

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РАЗРАБОТКЕ ЗАМЕНИТЕЛЕЙ КОЖИ

© С. В. Анисимов

*Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова Минздрава России РФ,
и Институт цитологии РАН Санкт-Петербург;
электронный адрес: askold5@front.ru*

Обширные поражения кожных покровов могут иметь разную этиологию и иногда плохо поддаются консервативному и хирургическому лечению. В течение многих лет пересадка кожи являлась одним из важнейших методов лечения обширных и глубоких поражений кожи. Однако ограниченная доступность трансплантационного материала и необходимость подбора донора лимитируют применение данного подхода. Альтернативой стало применение раневых покрытий разных типов, в том числе синтетических, комбинированных и биологических. Важнейшую нишу в спектре разработанных и активно используемых в клинической практике раневых покрытий занимают заменители кожи, имеющие сложную структуру покрытия, включающие в себя компоненты биологического происхождения. При этом клеточными субстратами, используемыми в их создании, являются фибробласты дермы, неонатальные фибробласты крайней плоти и кератиноциты. В данном обзоре рассматриваются важнейшие требования, предъявляемые к современным заменителям кожи, особенности строения их наиболее распространенных типов и принципы работы с конкретными типами клеток, проводится сравнительный анализ эффективности раневых покрытий.

Ключевые слова: раневые покрытия, заменители кожи, клеточные технологии, культура клеток.

Наиболее распространенными причинами обширных поражений кожных покровов являются ожоги (преимущественно термические, реже — химические и электрические), ишемические и метаболические нарушения, особая роль среди которых принадлежит сахарному диабету. В отдельных случаях обширными могут быть и хирургические раны (например, после удаления опухолей и родимых пятен). В ряде случаев поражения кожных покровов плохо поддаются консервативному и хирургическому лечению, приводя к инвалидизации больных, что особенно характерно для трофических язв нижних конечностей, развивающихся как осложнение сахарного диабета. Наличие обширных поражений кожных покровов представляет значительную опасность. Это обусловлено потерей через раневую поверхность крови, воды, электролитов, тепла и риском развития инфекционных осложнений. Самостоятельное заживление обширных ран, ожогов и язв длится долго, протекает болезненно и сопровождается формированием рубцов, что связано с риском развития контрактур и озлокачествления. Эволюция взглядов на выбор лечебной тактики при обширных ожогах позволила резко улучшить выживаемость пациентов в остром периоде. Однако на более поздних этапах эффективность лечения в значительной степени зависит от иммунного ответа и развития инфекционных осложнений. Глубокие ожоги значительной площади почти всегда требуют покрытия кожей, полученной из другого источника. Задачами лечащего врача в этом случае являются подготовка раневой поверхности и выбор материала для закрытия раны.

Начиная с первой половины XIX в. для лечения ран (Chick, 1988), а начиная с конца XIX в. и для лечения ожо-

гов (Freshwater, Krizek, 1971; Herman, 2002; MacFarlane, 2006) использовали ауто трансплантацию (позже и изотрансплантацию) кожи, лоскуты которой переносили с непораженного участка на раневую поверхность. Весьма скоро начали использовать не цельные, а расщепленные (фрагментированные) лоскуты кожи. В тяжелых случаях один и тот же непораженный участок кожи мог быть использован для получения трансплантационного материала несколько раз в ходе последовательных операций. Прогресс в области иммунологии и развитие трансплантологии как науки позволили с успехом применять в лечении ожогов и септических поражений кожи аллотрансплантацию (гомотрансплантацию) кожи, в том числе замороженной и формализированной, а с 60-х годов XX в. производится и ксенотрансплантация (преимущественно свиной кожи) (Parrish et al., 1964; Bromberg, Song, 1965). В этом случае трансплантация выполняется в формате паллиативного лечения, проводимого в интересах снижения потерь крови, воды и тепла через раневую поверхность и закрытия входных ворот инфекции при подготовке к последующей ауто трансплантации. Выраженный клеточный и гуморальный первичный иммунодефицит, развивающийся при обширных и глубоких ожогах (Sachs, Watson, 1969), позволяет аллотрансплантатам приживаться на срок, превосходящий таковой для интактных реципиентов, что являлось фактором, способствовавшим успешному внедрению аллотрансплантации и ксенотрансплантации в лечение ожогов. В комплексе прогресс трансплантологии, иммунологии и хирургии обеспечил несомненный успех в повышении выживаемости при глубоких ожогах большой площади, ранее считавшихся смертельными.

Однако ограниченная доступность трансплантационного материала (характерная для всех направлений трансплантологии) и необходимость обеспечить подбор донора в кратчайшие сроки являются факторами, лимитирующими применение подхода, основанного на пересадке кожи. В связи с этим с середины XX в. начали проводиться исследования, направленные на поиск альтернативных субстратов трансплантаций, проводимых по поводу ожогов, ран и язв (Pigeon, 1960; Wanke, Grözinger, 1965; Ott, 1970; Colochio et al., 1974). В течение последующих десятилетий бурное развитие данной области биотехнологий привело к разработке и внедрению в клиническую практику широкого спектра новых материалов, совокупность которых объединяют под понятием «раневые покрытия».

