

Ю. М. Гаин, Е. П. Киселёва, В. Г. Богдан, С. В. Шахрай

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ КОЖНОГО ПОКРОВА ПРИ ЕГО ОБШИРНЫХ ДЕФЕКТАХ

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последиplomного образования»; Военно-медицинский факультет в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Кожа представляет собой крупнейший орган человека. Её масса вместе с подкожной жировой клетчаткой достигает 16-17% от общей массы тела [1]. Непосредственно соприкасаясь с внешней средой, кожа выполняет барьерно-защитную функцию. Кроме этого, она реализует множество жизненно-важных физиологических процессов, таких как рецепторный, терморегулирующий, секреторный, обменный, дыхательный, эндокринный и иммунный [1]. Нарушение целостности кожного покрова, связанное с травмой, ожогами, заболеваниями, хирургическими вмешательствами, агрессивным радиологическим лечением онкологической патологии чревато рядом серьёзных осложнений и может иметь драматические последствия для пациентов [2].

Цель. Провести анализ эффективности современных методик клеточной трансплантации, используемых для восстановления дефектов покровных тканей человека при травме различного происхождения, и определить наиболее перспективные направления для развития данных технологий в Республике Беларусь.

Материалы и методы. В сравнительном аспекте оценена эффективность экспериментального и клинического использования различных клеточных технологий для замещения и восстановления обширных дефектов покровных тканей (в том числе, и травматического происхождения) по данным мировой и отечественной литературы.

Результаты и обсуждение. На сегодняшний день одной из наиболее распространенных причин потери значительных участков кожного покрова остается термическая травма. Статистика свидетельствует, что ежеминутно в мире, по крайней мере, один человек становится жертвой ожога. К примеру, в России ожоговые пациенты составляют 20% от всех больных травматологического профиля, причем 26% из них нуждаются в госпитализации, а летальность при этом составляет 4,7–11%. В США ежегодно получают ожоги около 2 миллионов человек, из них около 5 тысяч пациентов нуждаются в реконструктивно-восстановительном хирургическом лечении [3]. Среди взрослого населения Республики Беларусь в 2009 году летальность от ожогов составила 3,39%, а среди детей – 0,08%. К тому же, как показывают данные ВОЗ, число ожоговых травм во всем мире непрерывно увеличивается, формируя серьезную медицинскую, социальную и экономическую проблему.

Поэтому своевременное восстановление защитной функции кожи является залогом успешного клинического исхода для пациентов, пострадавших от ожогов различной степени тяжести [4]. Текущий прогресс в лечении, а также техническое совершенствование специализированных ожоговых подразделений позволяют успешно излечивать повреждения, которые ещё полвека назад считались смертельными. Беларусь находится среди лидеров в СНГ по организации специализированной медпомощи пострадавшим вследствие термической травмы. В этой связи необходимо отметить, что наша республика располагает 7 ожоговыми отделениями, общий коечный фонд 0,35 койки на 10 000 населения (в России – 0,23). В специализированных отделениях находятся наиболее сложные больные, 10–15% которых требуют, как правило, интенсивной терапии. «Золотым стандартом» лечения ожоговых больных остаётся аутодермотрансплантация [5]. Вместе с тем, у пациентов с ожогами уже 20-30% кожи возникает дефицит её донорских ресурсов, существенно затрудняющий возможность одномоментного закрытия всей имеющейся раневой поверхности. Ещё более сложной проблемой является курация группы больных, площадь поражения поверхности тела которых составляет более 40-50% [4]. Кроме этого, длительно сохраняющийся болевой синдром со стороны донорских ран требует дополнительной фармакологической нагрузки. Дополнительно следует указать, что забор лоскута с одного участка тела возможен только от трёх до пяти раз (в зависимости от толщины дермы), вследствие чего каждая последующая трансплантация вынужденно откладывается на время реэпителизации [7]. В случаях, когда площадь доступных донорских участков крайне ограничена, используется методика равномерной перфорации лоскута для более широкого покрытия ран. Хотя этот метод и обеспечивает большую зону покрытия, снижая количество летальных исходов, косметические и функциональные результаты такого лечения хуже по сравнению со стандартной методикой [8]. При обширных поражениях и отсутствии донорских участков для предотвращения потери жидкости и микробного загрязнения часто используют временные повязки или трупную кожу. Однако, такие раны в большинстве своем остаются незаживающими в течение длительного времени и способствуют развитию ряда серьёзных осложнений [7].

