а вновь растущие волосы стали окрашиваться в первоначальный цвет,

свойственный им до поседения. При этом второй сверху волос на рис. 31б окрашен слабее, чем третий сверху. Это значит, что восстановление пигментации в нем произошло в меньшей степени, чем в третьем.

На рис. 32 и 33 (Цветная вкладка) показаны примеры таких же волос, у которых началось восстановление пигментации после применения методики регенерационной активации и вновь растущие седые волосы через некоторое время после начала применения методики (через 1–5 сут.) начали окрашиваться от корня.

Таких частично восстановленных волос за все время исследований выявили более 130. Всего же за 12,5 лет методика применена к более чем 2,5 тысяч фолликул, в которых росли седые волосы, в результате чего произошло восстановление пигментации вновь начинающих расти волос из этих фолликул. По нашим оценкам среди 2,5 тыс. вновь начавших расти волос окрашивание восстановилось примерно в 97% случаев. Частота появления седых волос за эти годы достигла значений от 0,5–0,6% до 2,5–3,5% в месяц от общего числа волос в зависимости от места локализации и, возможно, в некоторых местах стабилизировалась.

## **Заключение**

Результаты исследования находятся в русле идей автора о том, что для омоложения тканей и органов организма необходимо устранять старые клетки и структурные элементы соединительной ткани и др., чтобы обеспечить молодым и жизнеспособным клеткам возможность деления и осуществления ими нормального функционирования и восстановления утраченных при старении функций того или иного органа или ткани (Прохоров, 1999, 2002а, 2004, 2014, 2015а, 2015б, 2016а, 2016б;

Прохоров, Згурский, 2005). Это необходимо делать и для восстановления пигментации волос. Показано, что устранение старого седого волоса и связанных с ними старых структур, а также последующая активация синтеза меланина может привести к восстановлению пигментации вновь начинающего расти волоса. Все же промышленного применения такой способ перспективы скорее всего не имеет из-за болезненности метода для пациента и представляет в основном теоретический интерес. Чтобы способ имел перспективы широкого и повсеместного применения требуются дальнейшие исследования и нахождения способов стимуляции регенерационных процессов для восстановления пигментации без применения неприятных и болезненных процедур.

## **ОБЩАЯ ТЕОРИЯ ОМОЛОЖЕНИЯ ОРГАНИЗМА**

Исходя из приведенных выше экспериментальных данных и литературных сведений, автор сформулировал общую теорию омоложения организма, которая поможет сделать практические шаги для действительно существенного омоложения и радикального продления жизни людей.

При разработке теории автор пришел к выводу: для того чтобы разобраться, что такое старение, можно ли им управлять и тем более замедлить или остановить этот неблагоприятный процесс, надо начинать с самых основ организма, с его состава, сущности и его развития от зиготы до взрослого состояния и старения. В соответствии с этим были сформированы основные базисные тезисы (постулаты).

1. Организм состоит в основном из клеток.

2. Все органы состоят из клеток.
3. Логично, если мы омолодим все клетки одного органа, то он будет молодым.

4. Если мы поступим так со всеми органами и тканями организма, т.е. омолодим все органы и ткани, то напрашивается вывод, что и весь организм станет молодым (Прохоров, 1999в, 2002а, 2004, 2015а, 2016а).

Таким образом, суть теории заключается в нескольких фундаментальных положениях.

1. Часть клеток надо выделить из органа или ткани и преобразовать их *in vitro* так, чтобы они приобрели способность к неограниченному числу делений путем ввода гена теломераза.

2. Старые или нефункционирующие клетки необходимо удалить для освобождения места молодым клеткам.

3. В органы или ткани, в которых удалены старые клетки надо вводить молодые (теломеризованные) клетки, с неограниченным потенциалом деления.

4. В соединительной ткани, вегетативно сосудистой и нервной системах, в которых отсутствует деление клеток или их деление ограничено, необходимо также удалять деградирующие части и заменять их на новые или омоложенные (восстановленные) части.

Почему теория «общая»? Потому, что она может распространяться не только на человека, но и на все живые организмы, при условии определенной ее модернизации к конкретному виду.

### **Основные доказательства теории.**

#### **Целостные организмы.**

*Гидра Фуска.* Она может жить в аквариуме в теплой воде неограниченное время и размножается почкованием.