Раневые покрытия и заменители кожи

Существующие классификации современных раневых покрытий подразделяют в зависимости от следующих факторов: 1) происхождения — синтетические, биологические (клеточные и неклеточные) и комбинированные (композитные); 2) химического состава — на основе полиуретана, силикона, коллагена и пр., а также от клеточного состава — кератиноциты или фибробласты; 3) структуры — однослойные, двухслойные и сложные (многослойные); 4) основных функциональных характеристик — улучшающие нормальное заживление раны, подавляющие рост и размножение бактерий, способствующие очищению поверхности раны; 5) формы выпуска — пленки, пленки-распылители, пенопласты, пластины, губки, гели, и пр.; и, кроме того, подразделяет на б) временные и постоянные. В 1987 г. отделение биомедицинской инженерии Национального научного фонда США предложило определение тканевой инженерии как «приложения принципов и методов инженерии и биологических наук к созданию биологических заменителей, восстанавливающих, поддерживающих или улучшающих функцию» (Bello et al., 2001). Группа раневых покрытий, которые принято называть «заменителями кожи», является классическим продуктом тканевой инженерии и клеточных технологий. Несмотря на некоторые терминологические трудности, к таким типам принято относить раневые покрытия биологического происхождения, изготовленные с применением клеток, имеющие сложную (двухслойную или многослойную) структуру, обычно основанную на применении биодеградируемых материалов. Однако некоторые типы раневых покрытий, также основанные на принципах тканевой инженерии, не полностью удовлетворяют этому определению, что заставляет считать его в значительной степени условным.

Ключевыми функциями раневых покрытий в целом являются обеспечение относительной проницаемости для газов и жидкостей, ограничение проникновения бактерий и улучшение условий заживления ран. Разработка продуктов, удовлетворяющих этим и некоторым другим требованиям, является трудной задачей, и нельзя не отметить определенные преимущества, которые имеют синтетические раневые покрытия над биологическими и комбинированными типами, включая заменители кожи. Применение современных синтетических раневых покрытий не связано с риском развития трансмиссивных инфекций (значимым для любых материалов биологического происхождения), они являются в значительной мере иммунологически инертными и при соблюдении условий

производства и хранения могут длительное время сохранять стерильность в готовом к применению виде, а также являются удобными при транспортировке и хранении. В связи с этим применение синтетических раневых покрытий показано также и в формате паллиативной терапии, на этапе подготовки к применению заменителей кожи или аутологичной либо аллогенной трансплантации кожи.

Перечень требований к постоянным заменителям кожи включает в себя следующие ключевые показатели: материал должен эффективно изолировать входные ворота инфекции и обладать хорошими барьерными свойствами, защищая рану от механических воздействий и химического раздражения, препятствуя потере воды, но при этом быть хорошо проницаемым для кислорода, стабилизируя рану на длительное время, обладать гемостатическими свойствами, быть недорогим, простым в изготовлении, иметь длительный срок хранения и требовать простых условий хранения, храниться в готовой к употреблению форме (в частности, в стерильном виде), быть простым и удобным в применении, выпускаться в разных формах (в частности, в виде разных по толщине форм), быть нетоксичным и не обладать антигенными свойствами, быть механически прочным, но гибким и эластичным, легко фиксироваться на ране в ходе единственной манипуляции, обладать способностью стимулировать репаративные процессы в ране (в частности, ангиогенез), при необходимости расти вместе с ребенком, но не гипертрофироваться и не препятствовать росту производных кожи (Pruitt, Levine, 1984; Sheridan, Tompkins, 1999; Ramos-e-Silva, Ribeiro de Castro, 2002; Shores et al., 2007). Нельзя не отметить, что ни один из существующих типов заменителей кожи не удовлетворяет всем или большинству этих требований. Это определяет необходимость продолжения исследований в области разработки новых типов заменителей кожи, более полно отвечающих потребностям клинической практики.

Биологические типы заменителей кожи

Биологические типы заменителей кожи относятся к наиболее давно используемым материалам. Именно к этой группе относят, в частности, собственно кожу аутологичного, аллогенного и ксеногенного происхождения, в том числе замороженную, лиофилизированную, децеллюляризованную и химически модифицированную кожу, амнион, коллаген и его производные и пр. В приложении к задачам данного обзора ниже рассматриваются отдельные биологические типы заменителей кожи, производство которых основано на принципах клеточных технологий.

Культивируемый аутологичный эпидермис стал первым заменителем кожи такого типа. Производство данного материала было основано на совместном культивировании (сокультивировании) аутологичных эпидермальных кератиноцитов с фибробластами мышцы, выполняющими функцию фидерных (питающих) клеток по отношению к кератиноцитам и ингибирующим рост представленных в образце фибробластов (Rheinwald, Green, 1975). Следует отметить, что использование сложных клеточных систем весьма широко применяется в клеточных технологиях с различными целями, в том числе именно для экспансии клеток *in vitro*, и подбор типа клеток, обладающих свойствами фидерных, является сложной и