Таким образом, если к травмированной поверхности добавить донорские раны, то проблемы, связанные с ослаблением дермального барьера, ещё более усугубляются и влекут за собой возникновение тяжёлых катаболических нарушений, что в совокупности со сниженным иммунитетом, способствует развитию сепсиса у пациентов с глубокими и обширными ожогами, приводя в неблагоприятных случаях к летальному исходу [6].

Исходя из сказанного, будущее изучаемого сегмента медицинской практики сегодня напрямую связывают с развитием клеточных технологий, которые позволяют, не меняя поврежденный орган или ткань, «обновлять» их клеточный состав [9]. Изучение механизмов регенерации органов, поиск новых технологий, которые могли бы восстановить утраченную функцию

органа или системы, способствовало появлению нового направления, возникшего на стыке медицины и биотехнологии – тканевой инженерии [10]. Как самостоятельная дисциплина, она начала свою историю в первой половине XX века. На сегодняшний день, тканевая инженерия является одной из наиболее молодых отраслей в медицине, базирующейся на принципах молекулярной биологии и геномной инженерии. Её целью является конструирование вне организма живых функциональных компонентов, которые могут быть использованы для регенерации поврежденных тканей и органов. Главная задача этого направления – создание новых биоконструкционных материалов, обеспечивающих восстановление и улучшение функций повреждённых органов и тканей [9].

Заменители кожи, созданные с помощью тканевой инженерии, представляют собой перспективный материал для лечения острых и хронических повреждений кожи, в особенности, когда стандартные методы невозможны или нежелательны по различным причинам [11, 12].

Известно, что для искусственного формирования полноценной структуры и восстановления функций кожи необходимо наличие всех клеточных элементов и компонентов, присутствующих в ней в норме [13].

Возможность выделения собственно клеток из тканей животных и культивирования их вне организма (*in vitro*) была доказана еще в начале прошлого века. На сегодняшний день, клеточные технологии включают большое число подходов и методов, которые позволяют получение клеток, свободных от микробной контаминации; делают возможным рост и развитие линий, выделенных из различных тканей, и обеспечивают постоянное совершенствование способов оценки состояния клеток в культуре [15]. Список типов клеток, которые введены в культуру в настоящий момент, достаточно велик. В первую очередь, это элементы соединительной ткани человека (фибробласты), клетки нервной системы, кератиноциты, меланоциты и различные опухолевые линии. Описаны также негомогенные культуры клеток с фиксированным фенотипом [14]. Так, например, культура клеток кератиноцитов эпидермиса может содержать стволовые клетки, клетки-предшественники и кератинизированные чешуйчатые клетки. В такой культуре происходят постоянное обновление за счёт стволовых клеток, пролиферация и созревание клеток-предшественников, а также необратимая дифференцировка, сопровождающаяся «слущиванием» чешуйчатых клеток в культуральную среду [16].

Пожалуй, впервые возможность использования для заживления ран аутоклеток кожи, выращенных *in vitro*, была показана в работах профессора зоологии Лондонского университета P.R. Medawar в сороковых годах 20-го века [17]. Однако, ещё длительный промежуток времени исследователям не удавалось получить многослойные пласты аутологичных клеток, способных заменить аутодермотрансплантат. И только в семидесятых годах прошлого века J. Rheinwald и H. Green удалось разработать технологию культивирования больших количеств клеток эпидер-

миса – кератиноцитов, позволяющую в течение примерно четырёх недель получить из небольшого кусочка кожи многослойный пласт в тысячи раз превышающий первоначальный размер биоптата [18, 19]. Эта технология стала базисной, позволила повысить уровень выживания пациентов, нуждающихся в клеточной терапии, и до сих пор применяется в различных модификациях [20].