Это происходит благодаря тому, что в середине ее тела имеются стволовые клетки с неограниченным потенциалом деления, которые постоянно делятся. Эти клетки постепенно специализируются, перемещаются по телу животного к его концам, стареют, деградируют и слущиваются в окружающую среду. Т.е. старые клетки устраняются и замещаются на молодые, иначе говоря происходит постоянный обмен клеток на новые (Brien, 1965a,b; Martinez, 1998; Shaible et al., 2015).

*Амеба.* Исследователи проводили такой опыт с амебой – ей не давали делиться путем «откусывания» от нее части мембраны. В результате этого амеба должна была тратить время на восстановление утраченной части мембраны, чтобы приступить к делению. После того, как амеба достраивала утраченную часть мембраны, исследователи вновь «откусывали» какую-то часть мембраны и процесс повторялся. Так можно было делать многократно. В результате амеба не делилась, но жила неограниченной время и не умирала (Гартман, 1936).

*Регенерация пигментации после удаления седого волоса с прилегающими старыми структурами* (Раздел книги «О потенциальной возможности восстановления пигментации волос ...»; Прохоров, 2016б). Эксперименты показали, что устранение старых клеточных структур, т.е. фактическое освобождение места для жизнеспособных клеток, вызывает в ответ на это пролиферативную активность оставшихся еще живых клеток меланоцитов, восстановление синтеза меланина и окрашивание волос в первоначальный цвет до поседения. Применение фиторастворов может усилить этот процесс.

### **Культуры клеток.**

*Эксперименты на культурах трансформированных клеток китайского хомячка, раковых клетках человека линии HeLa* (Прохоров, 1999в, 2014, 2015а, 2016а). В этих

экспериментах показано, что устранение старых клеток из флаконов позволяет делиться оставшимся живым клеткам, тем самым дает возможность неограниченной ПЖ всей культуры.

*Эксперименты на диплоидных фибробластах человека с теломеразой* (Егоров и др., 2003; Vodnar et al., 1998). Эксперименты показали, что ввод гена теломеразы в клетки приводит к постоянному синтезу фермента теломеразы и они приобретают способность неограниченного деления.

### **Растения**

*Тополь* – растение с неограниченным ростом. Верхнюю часть старого тополя можно срезать, пересадить в землю и этот росток вновь будет расти и станет взрослым деревом. При этом старая часть дерева отмирает. Такие операции можно делать неограниченное число раз и получится, что одно и то же дерево растет неограниченное время, т.е. имеет неограниченную ПЖ. Таким образом совершается периодический процесс обновления. Аналогично могут расти и другие растения, которые можно размножать черенками (вегетативно): *яблоня, смородина, крыжовник, верба, виноград и др.*

*Смородина, крыжовник, виноград, роза, сирень, фундук, карликовые сорта яблонь* могут размножаться отводками (укоренившиеся, но не отсоединенные от материнского растения ветки). Способ помогает ветке укорениться и начать самостоятельную жизнь. Новое молодое растение становится продолжением старого, которое (старое) постепенно отмирает. Омоложенная часть растения развивается во взрослое, от которого также можно сделать отводку и т.д. Получается, что одно и то же растение живет неограниченное время.

## Способы реализации теории.

1. Старые или не функционирующие клетки, а также старую соединительную ткань необходимо удалять из старого органа или ткани для освобождения места молодым клеткам.

2. Часть живых клеток необходимо забирать из органа или ткани для последующего культивирования в искусственных условиях.

3. Культивируемые живые клетки следует преобразовать так, чтобы они приобрели способность неограниченно делиться путем ввода в их ДНК гена теломераз.

4. В искусственных условиях размножить число теломеризованных клеток и ввести обратно в старый или больной орган или ткань, из которых они были изъяты.

5. В некоторых случаях можно удалять весь нефункционирующий старый орган и заменять его на искусственный, выращенный или изготовленный в лабораторных условиях.

6. Соединительную ткань, вегетативно сосудистую и нервную систему, где отсутствует деление клеток или оно ограничено, необходимо также обновлять (омолаживать), т.е. удалять старые части и заменять на новые (молодые).