актуальной задачей в любом приложении. После выделения эпидермиса из биоптата кожи проводилась механическая и энзиматическая диссоциация образца, и клеточная суспензия кератиноцитов использовалась для засева на поверхность конфлюэнтного слоя митотически инактивированных ионизирующей радиацией фибробластов мыши линии 3T3 (Todaro, Green, 1963) — широко используемого типа клеток в научных исследованиях с 1962 г. Питательная среда, используемая для экспансии кератиноцитов человека, включала в себя, в частности, холерный токсин (CTX), эпидермальный фактор роста (EGF), трийодтиронин, трансферрин, инсулин и гидрокортизон. После экспансии *in vitro* в течение 2–3 нед, многослойная культура эпидермальных кератиноцитов энзиматически отделялась от подложки (без диссоциации), что сохраняло установленные в культуре межклеточные взаимодействия и организацию слоев в целом (Green et al., 1979). Культивируемый аутологичный эпидермис начал применяться в клинической практике начиная с 1981 г. (O'Connor et al., 1981; Nefton et al., 1983, 1986), и с 1988 г. применяется производимый по данной технологии материал «Episcel», в том числе по поводу ожогов, хирургических ран, пролежней, хронических язв нижних конечностей, витилиго, буллезного эпидермолиза (*Epydermolisis bullosa*) и других показаний. Данный материал является постоянным раневым покрытием, обеспечивая эффективное закрытие раны, при этом установление культуры эпидермальных кератиноцитов предъявляет невысокие требования к локализации сайта (или сайтов) забора биоптатов. Однако длительность культивирования клеток и сложность состава питательной среды определяют высокую стоимость материала. Отмечаются также небольшой размер получаемых образцов заменителя кожи и относительно высокая вариабельность достигаемого функционального эффекта (Butler, Orgill, 2005; Shores et al., 2007). Ключевые недостатки данного подхода обусловлены отсутствием в материале дермального слоя или его аналога, в связи с чем предпринимались попытки применять культивируемый аутологичный эпидермис в сочетании с пересадкой трупной кожи (с удаленным эпидермисом), проводя трансплантацию в два этапа (Heck et al., 1985; Cuono et al., 1986). Несмотря на то что результаты такого подхода были в целом удовлетворительны, он все же не нашел широкого применения в клинической практике.

Несколько более широко применяется материал «Laserskin» (ex-«VivoDerm»; Fidia Advanced Biopolymers, Италия), производство которого основано на экспансии аутологичных эпидермальных кератиноцитов на перфорированной лазером мембране, изготовленной из чистой гиалуроновой кислоты (Lobmann et al., 2003). Вариантами этого материала являются также HYAFF и «TissueTech Autograft System». В первом случае основой для роста кератиноцитов является трехмерный полимер, созданный на основе гиалуроновой кислоты, в то время как «TissueTech Autograft System» является комбинацией HYAFF и «Laserskin» (Uccioli, 2003; Bianchini et al., 2008). В отдельных случаях исследовалась эффективность сочетанного применения «Laserskin» и аллогенных фибробластов (Lam et al., 1999) либо двухслойного синтетического заменителя кожи «Integra» (Integra LifeSciences Holdings Corporation, США) (Chan et al., 2001).

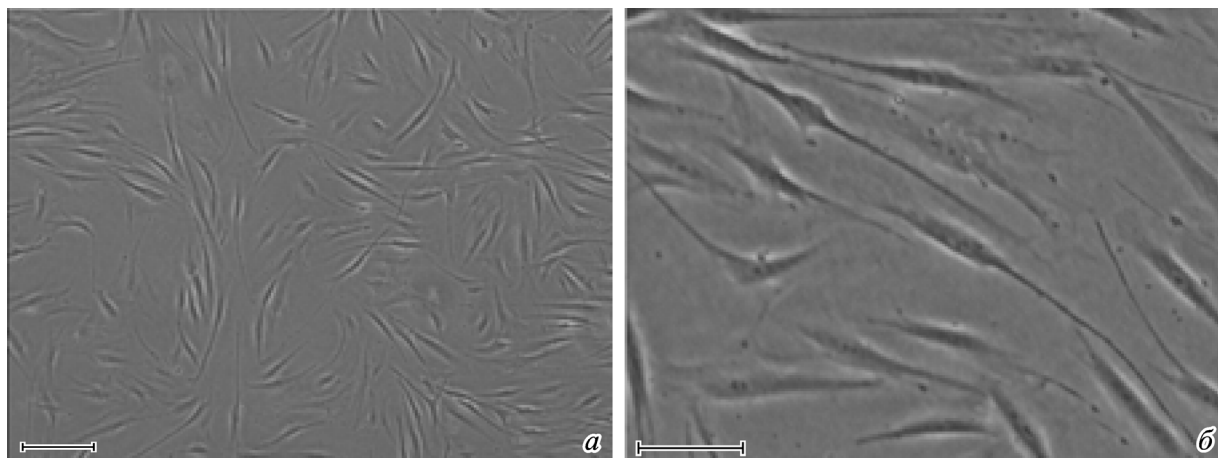
Культивируемый аллогенный эпидермис производят из биоптатов аллогенных доноров. В частности, ценным клеточным субстратом является крайняя плоть новорожденных. Как известно, обрезание не только практикуется

в ряде этнических и религиозных групп, но и производится по медицинским показаниям; это определяет доступность и этичность использования такого материала. Считается, что секреция донорскими клетками факторов роста играет важную роль в достижении функционального эффекта — стимуляции грануляции и эпителизации раны (Phillips, 1993). Важнейшим преимуществом культивируемого аллогенного эпидермиса является возможность его предварительной заготовки, замораживания, длительного хранения и по потребности использования после размораживания (Bolivar-Flores et al., 1990; см. также: Райдан и др., 2011). Однако культивируемый аллогенный эпидермис не является постоянным раневым покрытием, а его применение связано с риском развития трансмиссивных инфекций. Эти факторы способствовали тому, что культивируемый аллогенный эпидермис нашел лишь ограниченное применение в клинической практике, в том числе в лечении ожогов, хронических язв нижних конечностей и буллезного эпидермолиза.

