

ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКТЫ КОЖИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОЖНЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2017.9.1.24

УДК 576.314.6/7:616.5–001.4–085

Поступила 12.01.2017 г.



А.В. Мелешина, к.б.н., научный сотрудник НИИ биомедицинских технологий¹;

А.С. Быстрова, магистр Института биологии и биомедицины²;

О.С. Роговая, к.б.н., научный сотрудник³; научный сотрудник отдела регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины⁴;

Е.А. Воротеяк, д.б.н., член-корреспондент РАН, зав. лабораторией³; зав. отделом регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины⁴; доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета⁵;

А.В. Васильев, д.б.н., член-корреспондент РАН, директор³; зав. кафедрой эмбриологии биологического факультета⁵;

Е.В. Загайнова, д.м.н., профессор РАН, директор НИИ биомедицинских технологий¹

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, пр. Гагарина, 23;

³Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334, ул. Вавилова, 26;

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, 1;

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1

Разработка и внедрение в клиническую практику новых биотехнологических аналогов (эквивалентов) тканей и органов, в частности эквивалентов кожи (ЭК) человека, призванных временно или постоянно заменять поврежденные или разрушенные ткани, остается актуальной задачей регенеративной медицины. В настоящее время создают и исследуют как полнослойные ЭК, так и отдельные ее слои, имеющие в своем составе живые клетки различных типов и происхождения.

Проведен сравнительный анализ существующих ЭК, как коммерческих, так и находящихся на стадии доклинических исследований, проанализированы особенности их строения и возможности использования для решения экспериментальных и клинических задач. Рассмотрены характеристики трех основных вариантов ЭК. Приведены примеры использования стволовых клеток для создания кожных эквивалентов. Описаны основные преимущества применения стволовых клеток в качестве клеточного компонента ЭК.

Ключевые слова: биоинженерные заменители кожи; эквиваленты кожи; биоматериалы; тканевая инженерия; заживление ран; стволовые клетки.

Как цитировать: Meleshina A.V., Bystrova A.S., Rogovaya O.S., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V., Zagaynova E.V. Tissue-engineered skin constructs and application of stem cells for creation of skin equivalents (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(1): 198–218, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.24>

English

Tissue-Engineered Skin Constructs and Application of Stem Cells for Creation of Skin Equivalents (Review)

A.V. Meleshina, PhD, Researcher, Institute of Biomedical Technologies¹;

A.S. Bystrova, Master of Science, Institute of Biology and Medicine²;

O.S. Rogovaya, PhD, Researcher³; Researcher, Department of Regenerative Medicine, Research Institute of Translational Medicine⁴;

E.A. Vorotelyak, DSc, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory³; Head of the Department of Regenerative Medicine, Research Institute of Translational Medicine⁴;

Associate Professor, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology⁵;

Для контактов: Быстрова Алена Сергеевна, e-mail: bystrova93@gmail.com

A.V. Vasiliev, DSc, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Director³; Head of the Department of Embryology, Faculty of Biology⁵;

E.V. Zagaynova, MD, DSc, Professor of the Russian Academy of Sciences, Director, Research Institute of Biomedical Technologies¹

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

²Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Gagarina Avenue, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

³Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, 26 Vavilova St., Moscow, 119334, Russian Federation;

⁴Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russian Federation;

⁵Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

Development and introduction of new biotechnological analogs (equivalents) of tissues and organs into clinical practice, such as human skin equivalents (SE), designed for temporal or permanent replacement of damaged or destroyed tissue, remains an urgent problem of regenerative medicine. Currently, full-thickness SE as well as separate skin layers, which include living cells of different types, are being created and investigated.

In our review, we present a comparative analysis of existing SE, both commercial and those being at the stage of preclinical study, analyze their structure and feasibility of application for solving experimental and clinical tasks. Characteristics of the three main variants of SE have also been considered. Examples of stem cell application for creation of SE have been given. The main advantages of using stem cells as a cell component of SE have been described.

Key words: bioengineered skin substitutes; skin equivalents; biomaterials; tissue engineering; wound healing; stem cells.

Кожа является самым большим органом млекопитающих, служащим защитным барьером на границе раздела между телом человека и окружающей средой. В связи с пограничным расположением кожа постоянно подвергается воздействию потенциально вредных микробиологических, термических, механических и химических факторов [1]. При повреждении кожного покрова основной задачей организма становится восстановление барьерных свойств, что связано, прежде всего, с частичным или полным восстановлением структуры кожи, поскольку структура и функции этого органа тесно связаны [2].

Нарушение нормальной биологической реакции на ранение кожи вследствие заболевания, травмы или операции неизбежно приводит к значительным осложнениям. Процесс заживления раны является чрезвычайно сложным и в случае хронических ран — часто многофакторным [3]. Регенеративная способность у человека сильно ограничена: в отличие от животных кожный покров не может восстанавливаться первичным натяжением, а краевая эпителизация затруднена. В настоящее время неполное понимание молекулярных, клеточных и физиологических механизмов, регулирующих заживление ран, является частой причиной разочаровывающих результатов лечения.

Важнейшее и быстро развивающееся направление современной регенеративной медицины — применение клеточных технологий в лечении острых и хронических ран, диабетических язв, ожогов. Задача клеточных технологий в этом случае заключается не только в трансплантации живых клеток в область дефекта, но и в полном восстановлении структуры и функции кож-

ного покрова, в стимуляции регенеративных процессов и создании микроокружения для реализации потенциала собственных тканей и клеток. Для решения таких задач используют методы тканевой инженерии.

Основными направлениями в тканевой инженерии являются выделение и выращивание культуры клеток и тканей *in vitro*, исследование свойств стволовых клеток, роли микроокружения дефекта, а также изучение возможностей использования биологически совместимых синтетических материалов. В результате работ в этих направлениях созданы гистотипические или функциональные аналоги (эквиваленты) тканей и органов, в частности эквивалент кожи (ЭК) человека. Такие эквиваленты в настоящее время используют для изучения и моделирования биологических процессов. Кроме того, их уже применяют в клинике для ускорения заживления острых и хронических ран и в фармацевтических исследованиях в качестве тест-систем.

Строение кожных эквивалентов

Кожные эквиваленты человека являются биоинженерными конструкциями — заменителями кожи, состоящими из клеточного компонента, т.е. культивированных клеток кожи человека, и подложки (матрицы, скаффолда), являющейся аналогом внеклеточного матрикса [4].

Большинство тканеинженерных заменителей живой кожи создают путем культивирования клеток кожи в лабораторных условиях и комбинирования их с подложкой. ЭК используют для восстановления структуры и, следовательно, барьерной функции кожи (основная цель лечения ожоговых больных), а также для иници-

ирования заживления ран (при хронических незаживающих язвах). Применение ЭК ускоряет заживление ран, уменьшает болевой синдром, воспаление, а также предотвращает образование рубцов, контрактуры или пигментных дефектов [4].

Основные требования к ЭК — это их биологическая и токсикологическая безопасность, эффективность и отсутствие иммуногенности. Важно учитывать, что любой клеточный материал несет риск передачи вирусной, бактериальной или иной инфекции, а к подложкам у пациента может быть индивидуальная непереносимость или они могут вызывать сильную воспалительную реакцию.

Кроме того, желательно, чтобы ЭК был биодegradуемым и способствовал восстановлению нормальной ткани с аналогичными физическими и механическими свойствами, присущими коже человека, которую он заменяет. Также важным является экономическая эффективность производства биоматериала, его доступность и длительный срок хранения [2, 5].

Клеточный компонент

В коже млекопитающих преобладающими типами клеток являются фибробласты и кератиноциты. Соответственно в подавляющем большинстве исследований по заживлению ран в качестве клеточного компонента ЭК используют один или оба из этих типов клеток.

Эпидермальные кератиноциты представляют собой основную часть клеток кожи. При ороговении (кератинизации) в них происходит синтез специальных белков — кислых и щелочных типов кератинов, филагрина, инволюкрина, кератолинина и других, устойчивых к механическим и химическим воздействиям [6, 7]. Кератиноциты базального слоя способны к активному делению, а по мере дифференциации клетки перемещаются из базального слоя в поверхностные слои кожи. Так, каждые 3–4 нед происходит обновление (физиологическая регенерация) эпидермиса [8, 9].

Впервые культуру кератиноцитов получили в 1975 г. Д. Рейнвальд и Г. Грин [10]. Сначала кератиноциты культивировали, используя фидерные клетки — мышинные фибробласты линии 3T3 Swiss. В дальнейшем фидерные клетки заменили добавлением в культуральную среду факторов роста и белков внеклеточного матрикса. Оказалось, что некоторые из них способствуют росту кератиноцитов и их можно использовать в качестве субстратов для культивирования [11–13].

Дермальные фибробласты представляют собой гетерогенную популяцию клеток мезенхимального ряда и играют ключевую роль в процессах регуляции клеточных взаимодействий и поддержании гомеостаза кожи. Дермальные фибробласты продуцируют все основные компоненты межклеточного матрикса — коллаген, гликозаминогликаны, протеогликианы, а также

отвечают за непрерывный процесс ремоделирования матрикса [14]. Благодаря этим свойствам фибробласты широко используют для создания ЭК.

Меланоциты — еще один многочисленный тип клеток кожи человека, среднее число которых по отношению к кератиноцитам в эпидермисе составляет 1:36. У человека эпидермальные меланоциты образуют структурную и функциональную эпидермальную меланиновую единицу в комплексе с клетками базального и шиповатого слоев эпидермиса — кератиноцитами. Эти кератиноциты путем фагоцитоза захватывают меланосомы, синтезируемые меланоцитами, и тем самым регулируют скорость синтеза меланина — основного пигмента кожи человека, который обеспечивает фотозащиту кожи от вредного солнечного излучения [15]. В связи с уникальностью этих клеток меланоциты используют для создания пигментированных ЭК, которые являются моделью для исследования регуляции работы пигментной системы кожи и механизмов фотозащиты от вредного ультрафиолетового излучения [16]. Этот тип клеток может быть в принципе использован для придания ЭК пигментированности. Однако следует учитывать высокую склонность меланоцитарного ростка к образованию опухолей (меланом).

В литературе также встречается описание исследований по созданию преваккуляризованного ЭК путем внесения в его состав **эндотелиальных клеток**. В 2014 г. была опубликована работа, в которой для создания модели полнослойного ЭК с преваккуляризацией использовали популяцию эндотелиальных клеток, выделенных из стромальной васкулярной фракции жировой ткани и культивированных в геле, состоящем из коллагена и фибрина [17]. В то же время группа ученых под руководством D. Marino [18] создали полнослойный ЭК из культур дермальных микрососудистых эндотелиальных клеток крайней плоти человека, погруженных в трехмерный гель. Такие культуры состоят из смеси лимфатических клеток и эндотелиальных клеток кровеносных сосудов. Благодаря этому в условиях *in vitro* наблюдали образование функциональных кровеносных и лимфатических капилляров в гидрогеле. В дальнейшем ЭК-содержащие кератиноциты, фибробласты и зачатки сосудистой сети в геле трансплантировали на искусственно смоделированную рану иммунодефицитных крыс. В результате оба коллектива авторов сообщают о положительных эффектах, наблюдаемых после трансплантации этих ЭК: в эквиваленте *in vivo* формируются такие слои, как стратифицированный эпидермис и васкуляризованная дерма, наблюдается образование анастомозов с сосудами реципиента в течение четырех дней. Контракция эквивалента отсутствовала, скорее всего благодаря эффективному кровоснабжению, значительно быстрому установлению эпидермального гомеостаза.

Одновременно с этим в разработке тканеинженерных конструкций развивается направление с ис-

пользованием *стволовых клеток* (СК). Эти клетки характеризуются способностью к самообновлению в течение длительного промежутка времени и к дифференцировке в тканеспецифические клетки путем асимметричного деления [19, 20]. Именно их способность дифференцироваться в клетки различных типов тканей может помочь решить проблему с созданием тех компонентов кожи, которых нет в традиционных эквивалентах, а соответственно, и увеличить их эффективность [21].

Хорошо известно, что во время воспалительной фазы заживления ран иммунокомпетентные клетки через кровь проникают в область раны. Существуют данные о том, что СК костного мозга также присутствуют в раневом ложе [22, 23]. Кроме того, показано, что тяжелая травма приводит к увеличению количества циркулирующих СК [24]. Данное явление было подтверждено и в экспериментах с моделированием повреждений различных тканей. Например, E.V. Badiavas и соавт. [25] использовали модель кожной раны у мышей, которым был пересажен костный мозг, меченный зеленым флюоресцентным белком (GFP). Они обнаружили GFP-меченые клетки в области раны, которые дифференцировались в тканеспецифические клетки кожи. В подобных экспериментах C. Fathke и соавт. сообщается, что СК костного мозга способствуют воссозданию популяции дермальных фибробластов при повреждении кожи [26]. Такие данные свидетельствуют о важности миграции СК в процессе заживления ран, что в настоящее время не до конца изучено и требует дальнейшего исследования.