7. В будущем, возможно, помогут методы нанотехнологий, которые после совершенствования позволят уже на генетическом уровне исправлять геном каждой клетки внутри органов и всего организма в нужном нам направлении (без изъятия живых клеток и культивирования их в искусственных условиях), и одновременно удалять старые нефункционирующие клетки, старые ткани и другие, что позволит более безболезненно для человека достичь неограниченной продолжительности жизни, и сохранения при этом



молодого внешнего вида, и внутреннего содержания организма.

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ**

В главе «Радикальное увеличение продолжительности жизни путем замены клеток» описывался метод восстановления старых органов путем устранения из них старых клеток и ввода в них размноженных собственных омоложенных клеток с встроенным геном теломеразы. Однако бывают ситуации, когда орган разрушен настолько сильно, что его невозможно восстановить и требуется полная замена. Для этого также можно использовать клеточные технологии. Замечательный пример – замена части **трахеи**. Такие операции пока единичные, т.к. методика только отрабатывается. Вначале изготавливается каркас будущего органа из нанокompозитного материала, который представляет собой копию трахеи пациента. Затем этот каркас помещают в биореактор с ростовой средой и на него высаживают клетки, выделенные из костного мозга самого больного. После того, как клетки прикрепятся к каркасу они начинают делиться, постепенно преобразуются в трахейные клетки, продуцируют различные элементы соединительной ткани, что в конце концов приводит к образованию поверхности, характерной для поверхности трахеи. Т.к. используются собственные клетки пациента, то после операции организм не отторгает новый орган (Рис. 34, цветная вкладка).

Автором методики и человеком, который провел первую операцию по пересадке искусственно выращенной трахеи является доктор, профессор регенеративной

хирургии Каролинского института Швеции Паоло Маккиарини. Из-за сложности операции она длилась 12 часов. За это время выполнили иссечение и удаление всей рубцовой ткани, удалили часть гортани, после чего в образованную полость поставили трахею. При этом потребовалась большая осторожность, т.к. рядом с трахеей находятся голосовые связки.

В России также делают попытки проводить подобные операции. Первые из них предполагают выполнить в Краснодаре на людях, имеющих травмы трахеи. Предпринятые ранее операции не принесли им облегчения, но предстоящая трансплантация должна привести к выздоровлению и улучшению качества жизни.

Кроме того, на животных испытывают искусственно выращенные **пищевод** и **диафрагму** и планируют работы по выращиванию **сердца**.

Применяются клеточные технологии и для изготовления других целых органов или их частей. Например, выращивают **кожу** для восстановления поврежденных во время пожара участков тела или испытания действия косметических препаратов (Рис. 35, цветная вкладка), части **хрящей** для восстановления подвижности суставов, **части роговицы и уретры**. В 2004 г. в Киотском университете Японии начали выращивать **кровеносные сосуды**, а в 2006 г. в университете Миннесоты США из стволовых клеток удалось вырастить первые **клетки мышц**.

В Германии нескольким детям успешно пересадили **клапаны сердца**, выращенные на каркасе из свиного сердца. При этом оказалось, что у некоторых детей клапаны начали расти одновременно с ростом сердца. В США искусственный **мочевой пузырь** пересадили уже более чем 15 больным.

В Финляндии была изготовлена **верхняя челюсть** человека из фосфата кальция, на которую поместили его стволовые клетки. После прикрепления этих клеток к основанию, протез разместили в брюшной полости самого пациента, там зашили и оставили на 9 месяцев. За это время имплант покрылся клетками и соединительной тканью, его извлекли и поставили вместо удаленной, больной раком челюсти.

Не менее важны для пересадки такие органы, как **печень** и **почки**. Однако здесь исследователи столкнулись с трудностями, которые пока не удалось преодолеть. Несмотря на то, что сама методика клеточной технологии позволяет вырастить на каркасе тот или другой орган, но после помещения их в организм они через короткое время переставали работать. Все же исследования продолжаются и в России на животных, к этому времени уже получены первые положительные результаты. Была выращена **часть печени**, которую затем подсадили в печень животного и пересаженная часть также стала функционировать.

В той или иной степени успешности выращены имплантанты **зубов, костей, носа, ушей, сетчатки глаза**. Делаются попытки восстановить **нервные клетки** головного мозга и на периферии.

Дополнительные возможности в России получили исследователи с принятием в 2017 году закона «О биомедицинских клеточных продуктах». Он позволит регулировать и сертифицировать деятельность по производству биологических медицинских клеточных продуктов.