Однако, это не исключает необходимость совершенствования способов и подходов при применении культивированных кератиноцитов. Основные различия в подходах производства эпидермальных заменителей определяются: особенностями методов культивирования клеток, стадиями клеточной дифференцировки и эпидермальной организации (конфлюэнтный, субконфлюэнтный клеточный слой), методами доставки клеток к пациенту [20, 21, 22].

Ключевым шагом при разработке эпидермальных заменителей кожи является получение необходимого количества кератиноцитов при их культивировании *in vitro*, удовлетворяющего терапевтическим потребностям. Как правило, процесс получения аутологических кератиноцитов начинается непосредственно с биопсии кожи размером 2-5 см² во время хирургической обработки раны у пациента, прибывшего в стационар. Эпидермис отделяется от дермы и под воздействием ферментов происходит выделение одиночных кератиноцитов. Затем они высеваются на культуральную посуду, где одиночные клетки начинают делиться и формировать колонии [23]. Отдельные колонии сливаются вместе, образуя эпителиальные слои. Качество таких стратифицированных культуральных эпителиальных аутотрансплантатов напрямую зависит от клеточного состава [24]. Наибольший интерес представляют базальные кератиноциты, которые образуют голоклоны – колонии с самым высоким пролиферативным потенциалом, необходимым для успешной долгосрочной выживаемости трансплантата. Мероклоны – колонии, состоящие из переходных клеток – в силу своих возможностей, могут обеспечить только временное закрытие раны в естественных условиях. В тоже время, коммитированные кератиноциты, образующие параклоны, представляющие собой большинство нормальных эпителиальных клеток, имеют очень низкий пролиферативный потенциал, в связи с чем, трансплантаты, состоящие только из них, не могут служить основой для окончательного закрытия раны [25].

В настоящее время технические возможности позволяют сохранять в течение длительного времени колонии с высоким пролиферативным потенциалом в процессе культивирования кератиноцитов. Хуже обстоит дело с сокращением сроков, необходимых для получения достаточного количества биоматериала [26]. Вместе с тем, и здесь также достигнут серьёзный прогресс. Так, использование фибриновой матрицы в процессе культивирования кератиноцитов позволило V. Ronfard с соавторами (2000) получить 4,1 м² эпителия из 4,5 см² биопсии кожи за 15 дней [27]. На сегодняшний день существует целый ряд коммерчески доступных эпидермальных заменителей кожи – Epicel, EPIBASE, MySkin, Laserskin (Vivoderm), Bioseed-S [26]. Несмотря на

то, что процент приживления таких трансплантатов варьирует в широких пределах (от 15 до 85%), они жизненно необходимы для пациентов с обширными повреждениями кожного покрова в результате термической травмы [27]. К их основным недостаткам следует отнести чувствительность к инфекциям, высокую стоимость и короткий срок годности (24 часа) [26, 27].

Ещё одно важное направление применения клеточных технологий связывают с использованием культивированных фибробластов. Попытки их применения для восстановления целостности кожного покрова в медицинской практике стали предприниматься после того, как было установлено, что дермальные фибробласты в культуре сохраняют диплоидный кариотип и не экспрессируют антигены главного комплекса гистосовместимости класса II. Доклинические исследования на бестимусных мышках показали, что культивированные фибробласты, не проявляют онкогенных свойств [28]. Фибробласты представляют собой неоднородную популяцию клеток, обеспечивающую синтез волокнистой соединительной ткани – основного вещества, участвующего в репарации повреждённой кожи и стимуляции роста кератиноцитов и сосудов. Как правило, популяция фибробластов состоит из слабодифференцированных фибробластов, дифференцированных фибробластов, фиброцитов и фиброкластов [28, 29].