Развитие методов лечения травм и заживления ран с использованием СК в основном связано с СК взрослого человека, в частности с мультипотентными стромальными клетками, или, как их еще называют, *мезенхимальными стволовыми клетками* (МСК). МСК имеют большое значение для регенеративной медицины не только из-за их мультипотентности, трофических и иммуномодулирующих свойств, но и из-за стабильности при культивировании [27].

В исследованиях *in vitro* МСК продемонстрировали ряд свойств, которые могут способствовать восстановлению тканей или даже ускорять этот процесс, в том числе синтез некоторых факторов роста, цитокинов, коллагена и матриксных металлопротеиназ, ангиогенных факторов [26, 28, 29]. Кроме того, они способны обеспечивать миграцию других клеток кожи, таких как кератиноциты [30].

Доклинические и клинические исследования влияния МСК на регенерацию тканей и заживление ран показали хороший результат. Так, в одном из исследований было изучено влияние костного мозга, помещенного на матрицу из коллагена, на заживление ран у мышей. В результате было установлено значительное увеличение ангиогенеза [31]. В работе V. Falanga и соавт. [32] применялась разновидность данного подхода, заключающегося в использовании

полимерного фибринового спрея с аутологичными МСК, полученными из аспирата костного мозга, для увеличения скорости заживления острых и незаживающих кожных ран у мышей, а в дальнейшем и у людей. Такой подход представляет собой еще один возможный способ введения клеток в раневое ложе. E.V. Badiavas и V. Falanga [33] опубликовали клинические результаты с использованием аутологичных клеток костного мозга, применяемых для заживления хронических кожных язв трех пациентов, резистентных к стандартной терапии в течение более 1 года. У всех пациентов через несколько дней после введения клеток наблюдалось улучшение состояния ран, характеризующееся устойчивым общим уменьшением размера раны, увеличением толщины дермального слоя и васкуляризации раны. Другое исследование хронических язв диабетической стопы [34] включало 29-дневное лечение с применением трансплантата, состоящего из аутологичных дермальных фибробластов в сочетании с аутологичными МСК, высеянных на биоразлагаемые коллагеновые подложки, которые наносили непосредственно на рану, а также делали инъекции суспензии клеток в края раны на 1, 7 и 17-й дни. В результате лечения наблюдалось уменьшение размеров раны и увеличение толщины и васкуляризации дермы. T. Yoshikawa с коллегами [35] применяли аутологичные МСК костного мозга для лечения 20 пациентов с различными незаживающими ранами (ожогами, язвами нижних конечностей и пролежнями) с или без аутологичной пересадки кожи. У 18 из 20 пациентов раны полностью зажили, а гистологическое исследование показало, что добавление МСК способствовало ускорению регенерации нативной ткани.

Результаты использования МСК впечатляют, однако данный подход к терапии, как правило, требует большого количества клеточного материала. Это не является серьезной проблемой при лечении небольших ран, но может ей стать при обработке обширных повреждений.

В качестве одного из компонентов ЭК можно рассматривать и другой тип клеток, а именно *клетки дермальной папиллы* (ДП), входящие в состав волосяных фолликулов кожи. Известно, что эти клетки являются одними из основных клеточных популяций волосяного фолликула, определяющими его жизнеспособность и функциональную состоятельность. Как подробно выяснено за последние двадцать лет, основным свойством и главной биологической ролью клеток ДП можно считать их способность индуцировать и регулировать морфогенез волосяного фолликула [36]. Однако результаты исследования [37] показали, что ДП способны дифференцироваться в остеогенном и адипогенном направлениях, поэтому их можно отнести к классическим мезенхимальным фибробластоподобным клеткам со специальными функциями. Именно отнесение клеток ДП к МСК дает все основания полагать, что кожный эквивалент, содержащий клетки

ДП, будет способствовать ускорению неоангиогенеза, ремоделированию внеклеточного матрикса, формированию грануляционной ткани и регенерации кожи. Доказательством этого являются результаты, изложенные в работе G.J. Leirós и соавт. [38]. Исследователи создали ЭК, в которых в качестве клеточного компонента использовали только СК волосяных фолликулов или СК волосяных фолликулов вместе с клетками ДП человека. После трансплантации ЭК иммунодефицитным мышам они оценивали структуру тканеинженерной кожи, выживаемость СК, регенерацию волосяных фолликулов и приживаемость трансплантата. В результате было показано, что присутствие клеток ДП способствует формированию более структурированного, многослойного, слоистого эпидермиса с базальными р63-позитивными клетками и гребнями, более точно имитирующего архитектуру нормальной кожи. Кроме того, присутствие клеток ДП в ЭК способствует не только хорошей приживаемости трансплантата и его ремоделированию после пересадки, но также образованию новых сосудов и созреванию неоваскулярной сети, что приводит к уменьшению воспалительного процесса, эффективному заживлению с меньшими рубцеванием и контракцией раны. Интересно, что только ДП-содержащие конструкции показали наличие зачатков волос, предшественников эпителиальных клеток, и экспрессию маркера дифференцировки волос. Таким образом, эти результаты оценили важность наличия клеток ДП для правильного восстановления кожи.

Активно ведутся работы по изучению применения в качестве альтернативного клеточного компонента *индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК)*.

Исследования последних лет показали, что использование ИПСК позволяет получить эффективные тканеинженерные продукты для регенеративной медицины, в том числе и для лечения кожных ран [39]. Примером может служить работа M. Itoh и его коллег [40], в которой был разработан протокол дифференцировки ИПСК в кератиноциты и дермальные фибробласты для использования в лечении рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза. Кроме того, ими были разработаны 3D-эквиваленты кожи человека, состоящие из кератиноцитов и фибробластов, полученных исключительно из ИПСК. В работе K. Gledhill и соавт. [41] сообщается о создании функционирующего пигментированного 3D-эквивалента кожи, состоящего из дифференцированных производных ИПСК (кератиноциты, фибробласты, меланоциты) и содержащего функциональные эпидермальные меланиновые единицы. Впервые был описан процесс синтеза меланина производными ИПСК, а также процесс переноса меланина между меланоцитами и кератиноцитами. Это исследование является важным направлением в создании более сложных пациентспецифических моделей кожи, которые кроме всего прочего могут стать полезным инструментом для поиска

новых лекарственных препаратов в эпоху персонализированной медицины.

Биополимерные матрицы

В качестве носителей для ЭК при создании тканеинженерных конструкций используют биоматериалы — это бесклеточные природные или синтетические вещества. Они имитируют внеклеточный матрикс.

Примерами природных веществ являются полипептиды, гидроксипатиты, гиалуронаны, гликозаминогликаны, фибронектин, коллаген, хитозан и альгинаты.

К синтетическим полностью деградируемым веществам относятся полигликолиды, полилактиды, полилактиды-когликолиды, политетрафторэтилены, поликапролактоны, полиэтилентерефталаты, а наиболее широко применяемый недеградируемый матрикс — это полиуретан [42]. Современные технологии трехмерной печати и электроспиннинга делают возможным производство биоматериалов точно заданной формы, с определенным размером пор и другими нужными параметрами. Основным недостатком синтетических материалов является отсутствие на них сигналов узнавания для клеток. Одним из подходов для преодоления этого недостатка служит включение в матрикс адгезионных пептидов, например с использованием RGD-последовательностей. Так называемые дружелюбные матриксы состоят из материалов, способных контролировать клеточный метаболизм и дифференцировку, что существенно ускоряет регенерацию [43]. Например, в подложку включают гидрогели полиэтиленгликоля, который действует как инертный каркас, поскольку гидрофилен инертен в отношении абсорбции белков. Гель можно модифицировать, пришивая к нему адгезионные RGD-последовательности или функциональные домены. Кроме того, степень деградируемости можно регулировать, включая протеазочувствительные олигопептиды [44–46].

На биосовместимость материала влияет не только состав, но и форма используемого имплантата. Матриксы для клеток могут быть в виде гелей, микро- и наносфер, волокон, пленок, различных трехмерных конструкций [47, 48].

Матрицы природного происхождения. Максимально аналогичными нативной ткани можно считать децеллюлированную дерму или другие стромальные структуры. Однако они имеют свои ограничения: доступность материала, сложность стандартизации и манипулирования в ходе культуральных работ (невозможность микроскопирования), риск инфицирования пациента. Наиболее известными примерами матриц природного происхождения, которые не только входят в состав ЭК, но и выпускаются в виде отдельных продуктов, являются бесклеточные лиофилизированные матрицы кожи человека (AlloDerm) и кожи свиней (Permacol). Данные препараты получа-

ют путем удаления эпидермиса и внутридермальных клеточных элементов, сохраняя при этом структуру нативной дермы. Преимущество этих материалов в том, что они характеризуются естественной дермальной пористостью, необходимой для быстрой регенерации и васкуляризации трансплантата. В исследованиях *in vitro* показано, что матрицы из децеллюлированной дермы способствуют адгезии, росту и функционированию нескольких типов клеток [49, 50]. Кроме того, при создании таких матриц наблюдается частичное сохранение базальной мембраны, что может помочь в прикреплении эпидермальных клеток [51]. Тем не менее, эти продукты известны высокой стоимостью и риском передачи вирусных и других инфекционных агентов [52].

Искусственные коллагеновые матрицы. Коллаген является основным белком внеклеточного матрикса дермального слоя. Медико-биологические свойства коллагена — способность ускорять заживление ран, усиливать адгезию тромбоцитов и вызывать гемостаз, являться естественным субстратом для миграции клеток кожи пациента при отсутствии антигенности — обусловили его широкое применение в реконструктивной хирургии [53].

Существует три основных формы коллагена, которые используют при создании ЭК: гидрогель, губка и решетка.

Коллагеновый гель был применен при создании дермального эквивалента для исследования влияния клеток на контракцию коллагена, что в последующем было связано с контракцией раны [54]. Однако исследования показали необходимость использования коллагена с более высокой вязкостью и прочностью в форме решеток или губок. Коллагеновая решетка, созданная из плотно сплетенных коллагеновых волокон, представляет собой природную опорную биосеть, которая формируется путем реструктурирования коллагена фибробластами. Ее использовали для имитации дермального слоя кожи *in vitro*. Однако после трансплантации низкая степень контракции коллагеновой решетки увеличивала время закрытия раны. Кроме того, было обнаружено уменьшение синтеза коллагена из-за разобщенности клеток [55, 56]. Коллагеновые губки, как правило, получают путем лиофилизации раствора коллагена или коллагенового геля [57]. Важным их свойством является заданная механическая прочность, что дает возможность использовать их в качестве основы для тканеинженерных конструкций, и способность к биодеградации в организме. Такие эквиваленты на губчатой матрице эффективно используют для восстановления кожи как в экспериментах на животных, так и при лечении кожных ран у пациентов [58–60].

Различные модификации коллагеновых подложек путем сочетания коллагена с другими природными или синтетическими полимерами, такими как гликозаминогликаны, хитозан, поликапролактон и сополимер молочной и гликолевой кислот, используют для по-

вышения механических свойств, увеличения биостабильности, предотвращения контракции коллагеновой матрицы в течение процесса заживления раны, а также для продления клинической долговечности трансплантата [61, 62].

Хитозановые матрицы. Хитозан является еще одним природным полимером, наиболее широко используемым, наряду с коллагеном, в заживлении ран. Он обладает многочисленными преимуществами, в том числе биосовместимостью с биологическими тканями, биоразлагаемостью, кровоостанавливающей активностью и антибактериальными свойствами [63–65]. Хитозан способен стимулировать синтез коллагена и связываться с фактором роста фибробластов, что может увеличить скорость заживления ран [66, 67]. Помимо этого материалы из хитозана разной структуры легки в производстве. Вместе с тем хитозан быстро разрушается в тканях человека, особенно в кислой среде, которая часто формируется при заживлении ран [68]. Для повышения структурной стабильности используются различные модификации хитозана, в том числе сочетание с другими полимерами, такими как коллаген, желатин и гликозаминогликаны [69]. Подобные модификации могут увеличить биостабильность и улучшить механические свойства матрикса. Тем не менее некоторые недостатки хитозана, такие как деформация и слабая биостабильность в тканях человека, препятствуют его применению в области тканевой инженерии.

Другие природные полимеры — фибрин и желатин — также обладают высокой биосовместимостью, но эффективно используются только в качестве дополнительного компонента с другими полимерами для взаимодополнения или изменения общих биологических или механических свойств биоматериала [70–73].

Синтетические полимерные матрицы. Как правило, синтетические полимеры, такие как полиуретан и алифатические полиэфиры на основе лактида, гликолида, ϵ -капролактона, имеют менее дорогие и более надежные источники сырья. С использованием различных методов получения им возможно придавать различные физические свойства [4].