## ЛИТЕРАТУРА

Альперович В.Д. Геронтология. Старость. Социокультурный портрет. М.: «Издательство Приор», «Экспертное бюро», 1998. 272 с.

Большая медицинская энциклопедия. М.: Советская энциклопедия, 1976. Т. 4. 576 с.

Большая медицинская энциклопедия. М.: Советская энциклопедия, 1976. Т. 20. 560 с.

Габбасов З.А., Соболева Э.Л. Стромальные стволовые клетки взрослого организма – резерв восстановительной хирургии // Клиническая геронтология. 2003. Т. 9. №5. С. 20–25.

Гартман М. "Общая биология". М.: Биомедгиз, 1936. 394 с.

Дильман В.М. Большие биологические часы. Введение в интегральную медицину. М.: Знание, 1986. 256 с.

Егоров Е.Е., Терехов С.М., Вишнякова Х.С., Караченцев Д.Н., Казимирчук Е.В., Цветкова Т.Г., Вейко Н.Н., Смирнова Т.Д., Макаренков А.С., Эльдаров М.А., Мещерякова Ю.А., Ляпунова Н.А., Зеленин А.В. Теломеризация как метод получения иммортализованных клеток человека, сохраняющих нормальный фенотип // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 3. С. 183–192.

Епифанова О.И., Терских В.В., Полуновский В.А. Покоящиеся клетки. М.: Наука, 1983. 180 с.

Згурский А.А. Применение аутогенных фибробластов в косметологии // Эстетическая медицина. Брошюра, 2004. 4 с.

Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомбе Ю., Тофт К., Ласк Г., Ревазова Е. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2000. Т. 130. № 8. С. 203–206.

Крихели Э.А., Згурский А.А., Терехов С.М. Применение аутогенных фибробластов в косметологии // Эстетическая медицина. 2004. Т. 3. № 4. С. 336–342.

Молочков В.А., Шабалин В.Н., Кряжева С.С., Романенко Г.Ф. Руководство по геронтологической дерматологии. М.: МОНИКИ, 2005. 360 с.

Никитин В.Н. Экспериментальные подходы к продлению жизни // Итоги науки и техники. Серия: общие проблемы биологии. Биологические проблемы старения. М.: ВИНТИ, 1984. Т. 4. С. 6–43.

Обухова Л.К., Эмануэль Н.М. Молекулярные механизмы замедления старения антиоксидантами // Итоги науки и техники. Серия: общие проблемы биологии. Биологические проблемы старения. М.: ВИНТИ. 1984. Т. 4. С. 44–80.

Оловников А.М. Недорепликация ДНК на краю матрицы (маргинотомия) и проблемы развития организмов // В сб.: Проблемы биологии старения. М.: Наука, 1983. С. 40–48.

Оловников А.М. Почему нормальные диплоидные клетки умеют считать число пройденных *in vitro* удвоений? Компьютены и дифферотены – структуры, вовлеченные в процесс счета делений, их сходство и различие // В сб.: Биологические проблемы старения и увеличения продолжительности жизни (Материалы конференции МОИП, 1985 г.). М.: Наука, 1988. С. 32–39.

Прохоров Л.Ю. Генетический подход к проблеме роста и старения организма. Доклад в МОИП 27.01.1984. Препринт. М., 1984. 18 с.

Прохоров Л.Ю. Параметры роста и развития млекопитающих, клеточная пролиферация в культуре и максимальная продолжительность жизни // Онтогенез. 1999а. Т. 30. № 3. С. 176–187.

Прохоров Л.Ю. Оценка связи некоторых параметров, зависящих от пролиферативной активности клеток, с продолжительностью жизни «стационарно стареющих» культур и с максимальной продолжительностью жизни млекопитающих // Цитология. 1999б. Т. 41. № 10. С. 900–913.

Прохоров Л.Ю. Моделирование старения на стационарных клеточных культурах. Дис. ... канд. биол. наук. М., 1999в. 152 с.

Прохоров Л.Ю. Скорость пролиферации, метаболизм и продолжительность жизни. Деп. в ВИНТИ 04.10.2000 г. N 2545–В00. М., 2000. 28 с.