Фибробласты способны продуцировать фибронектин, проэластин, ламинин, проколлаген и гликозаминогликаны. При этом эластин и коллаген обеспечивают функцию механического каркаса дермы. Фибронектин играет значительную роль в адгезии и кооперации клеток соединительной ткани, образовании коллагеновых волокон и развитии иммунных реакций. Гликозаминогликанами дермы являются хондроитин-(4,6)-сульфат, гепарин, гиалуроновая кислота и дерматансульфат. Благодаря неплотной пространственной упаковке полисахаридов, гликозаминогликаны обладают способностью поглощать и удерживать большое количество воды, создавая необходимые условия, как для клеточных реакций, так и для биохимических процессов [29]. Иммунофенотипический профиль культивируемых фибробластов кожи соответствует профилю клеток мезенхимального ряда. Фибробласты экспрессируют виментин, CD44, CD90, CD105, но не экспрессируют маркеры гемопоэтических (CD34, CD133, нестин) и эндотелиальных клеток [30].

Сегодня фибробластам отводят ключевую роль в процессах регенерации дефектов кожного покрова. В первую фазу заживления ран (в условиях выраженного воспаления), запускается каскад реакций взаимодействия фибробластов с кератиноцитами, результатом которых является миграция клеток от края раны по раневому ложу перпендикулярно его краям. Благодаря этому формируется эпителий с признаками, характерными нормальному эпителию данного участка кожи [31].

Наибольшим пролиферативным потенциалом (а значит, и наибольшей клинической эффективностью) обладают эмбриональные фибробласты. Однако их применение имеет ряд огра-

ничений, в том числе и этического характера [32]. В тоже время установлено, что фибробласты, полученные из кожных биоптатов взрослых доноров, легко культивируются в лабораторных условиях, не теряя своих функций и терапевтического потенциала, благодаря чему могут использоваться для восстановления целостности кожного покрова у ожоговых пациентов [33].

В последнее время всё большее внимание уделяется созданию *in vitro* сложных структур и композиций, включающих в своём составе не только клетки эпидермального и мезенхимального происхождения, но и элементы внеклеточного матрикса [42].

Для успешной стимуляции тканеобразования в месте имплантации необходимо создать высокую начальную концентрацию функционально активных клеток, способных дифференцироваться, поддерживать соответствующий фенотип и выполнять биологические функции [40]. Важная роль в нормальном функционировании большинства клеток принадлежит пространственному взаимодействию с соседними клеточными структурами и внеклеточным матриксом. В тоже время, культивированные клетки должны определённое время находиться в фиксированном (по отношению к носителю) состоянии, без снижения способности проявлять свои пролиферативные свойства [40]. Выбор адекватного носителя для трансплантируемых клеток в организм реципиента остаётся актуальным и в наши дни, так как простое введение суспензии в рану бывает далеко не всегда эффективно [35]. На сегодняшний день, выделяют два вида материалов, используемых в качестве межклеточного матрикса: полученные из естественных субстанций и те, которые получают синтетически [36]. В последние десятилетия непрерывно растёт интерес к биodeградируемым природным (биологическим) полимерам (альгинатам, коллагену, желатину, хитозанам, фибронектину) и полиэфирам бактериального происхождения (синтезируемых микроорганизмами) – полигидроксиалканоатам (ПГА).

Наиболее часто в качестве межклеточного матрикса в тканевой инженерии используется коллаген [35]. Последний является одним из самых распространенных эндогенных белков, ответственных за поддержание структурной целостности ткани. На рибосомах фибробластов осуществляется синтез начальных полипептидных цепей коллагена, которые далее (после гидроксирования и гликозилирования) сшиваются дисульфидными мостиками в трёхцепочечную спираль тропоколлагена. После завершения процесса создания молекулы тропоколлагена фибробласты его секретируют, и дальнейший синтез зрелого коллагена осуществляется уже внеклеточно. Из 20 различных типов коллагена, коллаген I, II, III, V и XI типов собирается в фибриллы. I тип коллагена присутствует в дерме, фасциях и сухожилиях, и является основным компонентом рубцовой ткани. Коллаген IV типа относится к основным компонентом базальной мембраны. Метод создания трансплантата, комбинированного из аутологичных кератиноцитов и бесклеточной коллаген-гликозаминогликановой матрицы впервые описан С.Е. Butler et al. (2005). Он был испытан на модели у свиней для регенерации эпидермиса и дермы *in vivo* [41].