Исследования с применением синтетических полимеров для создания ЭК были направлены на возможности сочетания их с природными полимерами. Примером такой комбинированной матрицы стал препарат Integra, который состоит из бычьего коллагена и хондроитина-6-сульфата с тонкой силиконовой подложкой, выступающей в качестве временной замены эпидермису. Как сообщается, препарат дает хорошие эстетические и функциональные результаты при лечении ожогов [74]. Тем не менее инфекция по-прежнему остается наиболее частым осложнением после использования Integra [75–77]. Тщательная подготовка раневого ложа перед применением этой модели (или аналогичного типа искусственных биологических материалов) и отсутствие инфицирования после нало-

жения эквивалента имеют решающее значение для обеспечения хорошего заживления. В настоящее время, благодаря новым перевязочным средствам, таким как Acticoat, который применяют в виде дополнительной повязки на Integra [78], а также использованию других антисептических технологий [79–81], риск инфицирования снижается.

Другим комбинированным препаратом, который в последнее время получает все большее распространение, является MatriDerm. Он состоит из бычьего коллагена и гидролизата эластина. Было высказано предположение о том, что, в отличие от Integra, который имеет антигенные свойства из-за присутствия хондроитин-6-сульфата, сочетание коллагена и эластина в MatriDerm может способствовать васкуляризации быстрее, благоприятствуя вращанию клеток и образованию сосудов, улучшая стабильность и эластичность регенерирующей ткани [78]. Кроме того, MatriDerm обладает более высокой скоростью деградации по сравнению с Integra [82].

Виды кожных эквивалентов

Эквивалент кожи в зависимости от назначения может представлять собой монокультуру и содержать только слой эпидермиса или только слой дермы либо иметь полнослойную структуру [2]. Таким образом, существующие виды ЭК можно разделить на три основные группы: эпидермальные, дермальные и полнослойные.

Эпидермальный тип эквивалента

Для создания такого типа ЭК используют кератиноциты. В зависимости от источника получения клеток такие эквиваленты могут быть аутологичными (источник клеток — кожа самого пациента) или аллогенными (клетки получены из кожи донора). Для выделения кератиноцитов достаточно лоскута кожи размерами 1–2 см². С помощью ферментов и механических воздействий эпидермис отделяют от дермы, затем дополнительной ферментативной обработкой получают суспензию отдельных кератиноцитов. Первичные кератиноциты культивируют до нескольких недель в лаборатории, в результате получают пласты кератиноцитов, в несколько раз превышающие по площади размер донорского кожного лоскута [1, 83]. Первыми, кто использовал пласты культивированного эпителия, созданного из аутологичных кератиноцитов, для трансплантации двум пациентам с обширными ожогами, был N.E. O'Connell с соавт. [84, 85]. Эпидермальные ауто трансплантаты (ЭА) впоследствии были также использованы для постоянного покрытия обширных ожогов еще двух пациентов [85]. Трансплантация выращенных эпидермальных пластов была успешно применена и в России для лечения ожоговых больных [86].

Одним из главных недостатков ЭА является сла-

бая приживаемость трансплантата, главным образом на ранах, лишенных дермальных элементов, даже при условии правильного культивирования кератиноцитов [87–89]. Еще в середине 1980-х гг. С.В. Сиопо с соавт. была продемонстрирована важность наличия дермального компонента, они сообщили о хорошей приживаемости ЭА, помещенных на здоровую васкуляризованную аллогенную дерму [90, 91]. Однако у предложенного ими метода есть свои недостатки. Во-первых, в некоторых странах, где трансплантация органов и тканей до сих пор не распространена, аллотрансплантаты кожи могут быть не доступны [92, 93]. Во-вторых, лоскуты аллогенной (трупной) дермы несут риски, связанные с возникновением инфекции или отторжения. В-третьих, сложно скоординировать два последовательных этапа трансплантации: сначала помещение на рану аллотрансплантатов дермы, а потом ЭА. Было отмечено, что в случае отторжения аллогенной дермы перед использованием культивируемых ЭА данный метод лечения для пациента становится недоступным [94]. И, наконец, высокая стоимость производства ЭА часто указывается во многих обзорах в качестве одного из основных препятствий для их широкого использования [95–97].

Дермальный тип эквивалента

Как правило, он представляет собой клетки соединительной ткани — фибробласты в совокупности с коллагеновой матрицей (подложкой). Клетки могут заселять поверхность и/или весь объем подложки. Дермальный эквивалент может быть создан на основе других клеток соединительной ткани — МСК, а в качестве внеклеточного матрикса могут быть использованы практически любые из существующих на сегодняшний день трехмерных подложек. По литературным данным, в настоящее время существует много коммерчески доступных дермальных эквивалентов и многие из таких продуктов хорошо проанализированы и протестированы на уровне доклинических и клинических испытаний [78, 98–101]. Большинство современных биосовместимых дермальных трансплантатов в некоторой степени способны имитировать основные свойства соединительной ткани кожи человека, обеспечивая структурную целостность, эластичность и наличие сосудистого русла. Фибробласты легко выделять и технологически просто выращивать, в то же время они являются активным клеточным компонентом, способны структурировать коллаген дермы, стимулировать грануляции ран и секретировать ряд факторов роста, ускоряющих регенерацию кожи. Неудивительно, что дермальные эквиваленты с фибробластами получили широкое распространение во всем мире.

Тем не менее в случае использования дермальных эквивалентов остается проблема эпителизации обширных повреждений кожи и в большинстве случаев применение таких продуктов совмещено с использо-

ванием аутоотрансплантатов кожи для постоянного покрытия [102].

Дермальные эквиваленты с использованием синтетических материалов начали разрабатывать в 1990-е гг., но в настоящее время их используют менее широко. К ним относятся Transcyte, который состоит из аллогенных фибробластов неонатальной крайней плоти человека, связанных с кремниевой мембраной и выращенных на свином коллагене, покрывающем нейлоновую сетку, и Dermagraft, состоящий из криоконсервированных аллогенных фибробластов человека, которые получают из кожи крайней плоти новорожденных, выращенных на биodeградируемой сеточке из полиглактина (викрила) [103]. Известно, что обоих этих продуктов в настоящее время нет на рынке, но данные технологии были лицензированы Advanced BioHealing для дальнейшего улучшения продукта [78]. В отличие от Transcyte, Biobrane до сих пор широко используют в качестве синтетического эквивалента кожи для заживления ожогов II степени во многих центрах [104–106]. Он схож по строению с Transcyte, но содержит меньшее количество неонатальных человеческих фибробластов. Его также используют в качестве перевязочного материала совместно с аутоотрансплантатами при сложной топологии раны, а также для культивирования кератиноцитов [106, 107]. Популярность Biobrane связана с его универсальностью и низкой стоимостью по сравнению с Transcyte при высокой эффективности в лечении ожогов II степени [108].

Оригинальный дермальный эквивалент был разработан в России в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. В трехмерный коллагеновый гель заключали фибробласты, предварительно выращенные на желатиновых или коллагеновых микроносителях. Микроносители также являются своеобразной трехмерной матрицей в виде мелких (50–70 мкм) гладких или пористых сфер с более длительным в сравнении с гелем периодом биodeградации. Такой эквивалент лучше заполняет полнослойные глубокие дефекты соединительной ткани, например свищи [109].

Полнослойный тип эквивалента

Полнослойный тип ЭК, или, как его принято называть, живой эквивалент кожи, состоит из эпидермального и дермального слоев.

Перспективным аутологичным кожно-эпидермальным эквивалентом является композитный культивируемый заменитель кожи, разработанный в Цинциннати (США). Этот ЭК состоит из коллаген-глюкозаминогликановой подложки, которая содержит аутологичные фибробласты и кератиноциты. Данный продукт, известный в настоящее время как RegmaDerm [2], может быть создан в течение 30 дней и в состоянии обеспечить постоянную замену дермального и эпидермального слоев кожи. Он показан для лечения больших дефектов кожи, однако до сих пор не получил одобрения

FDA (Food and Drug Administration) на применение в клинике [94, 110–114].

В 2009 г. немецкая группа ученых сообщила о разработке композитного аутоотрансплантата с использованием MatriDerm в качестве матрицы для выращивания аутологичных фибробластов и кератиноцитов [115]. Было заявлено, что разработанный полнослойный кожный эквивалент гомологичен здоровой коже человека. Основаниями послужили характеристики эпидермального слоя, сравнение маркеров дифференцировки и пролиферации клеток, наличие функциональной базальной мембраны. Трансплантации этого эквивалента показали положительный результат с полным закрытием относительно небольших по размеру ран (до 9×6 см) [116, 117].

Самым известным из полнослойных ЭК является Apligraf. Это ЭК, состоящий из дермального компонента — матрицы из бычьего коллагена 1-го типа, заселенной неонатальными фибробластами человека, и эпидермального слоя, образованного из выращенных кератиноцитов на поверхности эквивалента. В нескольких многоцентровых рандомизированных клинических исследованиях была показана эффективность применения Apligraf для лечения длительно не заживающих ран, венозных и диабетических трофических язв [118, 119], в результате данный препарат одним из первых тканеинженерных эквивалентов был одобрен FDA для лечения кожных ран.

В России исследования по разработке и применению живых ЭК начались с конца 90-х гг. прошлого века [120]. Работы в основном вели в двух направлениях: живые ЭК с аутологичными клетками пациента, которые встраиваются в пораженные ткани, и живые ЭК с аллогенными клетками, приживляющимися в месте трансплантации на короткое время, достаточное для нормализации течения репаративного процесса и стимулирования регенерации тканей реципиента [121–123]. Подобные клеточные конструкции используются для восстановления различных эпителиомезенхимальных дефектов. Причем их применение не ограничивается только кожными ранами [124].

Приживаемость описанных полнослойных ЭК может быть ограничена отсутствием кровеносных и лимфатических сосудов, а также кожных придатков. Именно поэтому активно ведутся работы на уровне доклинических исследований по разработке эквивалентов, близких по структуре и свойствам нормальной коже человека [8, 125].

Несмотря на то, что использование уже имеющихся коммерческих ЭК привело к значительному прогрессу в области регенеративной медицины, их применение пока не является рутинным из-за высокой стоимости, ограниченной эффективности, а также неспособности воссоздавать кожные придатки [126].

Перечень наиболее распространенных коммерческих продуктов ЭК, прошедших частично или полностью клинические исследования в качестве трансплантатов, представлен в табл. 1.

Коммерческие продукты эквивалентов кожи, применяемые в клинике в качестве трансплантатов (по: Krishna S.V., Henry C., 2014 [127] с изменениями)

Названия	Описание продукта	Примечания FDA	Клинические исследования	Преимущества/Недостатки
<p>Epiceel® Genzyme Tissue Repair Corporation Cambridge, MA, USA (2007) Перманентный заменитель кожи с живыми клетками Культивированный эпителиальный аутологичный трансплантат</p>	<p>Аутологичные кератиноциты с мышечными фибробластами культивируются для получения эпидермальных аутологичных трансплантатов, которые затем превращают в пласты Используется как адьювант к расщепленному кожному лоскуту или отдельно, если таковой недоступен из-за площади или глубины ожогов</p>	<p>Рекомендовано для лечения глубоких ожогов (более или равных 30% площади тела) и при удалении рваных пятен При диабетических или венозных язвах</p>	<p>Ожоги: Не было проведено рандомизированных контролируемых исследований (РКИ) для определения эффективности этого продукта для улучшения здоровья при глубоких ожогах В большом исследовании в единственном центре Epiceel был применен для 30 ожоговых пациентов со средней площадью ожога в 37±17% тела. Достигнуто постоянное покрытие в среднем 26% площади тела по сравнению с классическими аутотрансплантатами (в среднем 25% площади). Последний результат составлял в среднем 69±23%, 90% из этих сильно обожженных пациентов выжили [128]</p>	<p>Преимущества: Использование аутологичных клеток исключает отторжение Постоянное покрытие большой раневой поверхности, особенно при крупных ожогах Недостатки: Долгое время культивирования — 3 нед Нестабильная приживаемость Посредственные долгосрочные результаты Возможно использование только сразу после получения Дороговизна Риск образования волдырей, контрактур, инфекций</p>
<p>Laserskin® Fidia Advanced Biopolymers Abano Terme, Italy Перманентный заменитель кожи</p>	<p>Аутологичные кератиноциты и фибробласты, полученные из биопсии кожи, культивируются на микроперфорированном лазером биодegradуемом матриксе из этерифицированной бензилном глицероновой кислоты. Клетки пролиферируют и мигрируют сквозь матрицу Микроперфорации работают как дренаж для раневых выделений</p>	<p>При диабетической стопе и венозной язве ноги, ожогах неполной глубины, витилиго</p>	<p>Диабетическая стопа: Многочисленные РКИ на пациентах с длительно незаживающей диабетической стопой, получивших лечение (аутотрансплантат NuLogoraft-3D и затем аутотрансплантат Laserskin после 2 нед), и сравнение с контролем (парафиновая марля) показали достоверную эффективность лечения [129] Раны: В ретроспективном наблюдательном исследовании 30 пациентов с хроническими ранами, не реагирующими на традиционные методы лечения, для терапии глубоких язв ноги применялись кератиноциты из Laserskin или фибробласты из NuLogoraft-3D. Раны потом закрывались повязкой с нанокристаллиновым серебром. Наблюдалось уменьшение количества и площади ран, выделений из них. Группа, лечившаяся с помощью кератиноцитов, показала существенно лучший уровень заживления по сравнению с большими, получившими аллогенные фибробласты [130] Коллагеновые матрицы, такие как Integra, являются плохими реципиентами для кератиноцитов, хотя некоторые исследования показали использование Laserskin на неоэдермисе Integra после того, как силиконовую мембрану убирают на 14–21-й день после трансплантации [131, 132]</p>	<p>Преимущества: Использование аутологичных клеток исключает отторжение Может быть получено в меньшие сроки по сравнению с конфлюэнтными эпидермальными пластами Не требует использования диспазы для снятия с культуральных флаконов Хорошая приживаемость Низкий уровень инфекций Простота применения Прозрачность позволяет контролировать состояние раны при смене повязки Недостатки: Доступно только в Европе Жизнеспособность всего два дня от получения до применения Дороговизна</p>
<p>TransCyte® Shire Regenerative</p>	<p>Человеческие аллогенные фибробласты, полученные</p>	<p>Временное покрытие глубоких и частич-</p>	<p>В предеарительном исследовании 33 ребенка с поверхност-</p>	<p>Преимущества: Просто удалить по сравнению с аллогraftом</p>