Комбинированные (композитные) типы заменителей кожи

Функциональные свойства заменителей кожи комбинированных (композитных) типов основаны на совместном использовании материалов синтетического и биологического происхождения, в том числе имеющих клеточную либо неклеточную природу. К настоящему времени разработано большое число заменителей кожи этого типа, основанных на использовании материалов с заданными свойствами, с применением клеточных технологий и тканевой инженерии. Комбинированные (композитные) типы заменителей кожи обладают высокой стоимостью, но превосходят биологические и синтетические типы по эффективности, что обуславливает широкое внедрение многих образцов в клиническую практику. При этом, несмотря на деградацию или необходимость удаления компонентов комбинированных типов заменителей кожи после нанесения на раневую поверхность, возможно их использование в качестве постоянных раневых покрытий.

Сложность производства комбинированных заменителей кожи может быть проиллюстрирована описанием протокола производства материала ICX-SKN (investigational human living dermal equivalent; исследовательский человеческий живой эквивалент кожи), разработанного компанией Intercytex Ltd. (Великобритания) и принадлежащего Healthpoint Ltd./DFB Pharmaceuticals, Inc. (США) (Flasza et al., 2007). Протокол состоит из следующих основных этапов: 1) создание фибриновой основы, заселение ее фибробластами дермы, их рост, сопровождающийся замещением фибрина коллагеном типа I и другими синтезированными фибробластами компонентами внеклеточного матрикса; 2) стерилизация материала при помощи последовательных циклов заморозки—размораживания; 3) обработка γ -радиацией; 4) репопуляция полуживых фибробластами дермы (Flasza et al., 2007). Полученный материал обладает высокой прочностью, а комплекс его биологических свойств в целом соответствует перечисленным выше критериям. Однако производство ICX-SKN занимает длительное время (7 нед только для первого этапа), что, несомненно, обусловит высокую стоимость производства. Несмотря на благоприятные результаты ограниченных клинических испытаний



Культура фибробластов крайней плоти новорожденных.

Масштабные отрезки: а — 100 мкм, б — 50 мкм.

(Boyd et al., 2007), ICX-SKN до сих пор не используется в широкой клинической практике.

Оптимизация описанной выше технологии привела к созданию комбинированного материала ICX-PRO (CY-ZACT), основанного на росте аллогенных фибробластов дермы в толще фибринового геля биологического происхождения. Данный материал разрабатывался для применения в терапии персистирующих хронических язв, однако клинические испытания не подтвердили его эффективность при использовании консервативных критериев анализа (Alderton et al., 2010). Также компанией Healthpoint Ltd. были разработаны материалы KERAGRAF и «EpiDex», при изготовлении которых использовались аутологичные клетки эпителиального влагилица корня волоса, дифференцирующиеся *in vitro* в эпидермальные кератиноциты (Tausche et al., 2003; Ortega-Zilic et al., 2010). Следует отметить, что, несмотря на значительный регенеративный потенциал клеток волосяных фолликулов человека и доступность этого ресурса (Чермных и др., 2010), этот клеточный субстрат почти не применяется в разработке заменителей кожи.

«Культивируемый заменитель кожи» (CSS) является материалом, сочетающим культивируемые аутологичные эпидермальные кератиноциты и фибробласты дермы, выращиваемые в течение 3—4 нед на коллагеновых и гликозаминогликановых подложках (Boyce et al., 1988; Hansbrough et al., 1989; Harriger et al., 1995). Интересным компонентом «Культивируемого заменителя кожи» являются меланоциты кожи, что теоретически позволяет восстановить природную пигментацию, однако сообщалось о трудности получения однотонной окраски заданной интенсивности у реципиентов трансплантаций. Эффективность «Культивируемого заменителя кожи» была подтверждена в клинических испытаниях (Boyce et al., 1995, 2006), и этот материал оценивается как наиболее перспективный тип заменителей кожи, основанных на применении аутологичных клеток (Shores et al., 2007).

Первым из комбинированных заменителей кожи, основанных на применении живых клеток и получивших одобрение Управления по контролю над продуктами и лекарствами США (FDA), стал «Apligraf» (ex-«Graftskin», Organogenesis Inc., США; одобрен для лечения венозных язв в 1998 г.) (Bell et al., 1981). Материал основан на экспансии аллогенных фибробластов крайней плоти ново-

рожденных на подложке из бычьего коллагена I типа высокой степени очистки. Поверх этого слоя культивируются эпидермальные кератиноциты, *in vitro* формирующие роговой слой (stratum corneum) на границе жидкостной и воздушной сред (Wilkins et al., 1994). Таким образом, «Apligraf» в высокой степени имитирует гистологическое строение кожи. Данная технология была с успехом применена также группой китайских исследователей, разработавших точный аналог «Apligraf»; авторами сообщалось о том, что на этапе индукции формирования кератиноцитами рогового слоя ими использовалась питательная среда, содержащая аскорбиновую кислоту, дексаметазон и CaCl₂ (Nie et al., 2007).