В настоящее время разработаны методы получения больших количеств коллагена медицинской чистоты [37]. Значительное расширение областей применения коллагена в медицине стало возможным после того, как в результате многолетних исследований и дискуссий было установлено, что, несмотря на некоторые случаи отрицательной реакции на коллагеновые имплантаты, достоверные противопоказания к имплантационному введению медицинского коллагена животного происхождения отсутствуют [38].

В целом следует отметить, что в настоящее время известно большое количество клеточно-инженерных заменителей кожи [43, 44]. Исходя из анатомической структуры, выделяют эпидермальные, дермальные, двойные (имеющие в своем составе как дермальный, так и эпидермальный компонент) раневые покрытия. Целью создания последних является имитация гистологического строения нормальной кожи. По времени закрытия раны раневые покрытия разделяют на перманентные и временные. По своему происхождению препараты данной группы можно условно разделить на биологические (аутологичные, аллогенные, ксеногенные) и синтетические (биodeградируемые и небиodeградируемые). Относительно клеточного состава, они делятся на содержащие только биологически активные макромолекулы и на имеющие в своём составе живые клетки разного типа (фибробласты, кератиноциты и др.). По способу получения окончательной лечебной формы препараты данной группы подразделяются на готовые к применению и на формирующиеся непосредственно в ране. Готовые к употреблению биотехнологические раневые покрытия – это те композиции, которые окончательно формируются в лаборатории и далее доставляются в клинику, где осуществляется их перенос на раневые поверхности [44].

Необходимо учитывать, что при создании тканевых трансплантатов, должны быть соблюдены многие требования: в первую очередь, безопасность для пациента, клиническая эффективность и удобство в практическом использовании [37]. Идеальные биоматериалы для восстановления целостности кожного покрова должны обладать высокой абсорбционной способностью в отношении раневого экссудата, создавать оптимальную среду для заживления ран, не иметь пирогенного, антигенного, токсического эффекта, местного раздражающего и аллергического действия. Они должны обладать эластичностью, возможностью моделирования поверхности со сложным рельефом. В то же время, они обязаны обеспечивать условия для облегчения боли, предотвращения потери тепла и жидкости, защиты раны от инфекции. Такие кожные заменители должны моделировать свойства экстрацеллюлярного матрикса в секретируемых факторах, цитокинов, биологически активных пептидов и других веществ, необходимых для функционирования здоровой кожи настолько, насколько это возможно. Большими преимуществами для подобных трансплантатов станут экономическая рациональность и длительные сроки хранения. Конечной целью тканевой инженерии является удовлетворение большинства из этих критериев при производстве заменителей кожи. Но, к сожалению, до сих пор не существует ра-

невого покрытия, которое по своим характеристикам соответствовало бы всем вышеперечисленным требованиям [35, 44].

Выводы

1. Мировой опыт практического использования клеточных технологий в медицине свидетельствует о том, что, несмотря на наличие значительного числа заменителей кожи, в настоящее время не существует её биоинженерной модели, способной полностью соответствовать анатомическим, физиологическим, биологическим и эстетическим характеристикам неповрежденной кожи.

2. Учитывая исключительную важность для Республики Беларусь создания биотехнологического метода восстановления обширных дефектов кожи, существует объективная потребность разработки и практического внедрения эффективных технологий клеточной трансплантации, доступных широкой сети лечебно-профилактических учреждений.

3. Первые успешные результаты клеточной трансплантации в нашей стране, положительные результаты выращивания и направленной дифференцировки различных клеточных композиций в лабораторных условиях ряда научных учреждений позволяют с оптимизмом смотреть на ближайшую и отдалённую перспективу восстановления значительных дефектов кожных покровов с использованием сил и средств клеточной биоинженерии.