Названия	Описание продукта	Примечания FDA	Клинические исследования	Преимущества/Недостатки
Medicine, Inc. San Diego, CA, USA; Smith & Nephew, Inc., Largo, FL, USA (1997) Временная замена кожи Композитный матрикс	из крайней плоти новорож- денных, рассаженные на покрытую силиконом раз- лагаемую сетчатую губку из нейлона и культивируемые ex vivo в течение 4–6 нед; секретирующие компоненты мезенхимного матрикса и факторы роста	ных ожоговых ран Для хронических язв ноги, диабе- ческих язв стопы, остающихся больше 6 нед, венозных язв и пролежней	ными ожогами в случайном порядке получали TransCute, Biobrane или мазь Silvazine. Среднее время реэпителизации составля- ло 7,5, 9,5 и 11,2 сут соответственно. Раны, потребовавшие аутоотраплантатов, составили 5, 17 и 24% соответственно. TransCute способствовал более быстрой реэпителизации, требовал меньшего числа повязок и меньшего количества ауто- трансплантата по сравнению с Biobrane и Silvazine [133] В РКИ с участием 21 взрослого пациента с поверхностными ожогами лица терапия TransCute существенно уменьшила вре- мя ежедневного ухода за ранами (0,35±0,10 против 1,9±0,5 ч) и время реэпителизации (7±2 против 13±4 сут), а также болевые ощущения (2±1 против 4±2) по сравнению с пациентами, кото- рых лечили бацитрацином [134] 20 педиатрических пациентов с ожогами более 7% тела были подвергнуты лечению TransCute, результаты сравнили с дан- ными пациентов, получавших стандартную терапию антими- кробными мазями. Только одному ребенку в группе TransCute потребовался аутоотраплантат по сравнению с 7 детьми в группе со стандартной терапией. Кроме того, детям, которых лечили TransCute, потребовалось гораздо меньшее время для стационарного лечения (5,9 против 13,8 сут) [135] 110 пациентов с глубокими непроникающими ожогами лечили с помощью TransCute и дермаабразии и сравнили результаты с данными из American Burn Association Patient Registry. Исследо- мым пациентам с площадью ожога 0–19,9% потребовалось 6,1 сут стационарного лечения против 9 сут [136] Раны:	Широко используется при неглубоких ожогах Ускоряет заживление Длительность хранения составляет 1,5 года Недостатки: Дороговизна
Derma graft® Shire Regenerative Medicine, Inc. San Diego, CA, USA (2001)	Замороженные аллогенные неонатальные фибробласты, полученные из крайней пло- ти новорожденных и культи- вированные на биорезорби-	Для полнотрубных диабетических язв нижних конечностей, существующих бо- лее 6 нед, проникаю-	Проведено РКИ использования TransCute и сульфадиазина серебра у 11 пациентов с парными расположениями ран. Раны, которые подвергали действию TransCute, заживали гораздо быстрее до состояния реэпителизации (11,14 против 18,4 сут). Наблюдение за ранами показало, что на 3, 6 и 12-й месяц они заживали с существенно меньшим гиперпролиферативным рубцева- нием по сравнению с лечением сульфадиазином серебра [137] Проведено РКИ использования TransCute и сульфадиазина серебра у 11 пациентов с парными расположениями ран. Раны, которые подвергали действию TransCute, заживали гораздо быстрее до состояния реэпителизации (11,14 против 18,4 сут). Наблюдение за ранами показало, что на 3, 6 и 12-й месяц они заживали с существенно меньшим гиперпролиферативным рубцева- нием по сравнению с лечением сульфадиазином серебра [137] Проведено РКИ использования TransCute и сульфадиазина серебра у 11 пациентов с парными расположениями ран. Раны, которые подвергали действию TransCute, заживали гораздо быстрее до состояния реэпителизации (11,14 против 18,4 сут). Наблюдение за ранами показало, что на 3, 6 и 12-й месяц они заживали с существенно меньшим гиперпролиферативным рубцева- нием по сравнению с лечением сульфадиазином серебра [137]	Преимущества: Полупрозрачность позволяет проводить продолжи- тельные наблюдения подлежащей раневой поверх- ности

Названия	Описание продукта	Примечания FDA	Клинические исследования	Преимущества/Недостатки
Постоянная или временная замена кожи	руемом коллагене на губке из полилактина (Dexon) или полилактина-910 (Vicryl) в течение нескольких недель	ших сквозь дерму, но не достигающих сухожилий, мышц или с костей	раны полностью закрылись по сравнению с 18,3% в контрольной группе. Хотя появление неблагоприятных эффектов было похожим у обеих групп, у опытной 19,0% испытали связанные язвami побочные заболевания (инфекция, остеомиелит, целлюлит) по сравнению с 32,5% в контрольной [138]	Фибробласты из клеточного банка прошли тест на безопасность Проще снимать, чем аллотрансплантат, и больший уровень удовлетворенности у пациентов
Терапия живыми клетками	Биодеградируемая губка исчезает через 3–4 нед	Для хронических ран и нейинфекционных ран. Может быть использовано как постоянное или временное покрытие и для поддержания приживления расщепленного кожного лоскута	РКИ на 28 пациентах с хроническими диабетическими язвами (дольше 6 нед) сравнивало вмешательство с использованием Dermagraft с салinовой марлей с контролем (только салinовая марля). К 12-й неделе 71,4% язв было вылечено в опытной группе и 14,3% — в контрольной. Раны закрывались существенно быстрее в опытной группе [139]	Равен аллотрансплантату или лучше его по приживаемости, времени заживления, раневым выделениям и инфекции Нет никаких неблагоприятных реакций, например отторжений Недостатки:
Аллогенный матрикс, полученный из неонатальных фибробластов человека	исчезает через 3–4 нед		Рандомизированное, слепое исследование DOLCE по сравнению различий между бесклеточными (Oasis), клеточными (Dermagraft) матрицами и стандартным лечением диабетических язв [140]	Используется для временного покрытия Время хранения — 6 мес Противопоказания: Клинически инфицированные язвы Свищевые язвы Гиперчувствительность к говяжьим продуктам
			Многоцентровое клиническое исследование Dermagraft при лечении язв у 62 пациентов после хирургической санации. Пациентов перевязывали салinовой марлей или повязками из встепенного полиуретана еженедельно. К 12-й неделе у 44% пациентов наблюдалось полное закрытие ран, 52% вылечились к 20-й неделе. Медиана составила 13 нед. Dermagraft показал себя безопасным и эффективным в лечении незаживающих диабетических язв [141]	
			Многоцентровое рандомизированное слепое исследование проводили для оценки ранозаживления у 50 пациентов с диабетическими язвами. Пациентов разбили случайным образом на четыре группы (три отдельные дозировки Dermagraft и одна контрольная группа). Была получена дозозависимая кривая: язвы, лечившиеся наиболее высокой дозой Dermagraft, заживали существенно лучше по сравнению с традиционными методами. 50% язв с Dermagraft и 8% контрольных полностью зажили [142]	
			Венозные язвы ног: Многоцентровое РКИ оценивало Dermagraft с компрессионной терапией и компрессионную терапию в отдельности. С язвами менее 12 мес 52% пациентов с Dermagraft против 37% в контроле вылечились за 12 нед. Для язв менее 10 см ² полное заживление на 12-й неделе наблюдалось у 47% опытных пациентов и у 39% контрольных [143]	
			В РКИ на 18 пациентах с венозными язвами ног применялось лечение Dermagraft с компрессионной терапией или только компрессионная терапия. Заживление оценивали, отслеживая язвы и планиметрически. Уровень заживления был существенно увеличен у пациентов опытной группы [144]	

Названия	Описание продукта	Примечания FDA	Клинические исследования	Преимущества/Недостатки
<p>Apligraf®/Graftskin® Organoepithesis, Canton, MA, USA (1998, 2001)</p> <p>Постоянное замещение кожи</p> <p>Терапия живыми клетками</p> <p>Композитная матрица</p>	<p>Эпидермальные аллогенные кератиноциты, полученные из крайней плоти новорожденных, культивированные на геле из бычьего коллагена первого типа с живыми неонатальными аллогенными человеческими фибробластами в толще дермального матрикса</p>	<p>Хронические частичные и глубокие застойные венозные язвы и глубокие язвы диабетической стопы</p> <p>При буллезном эпидермолитизе, восстановлении после повторяющейся грыжи, пролежней, реконструкции ожоговых повреждений</p>	<p>Венозные язвы ног:</p> <p>В обзоре Cochrane показано, что двухслойный ЭК вместе с компрессионной повязкой ускоряет заживление венозных язв по сравнению с использованием только компрессионной повязки [145]</p> <p>В многоцентровом РКИ на 240 пациентах со сложнозаживающимися хроническими ранами (более года), которые получали или Graftskin с компрессией, или только компрессионную терапию, в первом случае отмечена гораздо большая эффективность в достижении полного закрытия раны за 8 нед (32% против 10%) и за 24 нед (47% против 19%) [146]. Предыдущее исследование той же группы показало сходные результаты [147]</p> <p>Ожоги:</p> <p>В многоцентровом РКИ на 38 пациентах с ранами расщепленного лоскута Apligraf наносили на размельченный ауто трансплантат, в то время как на контрольные места наносили только ауто трансплантат. Не было различий в проценте приживаемости с и без Apligraf. Опытная группа продемонстрировала существенно улучшенную васкуляризацию, пигментацию, ранозаживление и оценку ожогов по системе Vapsolevig. Показаны косметические и функциональные преимущества Apligraf по сравнению с контролем [118]</p> <p>Заживление донорских мест:</p> <p>РКИ с 60 донорскими местами, которые лечили ауто трансплантатом, размельченным Apligraf или полиуретановой пленкой. Время заживления с Apligraf (7,6 сут) существенно меньше, чем с полиуретановой пленкой</p> <p>В мультицентровом РКИ 10 пациентов лечили Apligraf, Apligraf с дермой и полиуретановой пленкой. Донорские места расщепленного лоскута после операции не показали различий ни в чем, включая образование базальной мембраны через 4 нед [148]</p> <p>Диабетические язвы:</p> <p>В многоцентровом РКИ с 72 пациентами сравнили результаты использования Apligraf вместе со стандартной терапией и только стандартной терапии в лечении диабетических язв. Наблюдалось существенное уменьшение времени до полного закрытия в опытной группе (у 51,5% по сравнению с контрольной (26,3%) к 12-й неделе [149])</p> <p>В многоцентровом РКИ с 208 пациентами, произвольно разделенными для лечения язв Graftskin или смоченной сапином марлей, 56% опытных пациентов достигли полного ранозаживления по сравнению с 38% в контрольной группе к 12-й неделе.</p>	<p>Преимущества:</p> <p>Маленькие раны требуют однократного применения</p> <p>Улучшенный косметический (рубцовые ткани, пигментация, текстура) и функциональный эффект на хронических ранах</p> <p>Первичная роль в лечении хронических язв</p> <p>Недостатки:</p> <p>Крупные раны могут потребовать нескольких повторов</p> <p>Время жизни 5 дней</p> <p>Возможность заражения вирусами. Скрининг материнской крови, донорских клеток, клеточных банков для безопасности</p> <p>Этичность использования биологического материала: свиной коллаген (индусы, буддисты, вегетарианцы), крайняя плоть (квакеры)</p> <p>Противопоказания:</p> <p>Инфицированные раны</p> <p>Аллергия к бычьему коллагену</p>