Прохоров Л.Ю. Существует ли альтернатива смерти? Реальные и перспективные способы продления жизни // Доклады МОИП. Общая биология. 2001. Московское общество испытателей природы. Деп. в ВИНТИ 28. 06. 2002 г. № 1206–В 2002. М., 2002а. С. 54–58.

Прохоров Л.Ю. Параметры роста и развития рыб, земноводных, пресмыкающихся и птиц, клеточная пролиферация в культуре и максимальная продолжительность жизни. Деп. в ВИНТИ 12.04.2002 № 678–В2002. М., 2002б. 39 с.

Прохоров Л.Ю. Можно ли остановить старение? // Доклады МОИП. Общая биол. Деп. в ВИНТИ 11.10.2004 г. № 1585–В2004. М.: МОИП, 2004. С.18–27.

Прохоров Л.Ю. Перспектива использования стволовых клеток для увеличения продолжительности жизни человека // Доклады МОИП (К 200-летию со дня основания МОИП). М.: ООО "Графиком-принт". 2005. Т. 36. С. 117–118.

Прохоров Л.Ю. О долговременном культивировании клеток без пересева // Клиническая геронтология. 2014. Т. 20. № 9–10. С. 96–97.

Прохоров Л.Ю. Сопоставление способов замещения старых клеток на молодые в организме и в культуре клеток, растущей без классического пересева // Клиническая геронтология. 2015а. Т. 21, № 11–12. С. 100–101.

Прохоров Л.Ю. Попытки восстановления естественного цвета волос в начале возрастного поседения. Деп. в ВИНТИ 20.11.2015 N 193–В2015. М., 2015б. 19 с.

Прохоров Л.Ю. Роль замены клеток в методиках по увеличению продолжительности жизни // Клиническая геронтология. 2016а. Т.22. № 9–10. С. 62–63.

Прохоров Л.Ю. О потенциальной возможности восстановления пигментации волос в начальной стадии поседения // Клиническая геронтология. 2016б. Т. 22. № 9–10. С. 61–62.

Прохоров Л.Ю., Згурский А.А. Пути применения соматических и стволовых клеток для омоложения и восстановительной терапии тканей и органов человека // Доклады МОИП (К 200-летию со дня основания МОИП). М.: ООО "Графиком-принт", 2005. Т. 36. С. 119–121.

Равин В.К. Молекулярная биология и генетика нематоды *Caenorhabditis elegans* // Итоги науки и техники, сер. Молекуляр. биол. Перспективные объекты биол. М.: ВИНТИ, 1984. Т. 20. С. 5–64.

Руководство по геронтологии. Колл. авторов / Под ред. академика РАМН, профессора В.Н. Шабалина. М.: Цитадель-трейд, 2005. 800 с.

Стреллер Б. Время, клетки и старение. М.: Мир, 1964. 272 с.

Терехов С.М. Клональный анализ при изучении наследственной патологии // Автореферат дис. ... канд. биол. наук. М.: АМН СССР, 1984. 22 с.

Фролькис В.В., Мурадян Х.К. Экспериментальные пути продления жизни. Л.: Наука, 1988. 247 с.

Чернилевский В.Е. Роль стволовых клеток в самообновлении организмов и возможности продления жизни // Профилактика старения. 2004. Вып. 6. С.1–9.

Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // Итоги науки и техники. Серия: Общие проблемы физико-химической биологии. М.: ВИНТИ, 1988. Т. 9. С. 5–174.

Хрисанфова Е.Н. Основы геронтологии (Антропологические аспекты): Учеб. для студ. высш. учеб. заведений. М.: Гуманит. Изд. Центр ВЛАДОС, 1999. 160 с.

Augenlicht L.H., Baserga R. Changes in the G<sub>0</sub> state of WI-38 fibroblasts at different times after confluence // Exp. Cell. Res., 1974. V. 89. P. 255–262.

Biology Data Book., vol.2. Altman P.L., Dittmer D.S. Federation of American Societies for Experimental Biology. Bethesda. 1973.

Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells // Science. 1998. Vol. 16. № 279 (5349). P. 349–352.

Boss W.K., Usal H., Chernoff G. et. al. Autologous cultured fibroblasts as sellular therapy in plastic surgery // Clinics in plastic surgery. 2000. Vol. 27. № 4. P.613.

Brien P. Considérations á propos de la reproduction sexuel des invertébrés // L'Année Biologique. 1965 a. Vol. 4. №. 5–6. P. 329–365.