Литература

1. *Supp, D.* Engineered skin substitutes: practices and potentials / D. Supp, S. Boyce // *Clin. Dermatol.* 2005. Vol. 23. P. 403–412.

2. *Brigham, P. A.* Burn incidence and medical care use in the United States: estimates, trends, and data sources / P. A. Brigham // *J. Burn Care Rehabil.* 1996. № 17. P. 95–107.

3. *Use of breast reconstruction after mastectomy following the Women’s Health and Cancer Rights Act / A. Alderman [et al.] // JAMA.* 2006. Vol. 295. P. 387–388.

4. *Use of skin allograft and its donation rate in singapore: an 11-year retrospective review for burns treatment / A. Chua [et al.] // Transplant.* 2007. Vol. 39. P. 1314–1316.

5. *Ермолов, А. С.* Применение биологически активных раневых покрытий, стимулирующих регенерацию эпителия ожоговых ран IIIA степени / А. С. Ермолов, С. В. Смирнов, В. Б. Хватов // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2008. Т. 3. С. 166–72.

6. *Reepithelialization of porcine skin by the sweat apparatus / S. Miller [et al.] // Invest. Dermatol.* 1998. Vol. 110. P. 13–19.

7. *Atiyeh, B.* Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later / B. Atiyeh, M. Costagliola // *Burns.* 2007. Vol. 33. P.405–413.

8. *Stoilova, Y.* Immunological and microbiological investigations of patients with burn injuries / Y. Stoilova [et al.] // *Folia Med.* 2007. Vol. 49. P.49–58.
9. *Boyce, S.* Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes / S. Boyce, G. Warden // *Am. Surg.* 2002. Vol. 183. P. 445–456.
10. *Regeneration* or scarring: an immunologic perspective / M. Harty [et al.] // *Dev. Dyn.* 2003. Vol. 226. P. 268–279.
11. *Селвакумаран, Д.* Основы культивирования клеток и использование клеточных культур для производства биоматериалов и инжиниринга тканей / Д. Селвакумаран, Г. Джелл // *Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей* / Л. Хенч, Д. Джонс. М.: Техносфера, 2007. С. 244.
12. *Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering* / V. Mironov [et al.] // *Trends Biotechnol.* 2003. Vol. 21. P. 157–161.
13. *Jones, I.* A guide to biological skin substitutes / I. Jones, L. Currie, R. Martin // *Plast. Surg.* 2002. Vol. 55. P. 185–193.
14. *Фрешни, Р.* Культура животных клеток: методы / Р. Фрешни. М.: Мир, 1991.
15. *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair* / R. Bucala [et al.] // *Mol. Med.* 1994. Vol. 1. P. 71–81.
16. *Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites* / R. Abe [et al.] // *Immunol.* 2001. Vol. 166. P. 7556–7562.
17. *Medawar, P. R.* The cultivation of adult mammalian skin epithelium in vitro / P. R. Medawar // *Quart. J. Microsc. Sci.* 1984. Vol. 89. P. 187–196.
18. *Rheinwald, J. G.* Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells / J. G. Rheinwald, H. Green // *Cell.* 1975. Vol. 6, № 3. P. 331–43.
19. *Rheinwald, J. G.* Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes / J. G. Rheinwald, H. Green // *Nature.* 1977. Vol. 265. P. 421–424.
20. *Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients* / H. Carsin [et al.] // *Burns.* 2000. Vol. 26. P. 379–387.
21. *Парамонов, Б. А.* Ожоги: руководство для врачей / Б. А. Парамонов, Я. О. Порембский, В. Г. Яблонский. СПб.: СпецЛит, 2000. 480 с.
22. *Chester, D.* A review of keratinocyte delivery to the wound bed / D. Chester, D. Balderson, R. Papini // *Burn Care Rehab.* 2004. Vol. 25. P. 266–275.
23. *Plasma polymer coated surfaces for serum-free culture of limbal epithelium for ocular surface disease* / M. Notara [et al.] // *Mater. Sci. Mater. Med.* 2007. Vol. 18. P. 329–338.