Следует отметить более низкий уровень экспансии фибробластов по сравнению с кератиноцитами, что усложняет производство материала (Compton et al., 1998). Однако при этом установление первичной культуры фибробластов крайней плоти новорожденных и их экспансия *in vitro* не представляют технических сложностей (см. рисунок). В ходе масштабных клинических испытаний, участниками которых стали больные, страдающие синдромом «диабетической стопы» и незаживающими ишемическими язвами нижних конечностей, «Apligraf» продемонстрировал высокую эффективность (Eaglstein et al., 1995; Sabolinski et al., 1996; Falanga et al., 1998; Falanga, 2000), как и его аналог (Nie et al., 2007). В настоящее время «Apligraf» применяется весьма широко, преимущественно по поводу диабетических поражений кожи, реже по поводу хирургических ран, буллезного эпидермолиза и ожогов (в сочетании с аутотрансплантацией). Интересно то, что хотя в таком варианте применения «Apligraf» не влияет на приживление аутотрансплантата, он значимо влияет на такие параметры, как пигментация и упругость участка прижившегося аутотрансплантата, что может быть обусловлено локальным проангиогенным эффектом (Waymack et al., 2000). Несмотря на свою высокую цену, в течение определенного времени являющуюся максимальной среди раневых покрытий всех типов (Jones et al., 2002), применение данного материала характеризуется высоким соотношением эффективности и стоимости (Kirsner et al., 1999; Schonfeld et al., 2000). Также обращает на себя внимание крайне низкий срок хранения «Apligraf» (всего 5 сут), что несколько ограничивает его применение.

В 2001 г. одобрение Управления по контролю над продуктами и лекарствами США получил также «Dermagraft» (Advanced BioHealing, Inc.; АВН, США). Данный материал основан на экспансии аллогенных фибробластов крайней плотности новорожденных в циркулирующей питательной среде на «вязаной» полимерной основе из полигликолевой кислоты (дексона) или полилактина—910 (викрила, который используется, в частности, в производстве рассасывающихся хирургических нитей) (Cooper et al., 1991). Фибробласты активно секретуют факторы роста и биологические компоненты дермы (коллаген, тенасцин, витронектин и гликозаминогликаны) и сохраняют жизнеспособность даже после заморозки (Cooper et al., 1991). Фибробласты выживают в сайте трансплантации в течение длительного времени, продолжая секретировать ростовые факторы и привлекая клетки реципиента (Mansbridge et al., 1998; Harding et al., 2005). При этом срок существования имеющей исходно высокую прочность биодеградируемой полимерной основы составляет от 3 до 4 нед. Как и «Apligraf», «Dermagraft» нашел более широкое применение в терапии поражений кожи диабетического генеза, чем в лечении ожогов; также он применяется по поводу хирургических ран (Naughton et al., 1997; Pollak et al., 1997; Allenet et al., 2000; Hanft, Surprenant, 2002; Marston et al., 2003). Принципиально сходный подход используется в разработке отечественных заменителей кожи, основанных на применении аллогенных дермальных фибробластов (Мельцова и др., 2005; Гриценко и др., 2007).

Этим же производителем (Advanced BioHealing, Inc., США) был разработан материал «Transcyte» (также «Dermagraft-ТС»), представляющий собой децеллюляризованный продукт экспансии аллогенных фибробластов крайней плотности новорожденных на подложке, состоящей из нейлона и свиного коллагена (Hansbrough, 1995). После культивирования в течение 2,5 нед, в течение которых, как и в приведенном выше примере, фибробласты активно секретуют факторы роста и биологические компоненты дермы, клетки убивают замораживанием. Несомненным преимуществом «Transcyte» является его стабильность. По своей эффективности данный материал считается эквивалентом трупной кожи и ограниченно применяется в лечении ожогов (одобрен Управлением по контролю над продуктами и лекарствами США в 1997 г.) (Purdue et al., 1997; Demling, DeSanti, 1999; Lukish et al., 2001).

Еще одним типом комбинированного раневого покрытия является «OrCel» (Ortec International, Inc., США). Данный материал (одобрен Управлением по контролю над продуктами и лекарствами США в 2001 г.) основан на использовании двух типов клеток аллогенного происхождения. При этом используется пористый материал на основе бычьего коллагена, одна сторона которого покрыта пепсинизированным нерастворимым коллагеном. В течение 10—15 сут аллогенные фибробласты крайней плотности новорожденных культивируются на пористой стороне коллагеновой подложки, кератиноциты того же донора — на непористой стороне. Предполагается, что биологический эффект «OrCel» обусловлен, в частности, секреторной активностью фибробластов, но сведения об эффективности этого материала в клинических приложениях ограничены (Still et al., 2003).

Заключение

Результаты применения любых типов заменителей кожи (синтетических, биологических или комбинированных) зависят от особенностей раны (рекомендуется обзор: Scott, Tredget, 2005), в частности от ее этиологии, глубины, площади, инфицированности, возраста реципиента и т. д. Удачный подбор конкретного типа заменителя кожи и его эффективное применение могут быть основаны только на понимании хирургом (трансплантологом) патофизиологии раневого процесса. Большое значение имеют различия между биологическими свойствами используемых типов клеток, в том числе индивидуальных субпопуляций фибробластов и кератиноцитов, как в норме, так и при патологии (например, на фоне сахарного диабета) или в зависимости от условий культивирования *in vitro* (Швед и др., 2007; Спичкина и др., 2008а, 2008б; Nolte et al., 2008). Человеческая кожа имеет чрезвычайно сложную структуру, эффективно выполняя широкий ряд биологических функций: барьерную (в том числе фотозащитную), терморегуляторную, метаболическую, эндокринную, экскреторную, депонирующую, рецепторную и иммунную. Раневые покрытия и заменители кожи способны лишь в ограниченной степени выполнять некоторые из этих функций. Более того, ни один разработанный к настоящему времени тип заменителей кожи (в том числе биологических и комбинированных) не способен являться универсальным, обеспечивая одинаковую эффективность применения в разных клинических ситуациях, даже на разных фазах течения одного и того же клинического случая. Это делает весьма актуальным продолжение исследований, направленных на разработку новых типов материалов, применимых в качестве временных и постоянных заменителей кожи, и тщательное изучение их свойств.