Brien P. L'embryogénèse et la sénescence de l'Hydre d'eau douce (Hydra fusca (oligactis) Pallas) // Mémoires de l'Académie Royale de Belgique, Classe des sciences. 1965 b.Vol. 36. №.1. P.1–113.



Calder W.A. The comparative biology of longevity and lifetime energetics // *Experimental Gerontology*. 1985. Vol. 20. P. 161–170.

Cutler R.G. Evolutionary biology of aging and longevity in mammalian species // *Aging and cell function*. Ed. J.E. Johnson, Jr., N.Y.- London, Plenum Press, 1984. P. 1–147.

Evans C.H. Is the A ( $G_0$ ) state time – independent? // *J. Theor. Biol.* 1979 a. Vol. 79. P. 259–262.

Evans C.H. On the aging of organisms and their cells // *Med. Hypothesis*. 1979 b. Vol. 5. P. 53–66.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. // *Exp. Cell Res.* 1965. Vol. 37. № 3. P. 614–636.

Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1961. Vol. 25. № 3. P. 585–621.

Hollfelder B., Blankenburg G., Wolfram L.J., Höcker H. Chemical and physical properties of pigmented and non-pigmented hair ('grey hair') // *Int. J. Cosmet. Sci.* 1995. Vol. 17. № 2. P. 87–89.

Hu Z., Ulfendahl M., Olivius N.P. Survival of neuronal tissue following xenograft implantation into the adult rat inner ear // *Exp. Neurol.* 2004, Vol. 185. № 1. P. 7–14.

Kaplan P.D., Polefka T., Grove G., Daly S., Jumbelic L., Harper D., Nori M., Evans T., Ramaprasad R., Bianchini R. Grey hair: clinical investigation into changes in hair fibres with loss of pigmentation in a photoprotected population // *Int. J. Cosmet. Sci.* 2011. Vol. 33. № 2. P. 171–182.

Kawaguchi S., Iseda T., Nishio T. Effects of an embryonic repair graft on recovery from spinal cord injury // *Prog. Brain Res.* 2004. Vol. 143. P.155–162.

Keogh E.V., Walsh R.J. Rate of greying of human hair // *Nature*. 1965. Vol. 207. P. 877–878. Цит. по: Лэмб М. Биология старения. М.: Мир, 1980. 206 с.

Martinez, D.E. Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Experimental Gerontology*. 1998. Vol. 33. № 3. P. 217–225.

Oh H. New era of cardiac stem cells therapy in heart failure // *Rinsho. Byori*. 2005. Vol. 53. № 1. P. 61–69.

Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* 1973. Vol. 41. № 1. P. 181–190.

Partridge T.A. Stem cell therapies for neuromuscular diseases // *Acta. Neurol. Belg.* 2004. Vol. 104, № 4. P. 141–147.

Parsons P.A., Spence G.E. Ethanol utilization: threshold differences among three *Drosophila* species // *Am. Nat.* 1981. Vol. 117. P. 568–571.

Pasternak C.A. The cell surface in relation to the growth cycle // *J. Theor. Biol.*, 1976. Vol. 58. P. 365–382.

Philip M., Samson J.F., Simi P.S. Clofazimine-induced Hair Pigmentation // *Int. J. Trichology*. 2012. Vol. 4. № 3. P. 174–175.

Rabinovich S.S., Seledtsov V.I., Poveschenko O.V., Senuykov V.V., Taraban V.Y., Yarochno V.I., Kolosov N.G., Savchenko S.A., Kozlov V.A. Transplantation treatment of spinal cord injury patients // *Biomed. Pharmacother.* 2003. Vol. 57. № 9. P. 428–433.

Segal J. Aging: a non-regulated process // *Medical Hypotheses*. 1988. Vol. 25. P. 197–207.

Schaible R., Scheuerlein A., Daňko M.J., Gampe J., Martínez D.E., Vaupel J.W. Constant mortality and fertility over age in Hydra // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. Vol. 22. № 112 (51). P. 15701–15706.

Sun X.J., Hu Z.Q., Miao Y. Hair follicle regeneration by injection of follicular cells // *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2012. Vol. 28. № 1. P. 44–49. [Article in Chinese].