24. *Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture* / S. Papini [et al.] // *Stem Cells*. 2003. Vol. 21. P. 329–338.
25. *Mac Neil, S.* Progress and opportunities for tissue engineered skin / S. Mac Neil // *Nature*. 2007. Vol. 445. P. 874–880.
26. *Randomized, controlled, single-blind study on use of autologous keratinocytes on a transfer dressing to treat nonhealing diabetic ulcers* / M. Moustafa [et al.] // *Regen. Med*. 2007. Vol. 2. P. 887–902.
27. *Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix* / V. Ronfard [et al.] // *Transplantation*. 2000. Vol. 70. P. 1588–1598.
28. *«Neutral allografts»-lack of allogeneic stimulation by cultured human cells expressing MHC class I and II antigens* / V. Theobald // *Transplantation*. 1993. Vol. 55, № 1. P. 128–33.
29. *Златопольский, А. Д.* Влияние ферментов фибронектина на пролиферативную активность фибробластов / А. Д. Златопольский, А. Н. Чубкина, М. А. Зайденберг // *Биохимия*. 1989. Т. 54, № 1. С. 74–79.
30. *Simpson, D.* Dermal templates and the wound-healing paradigm: the promise of tissue regeneration / D. Simpson // *Expert Review of Medical Devices*. 2006. Vol. 3, № 4. P. 471–484.
31. *Schaffer, C. J.* Cell biology of wound healing / C. J. Schaffer, L. B. Nanney // *Int. Rev. Cytol*. 1996. Vol. 169. P. 151–181.
32. *Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence* / M. V. Mendez [et al.] // *Vasc. Surg*. 1998. Vol. 28. P. 876–883.
33. *Differential expression and regulation of extracellular matrix-associated genes in fetal and neonatal fibroblasts* / A. Gosiewska [et al.] // *Wound Repair Regen*. 2001. Vol. 9. P. 213–222.
34. *Keratinocyte growth factor stimulates bronchial epithelial cell proliferation in vitro and in vivo* / M. Michelson [et al.] // *Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1999. Vol. 277, № 4. P. 737–742.
35. *Буттери, Л.* Введение в инжиниринг тканей / Л. Буттери, Э. Бишон // *Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей* / Л. Хенч, Д. Джонс. М.: Техносфера, 2007. С. 214–222.
36. *Введение в методы культуры клеток, биоинженерия органов и тканей* / под ред. В. В. Новицкого [и др.]. Томск, 2004. 385 с.
37. *Supp, D. M.* Engineered skin substitutes: practices and potentials / D. M. Supp, S. T. Boyce // *Clin. Dermatol*. 2005. Vol. 23. P. 403–412.
38. *A tissue engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro* / V. Hudon [et al.] // *Dermatol*. 2003. Vol. 148. P. 1094–1104.

39. *Reconstructed* skin in culture: a simple method with optimal differentiation / N. Basset-Seguin [et al.] // *Differentiation*. 1990. Vol. 44, № 3. P. 232–238.
40. Vats, A. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications / A. Vats // *Clin. Otolaryngol.* 2003. Vol. 28. P. 165–172.
41. Butler, C. E. Simultaneous in vivo regeneration of neodermis, epidermis, and basement membrane / C. E. Butler, D. P. Orgill // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2005. Vol. 94. P. 23–41.
42. *Bioengineered* skin in diabetic foot ulcers / Y. J. Teng [et al.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2010. Vol. 12, № 4. P. 307–315.
43. Jones, I. A guide to biological skin substitutes / I. Jones, L. Currie, R. Martin // *Plast. Surg.* 2002. Vol. 55. P. 185–193.
44. Patel, M. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering / M. Patel, J. Fisher // *Pediatr. Res.* 2008. Vol. 63. P. 497–501.