Названия	Описание продукта	Примечания FDA	Клинические исследования	Преимущества/Недостатки
<p>ОтСел® Forticell Bioscience, New York City, NY, USA (1998) Терапия живыми клетками Композитный матрикс</p>	<p>Кератиноциты и дермальные фибробласты, полученные из крайней плоти новорожденных, культивируются в отдельных слоях пубки из бычьего коллагена первого типа В процессе заживления аутологичные клетки кожи заменяют клетки продукта</p>	<p>Одобрено в 2001 г. для использования на пациентах с дистрофическим буллезным эпидермолизом, которым проводили операцию по реконструкции руки, для закрытия и излечения ран, полученных при операции, включая донорские места Одобрено для ауто-трансплантации на донорские места у ожоговых пациентов (поверх расщепленных лоскутов для улучшения внешнего вида и функциональности)</p>	<p>Кривая Каплана–Мейера до полного заживления также была существенно ниже для Graftskin (65 дней) по сравнению с контролем (90 дней). Остеомилит и ампутации нижних конечностей гораздо реже происходили в опытной группе [150] Лечение APrigraft в совокупности с тщательным уходом за раной дало 12% снижение стоимости лечения в течение первого года по сравнению со стоимостью только тщательного ухода [151] <i>Раны:</i> В РКИ с 31 пациентом, которым требовалось полноглубинное хирургическое иссечение для немеланомного рака кожи, APrigraft снизил послеоперационную боль, но не было определено, может ли он уменьшить сроки заживления или улучшить эстетический результат [152] В контролируемом клиническом исследовании было создано 48 дермальных ран, для лечения которых использовали APrigraft, расщепленный лоскут и обычную повязку. APrigraft продемонстрировал больше клеточных проникновений, но меньше васкуляризации по сравнению с контрольными группами. Он также продемонстрировал выживание аллогенных клеток в острых ранах до 6 нед и был рекомендован для лечения острых хирургических ран [153]</p>	<p><i>Преимущества:</i> Срок хранения 9 мес <i>Недостатки:</i> Хранение в заморозке Не может использоваться на инфицированных ранах, у пациентов с аллергиями на любой животный продукт или у пациентов с аллергиями на пенициллин, гентамицин, стрептомицин или мафотирицин Б</p>

Названия	Описание продукта	Примечания FDA	Клинические исследования	Преимущества/Недостатки
GraftJacket® Wright Medical Technology, Inc., Arlington, TX, USA, licensed by KCI USA, Inc., San Antonio, TX, USA	Микроинжированная децеллюляризованная человеческая дерма с дермальным матриксом и нетронутый базальной мембраной для прорастания кровеносных сосудов	При хронических, диабетических и венозных ранах Лекарственное средство только для использования в качестве постоянной замены кожи при ожогах (глубокие и поверхностные раны, свищи, восстановление сухожилий, такия как вращательная манжета плеча) Не подлежит допуску FDA, так как основывается на человеческих клетках или тканях	Диабетические язвы: Многоцентровое исследование лечения 100 хронических полнотелых ран нижних конечностей у 75 пациентов с диабетом показало уровень заживления в 91%, было предложено использовать этот метод в лечении сложных ран нижних конечностей. Не обнаружено значительных отличий в инкорпорации матрикса и полного заживления. Среднее время полного заживления составило 13,8 нед [154] В многоцентровом РКИ на 86 пациентах в течение 12 нед, сравниваемом GraftJacket со стандартными методами лечения диабетических язв, пропорция полностью вылеченных язв между группами была статистически значима. В опытной группе шансы полного заживления были в 2,7 раза выше, чем в контрольной [155] Исследование, оценивающее диабетических пациентов с ранами нижних конечностей, показало, что раны, которые лечили GraftJacket, показывали существенно более высокий уровень заживления по сравнению с контролем на сроке в 1 мес В пилотном слепом исследовании 40 пациентов с санированными диабетическими ранами нижних конечностей действие GraftJacket сравнили с действием перевязочного гидрогелевого материала Surasol. На сроке в 4 нед отмечено существенное уменьшение размеров язв в опытной группе по сравнению с контролем. К 12-й неделе 86% опытных пациентов были вылечены по сравнению с 5% контрольных [156] Одноцентровое РКИ, сравнивающее комплексное воздействие (хирургическая санация + GraftJacket + компрессионная повязка, вымоченная в минеральном масле) и контроль (раневой гель с марлевой повязкой) при лечении полнотелых хронических незаживающих ран нижних конечностей у 28 пациентов с диабетом, показало, что на сроке в 16 нед у 12 из 14 пациентов опытной группы произошло полное закрытие ран по сравнению с 4 из 14 пациентов контрольной группы. Существенные отличия были отмечены по глубине и площади ран [157] Многоцентровое исследование на 12 пациентах с диабетическими язвами и сложными глубокими свищевыми ранами нерегулярной структуры показало, что лечение с помощью GraftJacket Xpress Scaffold (микронизованная, децеллюляризованная губка из мягких тканей, которая может быть доставлена посредством шприца в раневую полость) привело к полному заживлению ран у 10 из 12 пациентов к 12-й неделе [158]	Преимущества: Время хранения 2 года Делается заранее для клинического применения Однократная процедура Подходит и для глубоких, и для поверхностных ран Недостатки: Хранение в заморозке
Постоянная замена кожи Аллотрансплантат из человеческой трупажной кожи				

Окончание таблицы 1

Названия	Описание продукта	Примечания FDA	Клинические исследования	Преимущества/Недостатки
RegraDerm® Regenicin, Inc., Little Falls, NJ, USA Постоянная замена кожи	Аутологичные кератиноциты и фибробласты, культивированные на подложке из бычьего коллагена	Лекарственное средство только для использования как постоянная замена коже при ожогах	—	Преимущества: Нет риска отторжения Постоянная замена для крупных ожоговых повреждений Недостатки: Нет данных по клиническим или долгосрочным исследованиям
StrataGraft® The Luminis Group, Ltd. for Stratatech Corp.	Иммортализованные запатентованные кератиноциты линии NIKS® и дермальные фибробласты на подложке коллагена В процессе заживления собственные клетки кожи заменяют клетки продукта	Лекарственное средство для использования в качестве постоянной замены кожи при ожогах и трофических язвах	StrataGraft находится на III фазе разработки для лечения тяжелых глубоких и частичных ожогов. Решение об утверждении FDA ожидается к 2020 г.	Нет данных по клиническим или долгосрочным исследованиям

Т а б л и ц а 2

Коммерческие и некоторые лабораторные (некоммерческие) продукты кожных эквивалентов, применяемые для исследования проницаемости препаратов и токсикологического анализа (нет одобрения FDA)

Название	Компания	Описание продукта
EpiSkin®	SkinEthic (Франция)	Состоит из человеческих кератиноцитов, которые культивируют на подложке из коллагена и которые способны дифференцироваться с образованием функционального ротового слоя эпидермиса
EpiDerm®	MatTek (США)	Применяют неонатальные эпидермальные кератиноциты, которые способны образовывать многослойную высокодифференцированную модель человеческого эпидермиса
EpiDermFT®	MatTek (США)	Используют совместное культивирование неонатальных дермальных фибробластов с неонатальными эпидермальными кератиноцитами для формирования многослойной высокодифференцированной модели человеческого эпидермиса и дермы
Strata Test®	Strata-Tech (США)	Полнослойная модель кожи человека, для которой используется клеточная линия человеческих кератиноцитов NIKS

Название	Компания	Описание продукта
Epidermal Skin Test 1000® (EST1000)	CellSystems Biotechnologie, GmbH (Германия)	Реконструированная модель эпидермиса, выполненная из кератиноцитов человека, которая представлена полностью дифференцированным эпидермисом со слоями жизнеспособных и ороговевших клеток
Advanced Skin Test 2000® (AST2000)	CellSystems Biotechnologie, GmbH (Германия)	Является полнослойной моделью кожи человека, состоящей из фибробластов в качестве базального слоя кожи и кератиноцитов в качестве эпидермиса
Эпидермальная модель кожи Лейдена для оценки состояния кожи после воздействия на нее агрессивных химических агентов	Группы ученых под руководством М. Ропес, J.A. Bouwstra [161, 162] и A. El-Ghalboui [163] (Нидерланды)	Является полнослойной моделью кожи человека, состоящей из фибробластов в трехмерном коллагеновом матриксе в качестве базального слоя кожи и кератиноцитов в качестве эпидермиса
Модель для исследования долгосрочного восстановления кожи и эпидермальной функции	К. Воейтке с соавт. (Германия) [164]	Является полнослойной моделью кожи человека, состоящей из фибробластов в качестве базального слоя кожи и кератиноцитов в качестве эпидермиса

Тканевые эквиваленты для моделирования кожи *in vitro*

Другая область применения ЭК связана с исследованием препаратов на трансдермальную проницаемость и токсикологическим анализом веществ. В настоящее время в Европейском союзе испытания косметических препаратов на животных запрещены, даже при отсутствии альтернативных методов (Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies). Традиционно, в качестве моделей для оценки проницаемости веществ через кожу используют лоскуты трупной кожи человека и лоскуты кожи животных [160]. Недостатком первой является труднодоступность и высокая вариабельность результатов от образца к образцу. Кожа животных — легкодоступный материал, но она морфологически отличается от кожи человека. Данная ситуация обуславливает коммерческую потребность в ЭК, которые служили бы в качестве подходящей тест-системы для токсикологических исследований. В табл. 2 представлены основные коммерчески доступные эквиваленты, которые уже используют для тестирования фармацевтических и косметологических продуктов.

Заключение

Как свидетельствуют приведенные данные, в настоящее время не существует идеального коммерчески доступного эквивалента кожи для заживления ран. Все эпидермальные и дермальные продукты биоинженерии требуют либо многоступенчатой процедуры использования, либо аутоотрансплантатов для окончательной эпителизации раны.

Однако быстрый прогресс в области тканевой инженерии и разработка различных подходов к созданию заменителей кожи человека, в том числе с использованием стволовых клеток, дает надежду, что такой продукт будет сконструирован в ближайшем будущем.

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №15-29-04851).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Groeber F., Holeiter M., Hampel M., Hinderer S., Schenke-Layland K. Skin tissue engineering — in vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63(4–5): 352–366, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.005>.
2. MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* 2007; 445(7130): 874–880, <https://doi.org/10.1038/nature05664>.
3. Singer A.J., Clark R.A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341(10): 738–746, <https://doi.org/10.1056/nejm199909023411006>.