Vitry S., Bertrand J.Y., Cumano A., Dubois-Dalcq M. Primordial hematopoietic stem cells generate microglia but not myelin-forming cells in a neural environment // J. Neurosci. 2003. Vol. 23. № 33. P. 10724–10731.

Watson D., Keller G.S., Lacombe V., Fodor P.B., Rawnsley J., Lask G.P. Autologous fibroblasts for treatment of facial rhytids and dermal depressions. A pilot study // Arch. Facial. Plast. Surg. 1999. Vol. 1. № 3. P. 165–170.

Weiss R.A., Weiss M.A., Beasley K.L., Munavalli G. Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial // Dermatol. Surg. 2007. Vol. 33. № 3. P. 263–268.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор благодарит генерального директора ООО «Медбиокор», к.б.н. Александра Александровича Згурского за предоставленные фотографии и статьи по клеточной терапии.

## **СПИСОК ТЕРМИНОВ**

Аллогенные фибробласты – клетки кожи другого организма.

Аутологичные фибробласты – клетки кожи собственного организма.

Аутогенные фибробласты – то же, что аутологичные фибробласты.

Бестимусные мышцы – мышцы, у которых отсутствует иммунитет.

Биопсия кожи – срез небольшого участка кожи размером примерно 0,1 – 0,5 см<sup>2</sup>.

Бромелайн – протеолитический фермент, получаемый из плодов и листьев ананаса, по действию сходен с трипсином и пепсином, необходим для улучшения переваривания белка.

Вегетативная нервная система – часть нервной системы, обеспечивающая деятельность внутренних органов, регуляцию сосудистого тонуса, иннервацию желез, трофическую иннервацию скелетной мускулатуры, рецепторов и самой нервной системы.

Версен – раствор этилен диамин тетрауксусной кислоты (ЭДТА) и неорганических солей для разрушения белковых мостиков, соединяющих клетки с ростовой поверхностью флакона или чашки Петри.

Геронтология – наука о старении.

Гиалуриновая кислота – естественный компонент кожи, делающий ее упругой и увлажненной, поэтому она не вызывает аллергии и каких-либо осложнений при ее введении.

Гидратируемость – насыщаемость кожи водой.

Гиперемия – местное увеличение количества крови при усиленном притоке ее к какому-либо органу или участку ткани, или затрудненном ее оттоке.

Дерма – средний слой кожи.

Жировая клетчатка – слой кожи, содержащий жировые клетки.

Иннервация – обеспечение нервами и, следовательно, связью с центральной нервной системой органов, областей и частей тела.

Кардиомиоциты – мышечные клетки сердца.

Коллаген и эластин – сложные молекулы, обеспечивающие эластичность и упругость кожи.

Кожа – защитный слой организма, защищающий его от внешней среды, состоит из нескольких слоев:

- верхний слой – защитный – эпидермис;

- под ним – слой соединительной ткани, содержащий коллагеновые, эластиновые и ретикулярные волокна, а также клетки – фибробласты;

- под этим слоем жировая прослойка, содержащая жировые клетки и кровеносные сосуды.

Коллагеназа – фермент, расщепляющий молекулы коллагена.

Контактное торможение – прекращение деления клеток, когда их становится много и они касаются друг друга.

Криохранилище – сосуд для хранения замороженных клеток в жидком азоте при температуре 196 °С.

Культура клеток – большое число клеток (как правило, несколько десятков тысяч, а чаще сотен тысяч или миллионов клеток), растущих в одном или нескольких стерильных культуральных флаконах.

Культуральный флакон – пластмассовый или стеклянный флакон с плоским дном, в котором растут клетки.

Ламинарный шкаф – небольшой металлический шкаф закрытый с трех сторон стеклами для работы с клетками, в который вентилятором через стерилизующий воздушный фильтр, расположенный сзади или сверху, нагнетается стерильный (очищенный от бактерий) воздух.

Мезенхима – зародышевая соединительная ткань большинства многоклеточных животных и человека. Из мезенхима образуются собственно соединительная ткань, кровеносные сосуды, главные мышцы, висцеральный скелет, пигментные клетки и нижний слой соединительнотканной части кожи.

Меланоциты – клетки волосяных луковиц, вырабатывающие мелатонин – пигмент, окрашивающий волосы.

Монослойные культуры клеток – клетки, лежащие в один слой вплотную друг к другу.