Работа поддержана Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Госконтракт № К-32-НИР/111-3) в рамках программы Союзного государства «Стволовые клетки».

Список литературы

- Гриценко В. В., Орловский П. И., Блинова М. И., Пинаев Г. П., Сабельников В. В., Томсон В. В., Прокопец А. И., Мельцова А. Ж., Юдинцева Н. М., Шулепова Е. К. 2007. Применение дермальных фибробластов в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии. Вестник хирургии им. И. И. Грекова. 1 (1) : 72—77.
- Мельцова А. Ж., Сабельников В. В., Гриценко В. В., Шулепова Е. К., Прокопец А. И., Пинаев Г. П., Блинова М. И., Юдинцева Н. М. 2005. Применение аллогенных дермальных фибробластов в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии. Стационарозамещающие технологии. Амбулаторная хирургия. 3 (19) : 34—36.
- Райдан М., Шубин Н. А., Блинова М. И., Прохоров Г. Г., Пинаев Г. П. 2011. Влияние охлаждения до низких температур на жизнеспособность кератиноцитов кожи человека, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Цитология. 53 (1) : 22—30.
- Спичкина О. Г., Пинаев Г. П., Петров Ю. П. 2008а. Анализ гетерогенности кератиноцитов человека, взаимодействующих с иммобилизованными фибронектином, коллагенами I и IV типов. Цитология. 50 (3) : 210—217.
- Спичкина О. Г., Пинаев Г. П., Петров Ю. П. 2008б. Сравнительный анализ гетерогенности популяции кератиноцитов

человека по степени адгезии к субстрату и по соотношению содержания кератина 19 к актину. Цитология. 50 (3) : 218—227.

Черных Э. С., Радохина Н. В., Руткевич П. Н., Шевелев А. Я., Власик Т. Н., Воротеляк Е. А., Васильев А. В., Терских В. В. 2010. Культивированные клетки волосяного фолликула человека способны встраиваться в структуру кожи *in vivo*. Цитология. 52 (3) : 219—224.

Швед Ю. А., Кухарева Л. В., Зорин И. М., Блинова М. И., Билибин А. Ю., Пинаев Г. П. 2007. Взаимодействие культивируемых клеток кожи с разными структурными формами коллагена, нанесенного на полилактидную матрицу. Цитология. 49 (1) : 32—39.

Alderton W., Davenport R., Fish P. V. 2010. Regenerative medicine: a new frontier for therapeutic intervention highlights from the Society for Medicines Research symposium. *Drugs Fut.* 35 : 517—521.

Alletet B., Parea F., Lebrun T., Carr L., Posnett J., Martini J., Yvon V. 2000. Cost-effectiveness modeling of Dermagraft for the treatment of diabetic foot ulcers in the French context. *Diabetes Metab.* 26 : 125—132.

Bell E., Ehrlich H., Buttle D., Nakatsuji T. 1981. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science.* 211 : 1052—1054.

Bello Y. M., Falabella A. F., Eaglstein W. H. 2001. Tissue-engineered skin. Current status in wound healing. *Amer. J. Clin. Dermatol.* 2 : 305—313.

Bianchini V., Pelucchi S., Galassi G., Mandrioli G., Ciorba A., Pastore A. 2008. Use of autologous dermal graft in the treatment of parotid surgery wounds for prevention of neck scars: preliminary results. *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 37 : 174—178.

Bolivar-Flores J., Poumian E., Marsch-Moreno M., Montes de Oca G., Kuri-Harcuch W. 1990. Use of cultured human epidermal keratinocytes for allografting burns and conditions for temporary banking of the cultured allografts. *Burns.* 16 : 3—8.

Boyce S. T., Anderson B. A., Rodriguez-Rilo H. L. 2006. Quantitative assay for quality assurance of human cells for clinical transplantation. *Cell Transplant.* 15 : 169—174.

Boyce S. T., Christianson D. J., Hansbrough J. F. 1988. Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. *J. Biomed. Mater. Res.* 22 : 939—957.

Boyce S. T., Goretsky M. J., Greenhalgh D. G., Kagan R. J., Rieman M. T., Warden G. D. 1995. Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. *Ann. Surg.* 222 : 743—752.

Boyd M., Flaszka M., Johnson P. A., Roberts J. S., Kemp P. 2007. Integration and persistence of an investigational human living skin equivalent (ICX-SKN) in human surgical wounds. *Regen. Med.* 2 : 363—370.

Bromberg B. E., Song I. V. 1965. Pigskin heterografts. *Minn. Med.* 48 : 1605—1609.

Butler V. E., Orgill D. P. 2005. Simultaneous *in vivo* regeneration of neodermis, epidermis and basement membrane. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 94 : 23—41.

Chan E. S., Lam P. K., Liew V. T., Lau H. V., Yen R. S., King W. W. 2001. A new technique to resurface wounds with composite biocompatible epidermal graft and artificial skin. *J. Trauma.* 50 : 358—362.

Chick L. R. 1988. Brief history and biology of skin grafting. *Ann. Plast. Surg.* 21 : 358—365.

Colocho G., Graham W. P., Greene A. E., Matheson D. W., Lynch D. 1974. Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing. *Arch. Surg.* 109 : 370—373.