4. Zhong S.P., Zhang Y.Z., Lim C.T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanotechnol* 2010; 2(5): 510–525, <https://doi.org/10.1002/wnan.100>.
5. Groen D., Poole D.S., Gooris G.S., Bouwstra J.A. Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808(6): 1529–1537, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2010.10.015>.
6. Feng X., Coulombe P.A. A role for disulfide bonding in keratin intermediate filament organization and dynamics in skin keratinocytes. *J Cell Biol* 2015; 209(1): 59–72, <https://doi.org/10.1083/jcb.201408079>.
7. Sahle F.F., Gebre-Mariam T., Dobner B., Wohlrab J., Neubert R.H. Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. *Skin Pharmacol Physiol* 2015; 28(1): 42–55, <https://doi.org/10.1159/000360009>.
8. Leroy M., Labbé J.F., Ouellet M., Jean J., Lefèvre T., Laroche G., Auger M., Pouliot R. A comparative study between human skin substitutes and normal human skin using Raman microspectroscopy. *Acta Biomater* 2014; 10(6): 2703–2711, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.007>.
9. Matsui T., Amagai T. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol* 2015; 27(6): 269–280, <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv013>.
10. Rheinwald J.G., Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6(3): 331–343, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(75\)80001-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(75)80001-8).
11. Adams J.C., Watt F.M. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes $\alpha 5 \beta 1$ integrin loss from the cell surface. *Cell* 1990; 63(2): 425–435, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90175-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90175-e).
12. Higham M.C., Dawson R., Szabo M., Short R., Haddow D.B., MacNeil S. Development of a stable chemically defined surface for the culture of human keratinocytes under serum-free conditions for clinical use. *Tissue Eng* 2004; 9(5): 919–930, <https://doi.org/10.1089/107632703322495565>.
13. Lamb R., Ambler C.A. Keratinocytes propagated in serum-free, feeder-free culture conditions fail to form stratified epidermis in a reconstituted skin model. *PLoS One* 2013; 8(1): e52494, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052494>.
14. Sorrell J.M., Caplan A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 5): 667–675, <https://doi.org/10.1242/jcs.01005>.
15. Reemann P., Reimann E., Ilmjärvi S., Porosaar O., Silm H., Jaks V., Vasar E., Kingo K., Kõks S. Melanocytes in the skin — comparative whole transcriptome analysis of main skin cell types. *PLoS One* 2014; 9(12): e115717, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115717>.
16. Nakazawa K., Kalassy M., Sahuc F., Collombel C., Damour O. Pigmented human skin equivalent — as a model of the mechanisms of control of cell-cell and cell-matrix interactions. *Med Biol Eng Comput* 1998; 36(6): 813–820, <https://doi.org/10.1007/bf02518888>.
17. Klar A.S., Güven S., Biedermann T., Luginbühl J., Böttcher-Haberzeth S., Meuli-Simmen C., Meuli M., Martin I., Scherberich A., Reichmann E. Tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts prevascularized with adipose-derived cells. *Biomaterials* 2014; 35(19): 5065–5078, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.049>.
18. Marino D., Luginbühl J., Scola S., Meuli M., Reichmann E. Bioengineering dermo-epidermal skin grafts with blood and lymphatic capillaries. *Sci Transl Med* 2014; 6(221): 221ra14–221ra14, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006894>.
19. Weissman I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100(1): 157–168, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81692-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81692-x).
20. Cha J., Falanga V. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25(1): 73–78, <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.10.002>.
21. Butler K.L., Goverman J., Ma H., Fischman A., Yu Y.M., Bilodeau M., Rad A.M., Bonab A.A., Tompkins R.G., Fagan S.P. Stem cells and burns: review and therapeutic implications. *J Burn Care Res* 2010; 31(6): 874–881, <https://doi.org/10.1097/bcr.0b013e3181f9353a>.
22. Cottler-Fox M.H., Lapidot T., Petit I., Kollet O., DiPersio J.F., Link D., Devine S. Stem cell mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 1: 419–437, <https://doi.org/10.1182/asheducation-2003.1.419>.
23. Fu S., Liesveld J. Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev* 2000; 14(4): 205–218, <https://doi.org/10.1054/blre.2000.0138>.
24. Kucia M., Ratajczak J., Reza R., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32(1): 52–57, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2003.09.025>.
25. Badiavas E.V., Abedi M., Butmarc J., Falanga V., Quesenberry P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 2003; 196(2): 245–250, <https://doi.org/10.1002/jcp.10260>.
26. Fathe C., Wilson L., Hutter J., Kapoor V., Smith A., Hocking A., Isik F. Contribution of bone marrow derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells* 2004; 22(5): 812–822, <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-812>.
27. Chabord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther* 2010; 21(9): 1045–1056, <https://doi.org/10.1089/hum.2010.115>.
28. Han S.K., Yoon T.H., Lee D.G., Lee M.A., Kim W.K. Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate wound healing in vitro. *Ann Plast Surg* 2005; 55(4): 414–419, <https://doi.org/10.1097/01.sap.0000178809.01289.10>.
29. Kim D.H., Yoo K.H., Choi K.S., Choi J., Choi S.Y., Yang S.E., Yang Y.S., Im H.J., Kim K.H., Jung H.L., Sung K.W., Koo H.H. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine* 2005; 31(2): 119–126, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.04.004>.
30. Akino K., Mineda T., Akita S. Early cellular changes of human mesenchymal stem cells and their interaction with other cells. *Wound Repair Regen* 2005; 13(4): 434–440, <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2005.130411.x>.
31. Ichioka S., Kouraba S., Sekiya N., Ohura N., Nakatsuka T. Bone marrow-impregnated collagen matrix for wound healing: experimental evaluation in a microcirculatory model of angiogenesis, and clinical experience. *Br J Plast Surg* 2005; 58(8): 1124–1130, <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2005.04.054>.
32. Falanga V., Iwamoto S., Chartier M., Yufit T., Butmarc J., Kouttab N. Autologous bone marrow-derived

- cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng* 2007; 13(6): 1299–1312, <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0278>.
33. Badiavas E.V., Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol* 2003; 139(4): 510–516, <https://doi.org/10.1001/archderm.139.4.510>.
34. Vojtassák J., Danisovic L., Kubes M., Bakos D., Jarábek L., Ulicná M., Blasko M. Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27(Suppl 2): 134–137.
35. Yoshikawa T., Mitsuno H., Nonaka I., Sen Y., Kawanishi K., Inada Y., Takakura Y., Okuchi K., Nonomura A. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121(3): 860–877, <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000299922.96006.24>.
36. Chermnykh E.S., Vorotelyak E.A., Gnedeva K.Y., Moldaver M.V., Yegorov Y.E., Vasiliev A.V., Terskikh V.V. Dermal papilla cells induce keratinocyte tubulogenesis in culture. *Histochem Cell Biol* 2010; 133(5): 567–576, <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0691-0>.
37. Kiseleva E.V., Chermnykh E.S., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V., Terskikh V.V., Volozhin A.I. Differentiation capacity of stromal fibroblast-like cells from human bone marrow, adipose tissue, hair follicle dermal papilla and derma. *Cell and Tissue Biology* 2009; 3(1): 42–49, <https://doi.org/10.1134/s1990519x09010064>.
38. Leirós G.J., Kusinsky A.G., Drago H., Bossi S., Sturla F., Castellanos M.L., Stela I.Y., Balañá M.E. Dermal papilla cells improve the wound healing process and generate hair bud-like structures in grafted skin substitutes using hair follicle stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3(10): 1209–1219, <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0217>.
39. Sun B.K., Siprashvili Z., Khavari P.A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science* 2014; 346(6212): 941–945, <https://doi.org/10.1126/science.1253836>.
40. Itoh M., Umegaki-Arao N., Guo Z., Liu L., Higgins C.A., Christiano A.M. Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *PLoS One* 2013; 8(10): e77673, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077673>.
41. Gledhill K., Guo Z., Umegaki-Arao N., Higgins C.A., Itoh M., Christiano A.M. Melanin transfer in human 3D skin equivalents generated exclusively from induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2015; 10(8): e0136713, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136713>.
42. Pachence J.M., Kohn J. Biodegradable polymers. In: *Principles of tissue engineering*. Elsevier BV; 2007; p. 263–277, <https://doi.org/10.1016/b978-012436630-5/50026-x>.
43. Katti D., Vasita R., Shanmugam K. Improved biomaterials for tissue engineering applications: surface modification of polymers. *Curr Top Med Chem* 2008; 8(4): 341–353, <https://doi.org/10.2174/156802608783790893>.
44. Ito Y., Liu S.Q., Nakabayashi M., Imanishi Y. Cell growth on immobilized cell-growth factor. II. Adhesion and growth of fibroblast cells on polymethyl methacrylate membrane immobilized with proteins of various kinds. *Biomaterials* 1992; 13(11): 789–794, [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(92\)90019-k](https://doi.org/10.1016/0142-9612(92)90019-k).
45. Lee K.Y., Mooney D.J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 2001; 101(7): 1869–1879, <https://doi.org/10.1021/cr000108x>.
46. Dieckmann C., Renner R., Milkova L., Simon J.C. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Exp Dermatol* 2010; 19(8): 697–706, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01087.x>.
47. Kim Y.-J., Bae H.-I., Kwon O.K., Choi M.-S. Three-dimensional gastric cancer cell culture using nanofiber scaffold for chemosensitivity test. *Int J Biol Macromol* 2009; 45(1): 65–71, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.04.003>.
48. Николаева Е.Д. Биополимеры для клеточной и тканевой инженерии. Журнал сибирского федерального университета. Серия: Биология 2014; 7: 222–233. Nikolaeva E.D. Biopolymers for tissue engineering. *Zhurnal sibirskogo federal'nogo universiteta. Seriya: Biologiya* 2014; 7: 222–233.
49. Conconi M.T., De Coppi P., Di Liddo R., Vigolo S., Zanon G.F., Parnigotto P.P., Nussdorfer G.G. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transpl Int* 2005; 18(6): 727–734, <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2005.00082.x>.
50. Burra P., Tomat S., Conconi M.T., Macchi C., Russo F.P., Parnigotto P.P., Naccarato R., Nussdorfer G.G. Acellular liver matrix improves the survival and functions of isolated rat hepatocytes cultured in vitro. *Int J Mol Med* 2004; 14(4): 511–515, <https://doi.org/10.3892/ijmm.14.4.511>.
51. van der Veen V.C., van der Wal M.B., van Leeuwen M.C., Ulrich M.M., Middelkoop E. Biological background of dermal substitutes. *Burns* 2010; 36(3): 305–321, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.07.012>.
52. Hart C.E., Loewen-Rodriguez A., Lessem J. Dermagraft: use in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care* 2012; 1(3): 138–141, <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0282>.
53. Sai K.P., Babu M. Collagen based dressings — a review. *Burns* 2000; 26(1): 54–62, [https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(99\)00103-5](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(99)00103-5).
54. Auger F.A., Rouabhia M., Goulet F., Berthod F., Moulin V., Germain L. Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Med Biol Eng Comput* 1998; 36(6): 801–812, <https://doi.org/10.1007/bf02518887>.
55. Dallon J.C., Ehrlich H.P. A review of fibroblast-populated collagen lattices. *Wound Repair Regen* 2008; 16(4): 472–479, <https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2008.00392.x>.
56. Ho G., Barbenel J., Grant M.H. Effect of low-level laser treatment of tissue-engineered skin substitutes: contraction of collagen *J Biomed Opt* 2009; 14(3): 034002, <https://doi.org/10.1117/1.3127201>.
57. O'Brien F.J., Harley B.A., Yannas I.V., Gibson L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25(6): 1077–1086, [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00630-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00630-6).
58. Still J., Glat P., Silverstein P., Griswold J., Mazingo D. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. *Burns* 2003; 29(8): 837–841, [https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(03\)00164-5](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(03)00164-5).
59. Powell H.M., Boyce S.T. Wound closure with EDC cross-linked cultured skin substitutes grafted to athymic mice. *Biomaterials* 2007; 28(6): 1084–1092, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.10.011>.
60. Kumar M.S., Kirubanandan S., Sripriya R., Sehgal P.K. Triphala incorporated collagen sponge — a smart biomaterial

for infected dermal wound healing. *J Surg Res* 2010; 158(1): 162–170, <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.07.006>.

61. Park S.-N., Lee H.J., Lee K.H., Suh H. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. *Biomaterials* 2003, 24(9): 1631–1641, [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00550-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00550-1).

62. Dezutter-Dambuyant C., Black A., Bechetoille N., Bouez C., Maréchal S., Auxenfans C., Cenizo V., Pascal P., Perrier E., Damour O. Evolutive skin reconstructions: from the dermal collagen-glycosaminoglycan-chitosane substrate to an immunocompetent reconstructed skin. *Biomed Mater Eng* 2006; 16(4 Suppl): S85–S94.

63. Ma J., Wang H., He B., Chen J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials* 2001; 22(4): 331–336, [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00188-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00188-5).

64. Horn M.M., Martins V.C.A., Plepis A.M.D. Interaction of anionic collagen with chitosan: effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydrate Polymers* 2009; 77(2): 239–243, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.039>.

65. Taravel M.N., Domard A. Collagen and its interaction with chitosan. II. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. *Biomaterials* 1995; 16(11): 865–871, [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)94149-f](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)94149-f).

66. Chung L.Y., Schmidt R.J., Hamlyn P.F., Sagar B.F., Andrews A.M., Turner T.D. Biocompatibility of potential wound management products: fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblasts in culture. *J Biomed Mater Res* 1994; 28(4): 463–469, <https://doi.org/10.1002/jbm.820280409>.

67. Mizuno K., Yamamura K., Yano K., Osada T., Saeki S., Takimoto N., Sakurai T., Nimura Y. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. *J Biomed Mater Res* 2003; 64A(1): 177–181, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10396>.

68. Madihally S.V., Matthew H.W. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999; 20(12): 1133–1142, [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00011-3](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00011-3).

69. Mao J.S., Iiu H.F., Yin Y.J., Yao K.D. The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials* 2003; 24(9): 1621–1629, [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00549-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00549-5).

70. Khor H.L., Ng K.W., Htay A.S., Schantz J.T., Teoh S.H., Hutmacher D.W. Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14(2): 113–120, <https://doi.org/10.1023/a:1022059511261>.

71. Deng C.-M., He L.-Z., Zhao M., Yang D., Liu Y. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. *Carbohydrate Polymers* 2007; 69(3): 583–589, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.01.014>.

72. Wang T.-W., Sun J.-S., Wu H.-C., Tsuang Y.-H., Wang W.-H., Lin F.-H. The effect of gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronic acid skin substitute on wound healing in SCID mice. *Biomaterials* 2006; 27(33): 5689–5697, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.024>.