Онкогенная потенция – способность к образованию рака.

Пепсин (др.-греч. πέψις – пищеварение) – протеолитический фермент класса гидролаз, вырабатываемый главными клетками слизистой. Пепсин расщепляет почти все белки животного и растительного происхождения.

Пипетка – стеклянная или пластмассовая трубка для забора и перенесения различных жидкостей (ростовой среды, сыворотки, растворов трипсина, версена, антибиотиков и т.д.).

ПЦР – полимеразная цепная реакция – метод размножения одинаковых отрезков ДНК.

Пролиферация – деление клеток.

Пролиферативный потенциал – способность клеток к определенному числу делений.

Протеазы – ферменты, расщепляющие белки.

Ригидность – (лат. *Rigidus* — жёсткий, твёрдый) – жёсткость, твёрдость, неэластичность; в физиологии – резкое повышение тонуса анатомических структур и их сопротивляемости деформированию.

Соединительная ткань – совокупность коллагеновых и эластиновых волокон с фибробластами.

СО<sub>2</sub>-инкубатор – специальный плотно закрывающийся металлический шкаф, в котором поддерживаются постоянная температура (обычно 37°C) и содержание углекислого газа (обычно 5–7%).

Суспендирование – активное перемешивание ростовой среды с клетками при помощи пипетки для создания однородной взвеси.

Трипсин – фермент, расщепляющий белковые мостики между клетками.

Тургор – способность сохранения формы кожи после деформации.

Чашка Петри – стеклянная (или пластмассовая) чашка с вертикальными боками, которая закрыта сверху такой же стеклянной (пластмассовой) чашкой с такими же вертикальными боками, но большего диаметра.

Фибробласт – клетка кожи.

Фиброциты – клетки, в которые превращаются фибробласты в результате дифференцировки - менее активные зрелые клетки.

Физраствор – 0,9%-й раствор поваренной соли в дистиллированной воде.

Фотостарение – старение под воздействием солнечного света.

Энтеросорбенты – лекарственные средства, способные связывать и удерживать в себе различные токсины, аллергены или ядовитые вещества.

In vitro – культивирование клеток в культуральных флаконах (вне организма).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МПЖ – максимальная продолжительность жизни

ПЖ – продолжительность жизни.

ППЖ – предстоящая продолжительность жизни.

СПЖ – средняя продолжительность жизни.

ЭДТА – этилен диамин тетрауксусная кислота (см. Версен).

**Prokhorov, Leonid Yu.**

**Is it possible to overcome aging? Today and tomorrow cell therapy / Leonid Yu. Prokhorov.** – Moscow : MAKS Press, 2017. – 104 p.

The book describes the methods of modern cell biology that can be applied for rejuvenation of human skin using his own cells. It briefly discusses the symptoms of aging, characteristics of the human skin and causes of skin aging, methods of obtaining and culturing autologous (self) skin fibroblasts, the procedure of cell therapy, the results of the application of autologous fibroblasts. The book shows the need for long-term storage of cells in frozen form at low temperatures (-196°C) in liquid nitrogen. It is anticipated that cell therapy can be used not only for skin rejuvenation but also to restore old or diseased organs, which will significantly increase the duration of human life.

This book also discusses some advances in cellular technology which, when implemented, will help to significantly improve rejuvenation of the skin of a person, as well as of other tissues and organs.

*Key words:* longevity, rejuvenation, cell therapy, artificial organs, telomerase, old cells, young cells.

---

*Научное издание*

ПРОХОРОВ Леонид Юрьевич

**ВОЗМОЖНО ЛИ ПРЕОДОЛЕТЬ СТАРЕНИЕ?  
Сегодня и завтра клеточной терапии**

Отпечатано с готового оригинал-макета:  
Издательство «МАКС Пресс»  
Главный редактор: Е. М. Бугачева

Подписано в печать 16.08.2017.  
Формат 60x88 1/16. Усл.печ.л. 6,5.  
Тираж 50 экз. Изд. №194

Издательство ООО «МАКС Пресс»  
Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М. В. Ломоносова,  
2-й учебный корпус, 527 к.  
Тел. 8(495)939-3890/91. Тел./факс: 8(495)939-3891.

Отпечатано в ППП «Типография «Наука»  
121099, Москва, Шубинский пер., 6.  
Заказ №