Compton C. C., Butler C. E., Yannas I. V., Warland G., Orgill D. P. 1998. Organized skin structure is regenerated *in vivo* from collagen-GAG matrices seeded with autologous keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 110 : 908—916.

Cooper M. L., Hansbrough J. F., Spielvogel R. L., Cohen R., Barrel R. L., Naughton G. 1991. *In vivo* optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Biomaterials.* 12 : 243—248.

Cuono V., Langdon R., McGuire J. 1986. Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacements after burn injury. *Lancet.* 1 : 1123—1124.

Demling R. H., DeSanti L. 1999. Management of partial thickness facial burns (comparison of topical antibiotics and bio-engineered skin substitutes). *Burns.* 25 : 256—261.

Eaglstein W. H., Iriondo M., Laszlo K. 1995. A composite skin substitute (graftskin) for surgical wounds. A clinical experience. *Dermatol. Surg.* 21 : 839—843.

Falanga V. J. 2000. Tissue engineering in wound repair. *Adv. Skin. Wound Care.* 13 : 15—19.

Falanga V., Margolis D., Alvarez O., Auletta M., Maggiacomo F., Altman M., Jensen J., Sabolinski M., Hardin-Young J. 1998. Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. *Arch. Dermatol.* 134 : 293—300.

Flaszka M., Kemp P., Shering D., Qiao J., Marshall D., Bokta A., Johnson P. A. 2007. Development and manufacture of an investigational human living dermal equivalent (ICX-SKN). *Regen. Med.* 2 : 903—918.

Freshwater M. F., Krizek T. J. 1971. Skin grafting of burns: a centennial. A tribute to George David Pollock. *J. Trauma.* 11 : 862—865.

Green H., Kehinde O., Thomas J. 1979. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76 : 5665—5668.

Hanft J. R., Surprenant M. S. 2002. Healing of chronic foot ulcers in diabetic patients treated with a human fibroblast-derived dermis. *J. Foot Ankle Surg.* 41 : 291—299.

Hansbrough J. 1995. Status of cultured skin replacement. *Wounds.* 7 : 130—136.

Hansbrough J., Boyce S., Cooper M., Foreman T. J. 1989. Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate. *JAM.* 262 : 2125—2130.

Harding K. G., Moore K., Phillips T. J. 2005. Wound chronicity and fibroblast senescence — implications for treatment. *Int. Wound J.* 2 : 364—368.

Harriger M. D., Warden G. D., Greenhalgh D. G., Kagan R. J., Boyce S. T. 1995. Pigmentation and microanatomy of skin regenerated from composite grafts of cultured cells and biopolymers applied to full-thickness burn wounds. *Transplantation.* 59 : 702—707.

Heck E., Bergstresser P., Baxter V. 1985. Composite skin grafts: frozen dermal allografts support the engraftment and expansion of autologous epidermis. *J. Trauma.* 25 : 106—112.

Hefton J. M., Caldwell D., Biozes D. G., Balin A. K., Carter D. M. 1986. Grafting of skin ulcers with cultured autologous epidermal cells. *J. Amer. Acad. Dermatol.* 14 : 399—405.

Hefton J. M., Madden M. R., Finkelstein J. L., Shires G. T. 1983. Grafting of the burn patient with allografts of cultured epidermal cells. *Lancet.* 2 : 428—430.

Herman A. R. 2002. The history of skin grafts. *J. Drugs Dermatol.* 1 : 298—301.

Jones I., Currie L., Martin R. 2002. A guide to biological skin substitutes. *Br. J. Plastic. Surg.* 55 : 185—193.

Kirsner R., Falanga V., Fivenson D., Thibodeaux K., Cavorisi J., de la Pava D., Brem H., Golomb V. A. 1999. Clinical experience with a human skin equivalent for the treatment of venous leg ulcers: process and outcomes. *Wounds.* 11 : 137—144.

Lam P. K., Chan E. S., To E. W., Lau H. V., Yen S. V., King W. W. 1999. Development and evaluation of a new composite Laserskin graft. *J. Trauma.* 47 : 918—922.

Lobmann R., Pittasch D., Muhlen I., Lehnert H. 2003. Autologous human keratinocytes cultured on membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid for grafting in nonhealing diabetic foot lesions: a pilot study. *J. Diabetes Complications.* 17 : 199—204.

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. V., Powell D. M., Hartman G. E. 2001. The use of a bioactive skin substitute decreases length of stay for pediatric burn patients. *J. Pediatr. Surg.* 36 : 1118—1121.