73. Lee S.B., Kim Y.H., Chong M.S., Hong S.H., Lee Y.M. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials* 2005; 26(14): 1961–1968, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.032>.

74. Nguyen D.Q., Potokar T.S., Price P. An objective long-term evaluation of Integra (a dermal skin substitute) and split thickness skin grafts, in acute burns and reconstructive surgery. *Burns* 2010; 36(1): 23–28, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.07.011>.

75. Bagues L., Boyer S., Leclerc T., Duhamel P., Bey E. Incidence and microbiology of infectious complications with the use of artificial skin Integra® in burns. *Ann Chir Plast Esthet* 2009; 54(6): 533–539, <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2008.10.013>.

76. Lohana P., Hassan S., Watson S.B. Integra™ in burns reconstruction: our experience and report of an unusual immunological reaction. *Ann Burns Fire Disasters* 2014; 27(1): 17–21.

77. Dantzer E., Braye F.M. Reconstructive surgery using an artificial dermis (Integra): results with 39 grafts. *Br J Plast Surg* 2001; 54(8): 659–664, <https://doi.org/10.1054/bjps.2001.3684>.

78. Shahrokhi S., Arno A., Jeschke M.G. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase. *Wound Repair Regen* 2014; 22(1): 14–22, <https://doi.org/10.1111/wrr.12119>.

79. Pollard R.L., Kennedy P.J., Maitz P.K. The use of artificial dermis (Integra) and topical negative pressure to achieve limb salvage following soft-tissue loss caused by meningococcal septicaemia. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61(3): 319–322, <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2007.10.029>.

80. Leffler M., Horch R.E., Dragu A., Bach A.D. The use of the artificial dermis (Integra®) in combination with vacuum assisted closure for reconstruction of an extensive burn scar — a case report. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63(1): e32–e35, <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.05.022>.

81. Sinna R., Qassemayr Q., Bolorchi A., Benhaim T., Carton S., Perignon D., Robbe M. Role of the association artificial dermis and negative pressure therapy: about two cases. *Ann Chir Plast Esthet* 2009; 54(6): 582–587, <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2009.02.003>.

82. Böttcher-Haberzeth S., Biedermann T., Schiestl C., Hartmann-Fritsch F., Schneider J., Reichmann E., Meuli M. Matriderm® 1 mm versus Integra® Single Layer 1.3 mm for one-step closure of full thickness skin defects: a comparative experimental study in rats. *Pediatr Surg Int* 2012; 28(2): 171–177, <https://doi.org/10.1007/s00383-011-2990-5>.

83. Malakhov S.F., Paramonov B.A., Vasiliev A.V., Terskikh V.V. Preliminary report of the clinical use of cultured allogeneic keratinocytes. *Burns* 1994; 20(5): 463–466, [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0305-4179(94)90044-2).

84. O'Conner N.E., Mulliken J.B., Banks-Schlegel S., Kehinde O., Green H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cell. *Lancet* 1981; 1(8211): 75–78, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)90006-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)90006-4).

85. Green H. The birth of therapy with cultured cells. *Bioessays* 2008; 30(9): 897–903, <https://doi.org/10.1002/bies.20797>.

86. Васильев А.В., Логинов П.Л., Смирнов С.В., Малахов С.Ф., Парамонов Б.А., Заиконникова А.П., Данилова Т.И., Терских В.В. Применение выращенных аллогенных эпидермальных пластов для лечения обожженных. *Травматология и ортопедия России* 1994; 4: 34–39. Vasil'ev A.V., Loginov P.L., Smirnov S.V., Malakhov S.F., Paramonov B.A., Zaikonnikova A.P., Danilova T.I., Terskikh V.V. Application of cultured allogeneic epidermal sheets for treatment of burn patients. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* 1994; 4: 34–39.

87. Eldad A., Burt A., Clarke J.A., Gusterson B. Cultured epithelium as a skin substitute. *Burns Incl Therm Inj* 1987; 13(3): 173–180, [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(87\)90161-6](https://doi.org/10.1016/0305-4179(87)90161-6).
88. De Luca M., Albanese E., Bondanza S., Megna M., Ugozzoli L., Molina F., Cancedda R., Santi P.L., Bormioli M., Stella M., Magliacani G. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. *Burns* 1989; 15(5): 303–309, [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(89\)90007-7](https://doi.org/10.1016/0305-4179(89)90007-7).
89. Herzog S.R., Meyer A., Woodley D., Peterson H.D. Wound coverage with cultured autologous keratinocytes: use after burn wound excision, including biopsy follow up. *J Trauma* 1988; 28(2): 195–198, <https://doi.org/10.1097/00005373-198802000-00011>.
90. Cuono C., Langdon R., McGuire J. Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. *Lancet* 1986; 1(8490): 1123–1124, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)91838-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)91838-6).
91. Cuono C.B., Langdon R., Birchall N., Barttelbort S., McGuire J. Composite autologous-allogeneic skin replacement: development and clinical application. *Plast Reconstr Surg* 1987; 80(4): 626–637, <https://doi.org/10.1097/00006534-198710000-00029>.
92. Nivatvongs S., Dhitavat V., Jungsangasom A., Attajarusit Y., Sroyson S., Prabjabok S., Pimongkol C. Thirteen years of the Thai Red Cross Organ Donation Centre. *Transplant Proc* 2008; 40(7): 2091–2094, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.06.032>.
93. Oniscu G.C., Forsythe J.L. An overview of transplantation in culturally diverse regions. *Ann Acad Med Singapore* 2009; 38(4): 365–365.
94. Hansbrough J.F., Franco E.S. Skin replacements. *Clin Plast Surg* 1998; 25(3): 407–423, https://doi.org/10.1007/978-94-009-0165-0_20.
95. Pellegrini G., Bondanza S., Guerra L., De Luca M. Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comput* 1998; 36(6): 778–790, <https://doi.org/10.1007/bf02518885>.
96. Atiyeh B.S., Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns* 2007; 33(4): 405–413, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.11.002>.
97. Clark R.A., Ghosh K., Tonnesen M.G. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 2007; 127(5): 1018–1029, <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700715>.
98. Supp D.M., Boyce S.T. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin Dermatol* 2005; 23(4): 403–412, <https://doi.org/10.1016/j.cjclindermatol.2004.07.023>.
99. Shevchenko R.V., James S.L., James S.E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface* 2010; 7(43): 229–58, <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0403>.
100. van der Veen V.C., Boekema B.K., Ulrich M.M., Middelkoop E. New dermal substitutes. *Wound Repair Regen* 2011; 19(Suppl 1): 59–65, <https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2011.00713.x>.
101. Philandrianos C., Andrac-Meyer L., Mordon S., Feuerstein J.M., Sabatier F., Veran J., Magalon G., Casanova D. Comparison of five dermal substitutes in full-thickness skin wound healing in a porcine model. *Burns* 2012; 38(6): 820–829, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.02.008>.
102. Simcock J., May B.C. Ovine forestomach matrix as a substrate for single-stage split-thickness graft reconstruction. *Eplasty* 2013; 13: e58.
103. Chua A.W., Khoo Y.C., Tan B.K., Tan K.C., Foo C.L., Chong S.J. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. *Burns Trauma* 2016; 4(1): 3, <https://doi.org/10.1186/s41038-016-0027-y>.
104. Tan H., Wasiak J., Paul E., Cleland H. Effective use of Biobrane as a temporary wound dressing prior to definitive split-skin graft in the treatment of severe burn: a retrospective analysis. *Burns* 2015; 41(5): 969–976, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.07.015>.
105. Greenwood J.E., Clausen J., Kavanagh S. Experience with Biobrane: uses and caveats for success. *Eplasty* 2009; 9: e25.
106. Cheah A.K.W., Chong S.J., Tan B.K. Early experience with Biobrane™ in Singapore in the management of partial thickness burns. *Proceedings of Singapore Healthcare* 2014; 23(3): 196–200, <https://doi.org/10.1177/201010581402300304>.
107. Farroha A., Frew Q., El-Muttardi N., Philp B., Dziwulski P. The use of Biobrane® to dress split-thickness skin graft in paediatric burns. *Ann Burns Fire Disasters* 2013; 26(2): 94–97.
108. Pham C., Greenwood J., Cleland H., Woodruff P., Maddern G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. *Burns* 2007; 33(8): 946–957, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2007.03.020>.
109. Rogovaya O.S., Vasiliev A.V., Kiselev I.V., Tersikh V.V. Use of human fibroblasts grown on microcarriers for formation of connective tissue equivalent. *Russian Journal of Developmental Biology* 2004; 35(2): 76–79, <https://doi.org/10.1023/b:rudo.0000022348.70630.6e>.
110. Supp D.M., Wilson-Landy K., Boyce S.T. Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. *FASEB J* 2002; 16(8): 797–804, <https://doi.org/10.1096/fj.01-0868com>.
111. Boyce S.T., Goretsky M.J., Greenhalgh D.G., Kagan R.J., Rieman M.T., Warden G.D. Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. *Ann Surg* 1995; 222(6): 743–752, <https://doi.org/10.1097/0000658-199512000-00008>.
112. Boyce S.T., Kagan R.J., Meyer N.A., Yakuboff K.P., Warden G.D. The 1999 Clinical Research Award. Cultured skin substitutes combined with Integra Artificial Skin to replace native skin autograft and allograft for the closure of excised full-thickness burns. *J Burn Care Rehabil* 1999; 20(6): 453–461, <https://doi.org/10.1097/00004630-199920060-00006>.
113. Boyce S.T., Kagan R.J., Yakuboff K.P., Meyer N.A., Rieman M.T., Greenhalgh D.G., Warden G.D. Cultured skin substitutes reduce donor skin harvesting for closure of excised, full-thickness burns. *Ann Surg* 2002; 235(2): 269–279, <https://doi.org/10.1097/0000658-200202000-00016>.
114. Boyce S.T., Kagan R.J., Greenhalgh D.G., Warner P., Yakuboff K.P., Palmieri T., Warden G.D. Cultured skin substitutes reduce requirements for harvesting of skin autograft for closure of excised, full-thickness burns. *J Trauma* 2006; 60(4): 821–829.
115. Golinski P.A., Zöller N., Kippenberger S., Menke H., Bereiter-Hahn J., Bernd A. Development of an engraftable skin

equivalent based on matrigel with human keratinocytes and fibroblasts. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2009; 41(6): 327–332, <https://doi.org/10.1055/s-0029-1234132>.

116. Golinski P., Menke H., Hofmann M., Valesky E., Butting M., Kippenberger S., Bereiter-Hahn J., Bernd A., Kaufmann R., Zoeller N.N. Development and characterization of an engraftable tissue-cultured skin autograft: alternative treatment for severe electrical injuries. *Cells Tissues Organs* 2014; 200(3–4): 227–239, <https://doi.org/10.1159/000433519>.

117. Zöller N., Valesky E., Butting M., Hofmann M., Kippenberger S., Bereiter-Hahn J., Bernd A., Kaufmann R. Clinical application of a tissue-cultured skin autograft: an alternative for the treatment of non-healing or slowly healing wounds. *Dermatology* 2014; 229(3): 190–198, <https://doi.org/10.1159/000362927>.

118. Waymack P., Duff R.G., Sabolinski M. The effect of a tissue engineered bilayered living skin analog, over meshed split-thickness autografts on the healing of excised burn wounds. The Apligraf Burn Study Group. *Burns* 2000; 26(7): 609–619, [https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(00\)00017-6](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(00)00017-6).

119. Fivenson D., Scherschun L. Clinical and economic impact of Apligraf® for the treatment of nonhealing venous leg ulcers. *Int J Dermatol* 2003; 42(12): 960–965, <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2003.02039.x>.

120. Горелик Ю.В., Блинова М.И., Пинаев Г.П. Влияние компонентов внеклеточного матрикса на распластывание кератиноцитов крысы на субстрате при культивировании в низкокальциевой среде. *Цитология* 1994; 36(12): 1209–1212. Gorelik Yu.V., Blinova M.I., Pinaev G.P. Effect of extracellular matrix components on rat keratinocyte spreading on the substrate during culturing in the low-calcium medium. *Tsitologiya* 1994; 36 (12): 1209–1212.

121. Смирнов С.В., Васильев А.В., Киселев И.В., Емельянов А.В., Леонов С.В., Роговая О.С., Терских В.В. Использование клеток кожи человека для восстановления дефектов кожного покрова. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2003; (Прил.): 10–16. Smirnov S.V., Vasil'ev A.V., Kiselev I.V., Emel'yanov A.V., Leonov S.V., Rogovaya O.S., Terskikh V.V. Application of human skin cells for restoration of integument defects. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* 2003; (Suppl): 10–16.

122. Чиссов В.И., Решетов И.В., Васильев А.В., Терских В.В., Роговая О.С., Батухтина Е.В. Реконструкция верхних дыхательных путей с использованием тканевого эквивалента у онкологических больных. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2003; 136(6): 711–713. Chissov V.I., Reshetov I.V., Vasil'ev A.V., Terskikh V.V., Rogovaya O.S., Batukhtina E.V. Reconstruction of the upper respiratory airways in oncologic patients using a tissue equivalent. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* 2003; 136(6): 711–713.

123. Ивашкин А.Н., Фоминых Е.М., Максименко В.Н., Гасанов И.К., Смирнов А.В., Федоров Д.Н., Дашинимаев Э.Б., Киселева Е.В. Применение живого эквивалента кожи в комплексном лечении больных с трофическими язвами нижних конечностей венозной этиологии. Военно-медицинский журнал 2009; 330(11): 51–52. Ivashkin A.N., Fominykh E.M., Maksimenko V.N., Gasanov I.K., Smirnov A.V., Fedorov D.N., Dashinimaev E.B., Kiseleva E.V. Application of a living skin equivalent in the complex treatment of patients with trophic ulcers of the

lower extremities of the venous etiology. *Voenno-meditsinskiy zhurnal* 2009; 330(11): 51–52.

124. Роговая О.С., Киселева Е.В., Дашинимаев Э.Б., Щипицына В.С., Файзуллин Р.Р., Васильев А.В., Суханов Ю.В., Терских В.В. Исследование влияния перфторуглерода (ПФУ) в составе живого эквивалента кожи (ЖЭК) на процесс регенерации кожных ран в модели лабораторных животных. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук 2011; 5: 169–173. Rogovaya O.S., Kiseleva E.V., Dashinimaev E.B., Schipitsina V.S., Chukanova A.G., Faizullin R.R., Vasilyev A.V., Terskikh V.V. Investigation of the perfluorocarbon (PFC) influence in the living skin equivalent (LSE) on the regeneration of skin wounds in laboratory animal models. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk* 2011; 5: 169–173.

125. Larouche D., Cantin-Warren L., Desgagné M., Guignard R., Martel I., Ayoub A., Lavoie A., Gauvin R., Auger F.A., Moulin V.J., Germain L. Improved methods to produce tissue-engineered skin substitutes suitable for the permanent closure of full-thickness skin injuries. *Biores Open Access* 2016; 5(1): 320–329, <https://doi.org/10.1089/biores.2016.0036>.

126. Burd A., Ahmed K., Lam S., Ayyappan T., Huang L. Stem cell strategies in burns care. *Burns* 2007; 33(3): 282–291, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.08.031>.

127. Vyas K.S., Vasconez H.C. Wound healing: biologics, skin substitutes, biomembranes and scaffolds. *Healthcare (Basel)* 2014; 2(3): 356–400, <https://doi.org/10.3390/healthcare2030356>.

128. Carsin H., Ainaud P., Le Bever H., Rives J., Lakhel A., Stephanazzi J., Lambert F., Perrot J. Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. *Burns* 2000; 26(4): 379–387, [https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(99\)00143-6](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(99)00143-6).

129. Uccioli L., Giurato L., Ruotolo V., Ciavarella A., Grimaldi M.S., Piaggese A., Teobaldi I., Ricci L., Scionti L., Vermigli C., Seguro R., Mancini L., Ghirlanda G. Two-step autologous grafting using hyaff scaffolds in treating difficult diabetic foot ulcers: results of a multicenter, randomized controlled clinical trial with long-term follow-up. *Int J Low Extrem Wounds* 2011; 10(2): 80–85, <https://doi.org/10.1177/1534734611409371>.

130. Pajardi G., Rapisarda V., Somalvico F., Scotti A., Russo G.L., Ciancio F., Sgrò A., Nebuloni M., Allevi R., Torre M.L., Trabucchi E., Marazzi M. Skin substitutes based on allogenic fibroblasts or keratinocytes for chronic wounds not responding to conventional therapy: a retrospective observational study. *Int Wound J* 2016; 13(1): 44–52, <https://doi.org/10.1111/iwj.12223>.

131. Lam P.K., Chan E.S., Liew C.T., Lau C., Yen S.C., King W.W. Combination of a new composite biocompatible skin graft on the neodermis of artificial skin in an animal model. *ANZ J Surg* 2002; 72(5): 360–363, <https://doi.org/10.1046/j.1445-2197.2002.02410.x>.

132. Chan E.S., Lam P.K., Liew C.T., Lau H.C., Yen R.S., King W.W. A new technique to resurface wounds with composite biocompatible epidermal graft and artificial skin. *J Trauma* 2001; 50(2): 358–362, <https://doi.org/10.1097/00005373-200102000-00028>.

133. Kumar R.J., Kimble R.M., Boots R., Pegg S.P.

- Treatment of partial-thickness burns: a prospective, randomized trial using Transcyte™. *ANZ J Sur* 2004; 74: 622–626, <https://doi.org/10.1111/j.1445-1433.2004.03106.x>.
134. Demling R.H., DeSanti L. Management of partial thickness facial burns (comparison of topical antibiotics and bio-engineered skin substitutes). *Burns* 1999; 25(3): 256–261, [https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(98\)00165-x](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(98)00165-x).
135. Lukish J.R., Eichelberger M.R., Newman K.D., Pao M., Nobuhara K., Keating M., Golonka N., Pratsch G., Misra V., Valladares E., Johnson P., Gilbert J.C., Powell D.M., Hartman G.E. The use of a bioactive skin substitute decreases length of stay for pediatric burn patients. *J Pediatr Surg* 2001; 36(8): 1118–1121, <https://doi.org/10.1053/jpsu.2001.25678>.
136. Amani H., Dougherty W.R., Blome-Eberwein S. Use of Transcyte® and dermabrasion to treat burns reduces length of stay in burns of all size and etiology. *Burns* 2006; 32(7): 828–832, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.04.003>.
137. Noordenbos J., Doré C., Hansbrough J.F. Safety and efficacy of TransCyte for the treatment of partial-thickness burns. *J Burn Care Rehabil* 1999; 20(4): 275–281, <https://doi.org/10.1097/00004630-199907000-00002>.
138. Marston W.A., Hanft J., Norwood P., Pollak R. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care* 2003; 26(6): 1701–1705, <https://doi.org/10.2337/diacare.26.6.1701>.
139. Hanft J.R., Surprenant M.S. Healing of chronic foot ulcers in diabetic patients treated with a human fibroblast-derived dermis. *J Foot Ankle Surg* 2002; 41(5): 291–299, [https://doi.org/10.1016/s1067-2516\(02\)80047-3](https://doi.org/10.1016/s1067-2516(02)80047-3).
140. Lev-Tov H., Li C.S., Dahle S., Isseroff R.R. Cellular versus acellular matrix devices in treatment of diabetic foot ulcers: study protocol for a comparative efficacy randomized controlled trial. *Trials* 2013; 14(1): 8, <https://doi.org/10.1186/1745-6215-14-8>.
141. Warriner R.A., Cardinal M., Investigators T. Human fibroblast-derived dermal substitute: results from a treatment investigational device exemption (TIDE) study in diabetic foot ulcers. *Adv Skin Wound Care* 2011; 24(7): 306–311, <https://doi.org/10.1097/01.asw.0000399647.80210.61>.
142. Gentzkow G.D., Iwasaki S.D., Hershon K.S., Mengel M., Prendergast J.J., Ricotta J.J., Steed D.P., Lipkin S. Use of Dermagraft, a cultured human dermis, to treat diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 1996; 19(4): 350–354, <https://doi.org/10.2337/diacare.19.4.350>.
143. Harding K., Sumner M., Cardinal M. A prospective, multicentre, randomised controlled study of human fibroblast-derived dermal substitute (Dermagraft) in patients with venous leg ulcers. *Int Wound J* 2013; 10(2): 132–137, <https://doi.org/10.1111/iwj.12053>.
144. Omar A.A., Mavor A.I., Jones A.M., Homer-Vanniasinkam S. Treatment of venous leg ulcers with Dermagraft. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 27(6): 666–672, <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2004.03.001>.
145. Jones J.E., Nelson E.A., Al-Hity A. Skin grafting for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 1: CD001737, <https://doi.org/10.1002/14651858.cd001737.pub4>.
146. Falanga V.J. Tissue engineering in wound repair. *Adv Skin Wound Care* 2000; 13(2 Suppl): 15–19.
147. Falanga V., Sabolinski M. A bilayered living skin construct (APLIGRAF®) accelerates complete closure of hard-to-heal venous ulcers. *Wound Repair Regen* 1999; 7(4): 201–207, <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.1999.00201.x>.
148. Hu S., Kirsner R.S., Falanga V., Phillips T., Eaglstein W.H. Evaluation of Apligraf® persistence and basement membrane restoration in donor site wounds: a pilot study. *Wound Repair Regen* 2006; 14(4): 427–433, <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00148.x>.
149. Edmonds M.; European and Australian Apligraf Diabetic Foot Ulcer Study Group. Apligraf in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds* 2009; 8(1): 11–18, <https://doi.org/10.1177/1534734609331597>.
150. Veves A., Falanga V., Armstrong D.G., Sabolinski M.L.; Apligraf Diabetic Foot Ulcer Study. Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care* 2001; 24(2): 290–295, <https://doi.org/10.2337/diacare.24.2.290>.
151. Redekop W.K., McDonnell J., Verboom P., Lovas K., Kalo Z. The cost effectiveness of apligraf treatment of diabetic foot ulcers. *PharmacoEconomics* 2003; 21(16): 1171–1183, <https://doi.org/10.2165/00019053-200321160-00003>.
152. Donohue K.G., Carson P., Iriondo M., Zhou L., Saap L., Gibson K., Falanga V. Safety and efficacy of a bilayered skin construct in full-thickness surgical wounds. *J Dermatol* 2005; 32(8): 626–631, <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2005.tb00811.x>.
153. Griffiths M., Ojeh N., Livingstone R., Price R., Navsaria H. Survival of Apligraf in acute human wounds. *Tissue Eng* 2004; 10(7–8): 1180–1195, <https://doi.org/10.1089/1076327041887835>.
154. Winters C.L., Brigido S.A., Liden B.A., Simmons M., Hartman J.F., Wright M.L. A multicenter study involving the use of a human acellular dermal regenerative tissue matrix for the treatment of diabetic lower extremity wounds. *Adv Skin Wound Care* 2008; 21(8): 375–381, <https://doi.org/10.1097/01.asw.0000323532.98003.26>.
155. Reyzelman A., Crews R.T., Moore J.C., Moore L., Mukker J.S., Offutt S., Tallis A., Turner W.B., Vayser D., Winters C., Armstrong D.G. Clinical effectiveness of an acellular dermal regenerative tissue matrix compared to standard wound management in healing diabetic foot ulcers: a prospective, randomised, multicentre study. *Int Wound J* 2009; 6(3): 196–208, <https://doi.org/10.1111/j.1742-481x.2009.00585.x>.
156. Brigido S.A., Boc S.F., Lopez R.C. Effective management of major lower extremity wounds using an acellular regenerative tissue matrix: a pilot study. *Orthopedics* 2004; (1 Suppl): s145–s149.
157. Brigido S.A. The use of an acellular dermal regenerative tissue matrix in the treatment of lower extremity wounds: a prospective 16-week pilot study. *Int Wound J* 2006; 3(3): 181–187, <https://doi.org/10.1111/j.1742-481x.2006.00209.x>.
158. Brigido S.A., Schwartz E., McCarroll R., Hardin-Young J. Use of an acellular flowable dermal replacement scaffold on lower extremity sinus tract wounds: a retrospective series. *Foot Ankle Spec* 2009; 2(2): 67–72, <https://doi.org/10.1177/1938640009333474>.
159. Martin B.R., Sangalang M., Wu S., Armstrong D.G. Outcomes of allogenic acellular matrix therapy in treatment of diabetic foot wounds: an initial experience. *Int Wound J* 2005; 2(2): 161–165, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4801.2005.00099.x>.
160. Panchagnula R., Stemmer K., Ritschel W.A. Animal

models for transdermal drug delivery. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1997; 19(5): 335–341.

161. Thakoersing V.S., Gooris G.S., Mulder A., Rietveld M., El Ghalbzouri A., Bouwstra J.A. Unraveling barrier properties of three different in-house human skin equivalents. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18(1): 1–11, <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0175>.

162. Thakoersing V.S., Ponec M., Bouwstra J.A. Generation of human skin equivalents under submerged conditions-mimicking the in utero environment. *Tissue Eng Part A* 2010;

16(4): 1433–1441, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0358>.

163. El Ghalbzouri A., Lamme E.N., van Blitterswijk C., Koopman J., Ponec M. The use of PEGT/PBT as a dermal scaffold for skin tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25(15): 2987–2996, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.098>.

164. Boehnke K., Mirancea N., Pavesio A., Fusenig N.E., Boukamp P., Stark H.J. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *Eur J Cell Biol* 2007; 86(11–12): 731–746, <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.12.005>.