- MacFarlane D. F. 2006. Current techniques in skin grafting. *Adv. Dermatol.* 22 : 125—138.
- Mansbridge J., Liu K., Patch R., Symons K., Pinney E. 1998. Three-dimensional fibroblast culture implant for the treatment of diabetic foot ulcers: metabolic activity and therapeutic range. *Tissue Eng.* 4 : 403—414.
- Marston W. A., Hanft J., Norwood P., Pollak R. 2003. Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study Group. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care.* 26 : 1701—1705.
- Naughton G., Mansbridge J., Gentzkow G. 1997. A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers. *Artif. Organs.* 21 : 1203—1210.
- Nie X., Zhang J. Y., Cai K. J., Yang M. H., Xiao A. H., Da Hu H., Liu L. Y., Wang H. J., Wen N., Jin Y. 2007. Cosmetic improvement in various acute skin defects treated with tissue-engineered skin. *Artif. Organs.* 31 : 703—710.
- Nolte S. V., Xu W., Rennekampff H. O., Rodemann H. P. 2008. Diversity of fibroblasts — a review on implications for skin tissue engineering. *Cell Tissues Organs.* 187 : 165—176.
- O'Connor N. E., Mulliken J. B., Banks-Schlegel S., Kehinde O., Green H. 1981. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet.* 1 : 75—78.
- Ortega-Zilic N., Hunziker T., Lauchli S., Mayer D. O., Huber V., Baumann Conzett K., Sippel K., Borradori L., French L. E., Hafner J. 2010. EpiDex Swiss field trial 2004—2008. *Dermatology.* 221 : 365—372.
- Ott G. 1970. Skin prostheses. *Ergeb. Chir. Orthop.* 54 : 45—71.
- Parrish R. A., Tippens J. K., Pulloam M. M., Moretz W. H. 1964. Formalized skin substitute for grafting burns: a preliminary report. *Amer. Surg.* 30 : 793—798.
- Phillips T. J. 1993. Biologic skin substitutes. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 19 : 794—800.
- Pigeon J. 1960. Treatment of second-degree burns with amniotic membranes. *Can. Med. Assoc. J.* 83 : 844—845.
- Pollak R. A., Edington H., Jensen J. L., Kroeker R. O., Gentzkow G. D., the Dermograft Diabetic Ulcer Study Group. 1997. A human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wounds.* 9 : 175—183.
- Pruitt B. A., Levine N. S. 1984. Characteristics and uses of biologic dressings and skin substitutes. *Arch. Surg.* 119 : 312—322.
- Purdue G. F., Hunt J. L., Still J. M., Law E. J., Herndon D. N., Goldfarb I. W., Schiller W. R., Hansbrough J. F., Hickerson W. L., Himmel H. N., Kealey G. P., Twomey J., Missavage A. E., Solum L. D., Davis M., Totortitis M., Gentzkow G. D. 1997. A multi-center clinical trial of a biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds. *J. Burn Care Rehabil.* 18 : 52—57.
- Ramos-e-Silva M., Ribeiro de Castro M. V. 2002. New dressings, including tissue-engineered living skin. *Clin. Dermatol.* 20 : 715—723.
- Rheinwald J., Green H. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 6 : 331—344.
- Sabolinski M. L., Alvarez O., Auletta M., Mulder G., Parenteau N. L. 1996. Cultured skin as a «smart material» for healing wounds: experience in venous ulcers. *Biomaterials.* 17 : 311—320.
- Sachs A., Watson J. 1969. Four years' experience at a specialized burns centre. The McIndoe Burns Centre 1965—68. *Lancet.* 1 : 718—721.
- Schonfeld W. H., Villa K. F., Fastenau J. M., Mazonson P. D., Falanga V. 2000. An economic assessment of Apligraf (Graftskin) for the treatment of hard-to-heal venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 8 : 251—257.
- Scott P. G., Tredget E. E. 2005. Skin construct or biological bandage? *Lancet.* 366 : 788—790.
- Sheridan R. L., Tompkins R. G. 1999. Skin substitutes in burns. *Burns.* 25 : 97—103.
- Shores J. T., Gabriel A., Gupta S. 2007. Skin substitutes and alternatives: a review. *Adv. Skin Wound Care.* 20 : 493—508.
- Still J., Glat P., Silverstein P., Griswold J., Mozingo D. 2003. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. *Burns.* 29 : 837—841.
- Tausche A. K., Skaria M., Bohlen L., Liebold K., Hafner J., Friedlein H., Meurer M., Goedkoop R. J., Wollina U., Salomon D., Hunziker T. 2003. An autologous epidermal equivalent tissue-engineered from follicular outer root sheath keratinocytes is as effective as split-thickness skin autograft in recalcitrant vascular leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 11 : 248—252.
- Todaro G. J., Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17 : 299—313.
- Uccioli L. 2003. A clinical investigation on the characteristics and outcomes of treating chronic lower extremity wounds using the tissuetech autograft system. *Int. J. Low Extrem. Wounds.* 2 : 140—151.
- Wanke M., Grozinger K. H. 1965. Collagen foils as temporary skin replacement. Clinical and anatomopathological studies. *Klin. Wochenschr.* 43 : 975—980.
- Waymack P., Duff R. G., Sabolinslc J. M. 2000. 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.* 26 : 609—619.
- Wilkins L., Watson S., Prosky S., Meunier S. F., Parenteau N. L. 1994. Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnol. Bioeng.* 43 : 747—756.

Поступила 3 X 2011

CELL TECHNOLOGIES AND THE DEVELOPMENT OF SKIN SUBSTITUTES

S. V. Anisimov

V. A. Almazov Federal Center for Heart, Blood and Endocrinology and Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: askold5@front.ru

Large skin lesions might be of different cause and sometime resistant to the conventional and surgical treatment. For many years, skin grafting used to serve one of the most important methods to treat large and deep skin lesions. However, a limited availability of the substrate for transplantation restricts wider application of the approach. Utilization of wound covers and skin replacements of various types (including synthetic, biological and biosynthetic ones) provides an alternative. Skin substitutes — biosynthetic covers of the complex structure — constitute the most important niche in a wide spectrum of wound covers developed and actively utilized by today. Cell substrates used in the former include dermal fibroblasts, neonatal foreskin fibroblasts and keratinocytes. In the current review, key properties of the modern skin substitutes, structure features of the most widespread types, and principle of the work with the particular cell types are analyzed. Comparative analysis of the efficiency of wound covers is provided.

Key words: wound covers, skin substitutes, cell technologies, cell culture.