

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 616.3; 576.5; 57.089-03

Поступила в редакцию 05.05.2017

Received 05.05.2017

И. Д. Волотовский, З. Б. Квачева*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННОЙ КОЖИ
(ДЕРМАЛЬНЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ)**

Статья представляет собой обзор литературных и собственных данных авторов о строении кожи и ее структурных компонентов – эпидермиса, дермы и гиподермы. Приводятся данные об особенностях функций каждого из слоев, их структурно-функциональном взаимодействии. Особое внимание уделено дерме и ее основному надмолекулярному компоненту – межклеточному матриксу и роли фибробластов в его формировании. Описывается молекулярное строение коллагена, роль альфа-спиральных участков и зарядов в стабилизации структуры макромолекулы и уровни надмолекулярной организации его макромолекул в дерме. Рассмотрены строение и функции фибробластов и особенности взаимодействия этого класса дермальных клеток с межклеточным матриксом. Описаны методы выделения и культивирования фибробластов и получения коллагена из биологического соединительнотканного материала. Анализируются морфофункциональные основы создания искусственной кожи (дермальных и тканевых эквивалентов). Дана оценка перспектив развития нового биотехнологического направления – создания искусственных дермальных и тканевых эквивалентов и их использования в клинической практике для лечения повреждений кожи, полученных в результате воздействия физических и химических факторов.

Ключевые слова: кожа, дерма, фибробласты, коллаген, межклеточный матрикс.

I. D. Volotovskii, Z. B. Kvacheva*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***MORPHOLOGY AND FUNCTION BASIS OF THE CREATION ARTIFICIAL SKIN
(DERMAL EQUIVALENTS)**

The review of literature data and own results of the authors on skin structure, and skin structural components epidermis, derma and hypoderm are given. The special attention for derma intercellular matrix and role of fibroblasts in its shaping was paid. The methods of isolation and cultivation of fibroblasts and collagen isolation from connective tissue and development prospects of this biotechnology direction were described. The creation of artificial derma and tissue equivalents and its application in clinic praxis to treat the skin damages under the action of chemical and physical factors were considered.

Keywords: skin, derma, fibroblasts, collagen, intercellular matrix.

Кожа – орган, выполняющий барьерные функции между внешней и внутренней средами организма. Кожа участвует в дыхании, терморегуляции и является носителем множества рецепторов чувствительности (болевой, тактильной, температурной и др.), выполняя экскреторную, эндокринную, рецепторную, иммунную и метаболические функции. В последние годы в ряде научных коллективов ближнего и дальнего зарубежья проводятся интенсивные исследования по созданию модельных кожных покровов с целью их использования в клинике для лечения повреждений кожи, полученных в результате воздействия факторов химической и физической природы.

Строение кожи. У взрослого человека площадь кожи составляет 1,5–2,3 м², или 4–6 % от общей массы тела. Кожа состоит из трех структурных компонентов (рис. 1): наружного – эпидермиса, построенного из нескольких слоев ороговевающих эпителиальных клеток (кератиноцитов), среднего – дермы и внутреннего – гиподермы [1–3].

Эпидермис включает 5 слоев (зон) эпидермальных клеток кератиноцитов: базальный (ростковый), шиповидный, зернистый, блестящий и роговой. В глубоких слоях эпидермиса клетки живые, они активно функционируют и делятся, постепенно передвигаясь к поверхности. Погибая, эти клетки превращаются в чешуйки, которые постепенно удаляются с поверхности кожи. Таким образом происходит обновление клеточных элементов эпидермиса.

Дерма несет основную функциональную нагрузку в коже, являясь ее структурно-клеточной опорой.

Дерма состоит из двух слоев – папиллярного и ретикулярного. В первом содержатся капилляры, нервные окончания, а во втором – кровеносные и лимфатические сосуды, нервные окончания, фолликулы волос, потовые железы. Структурные элементы, находящиеся в этом слое, формируют так называемый межклеточный матрикс (МКМ), представляющий собой сложный надмолекулярный трехмерный комплекс, организованный фибриллярными белками и связанными с ними клетками. МКМ обладает ярко выраженными биомеханическими свойствами и обеспечивает коже структурную целостность.

В МКМ входят разнообразные белки и низкомолекулярные биологически активные соединения, а именно фибриллярные белки коллагены I–VII типов, гликопротеины, металлопротеиназы, циклины и различные факторы роста. МКМ условно делится на фибриллярный (густую сеть фибрилл) и аморфный (собственно матрикс) компоненты. Второй по своей структуре сходен с гелем и состоит из полисахаридов.

Хотя каждый из коллагенов, входящих в состав дермы, кодируется своим геном, их вторичная и третичные структуры имеют общие признаки. Макромолекулы коллагенов (третичная структура) состоят из трех полипептидных цепей, которые связаны друг с другом ковалентными связями и закручены в спираль. Они получили название тропоколлагенов. Каждая из цепей имеет свои аминокислотную последовательность, степень гидроксирования и гликозирования аминокислотных остатков. На один виток альфа-спирали приходится три аминокислотных остатка. Молекулярная масса коллагена составляет 300 кДа, длина макромолекулы порядка 300 нм, а толщина 1,5 нм. Структурные единицы коллагена (тропоколлагены) спонтанно объединяются в более крупные структуры – фибриллы, поддерживаемые межмолекулярными ковалентными связями. Фибриллы объединяются в пучки или тяжи, из которых образуются коллагеновые волокна, представляющие более высокую структурную организацию коллагена. Надмолекулярная организация (толщина) коллагеновых волокон в папиллярном и ретикулярном слоях дермы разная. В папиллярном слое коллагеновые волокна тонкие и диссеминированные, а в ретикулярном – толстые, образующие густую сеть. I, II, III и V типы коллагенов, входящих в состав дермы, несут и разную функциональную нагрузку [4, 5].

На долю коллагена I приходится примерно 90 % от всего содержащегося в дерме белка. Именно коллаген I является основным строительным материалом МКМ. Коллаген III ассоциирован в дерме с кровеносными сосудами, коллаген IV формирует базальную мембрану, отделяющую дерму от эпидермиса и содержащую стволовые и прогениторные клетки – предшественники кератиноцитов. Из коллагена VI построены фибриллы, соединяющие эпидермис и дерму.

Клеточные, белковые и небелковые компоненты дермы. Основным клеточным элементом дермы являются фибробласты. Они содержатся и в папиллярном, и в ретикулярном слоях дермы, продуцируют коллагены I и III типов. Фибробласты папиллярного слоя дермы обладают более высокой синтетической активностью. Подсчитано, что один дифференцированный фибробласт (фиброцит) синтезирует в сутки порядка 3,5 млн молекул коллагена [4].

В дерме содержится также большое количество минорных белков, относящихся по своей природе к гликопротеинам (фибронектин, тромбоспондин, ламинин, энтактин, тенасцин) и протеогликанам (версикан, декорин). Их разделяют на две группы: а) белки, обладающие адгезивными свойствами; б) белки, подавляющие адгезию клеток. Адгезивные белки стабилизируют трехмерную структуру МКМ, а белки, подавляющие адгезию клеток, ее лабилизируют, выполняя сигнальные функции.

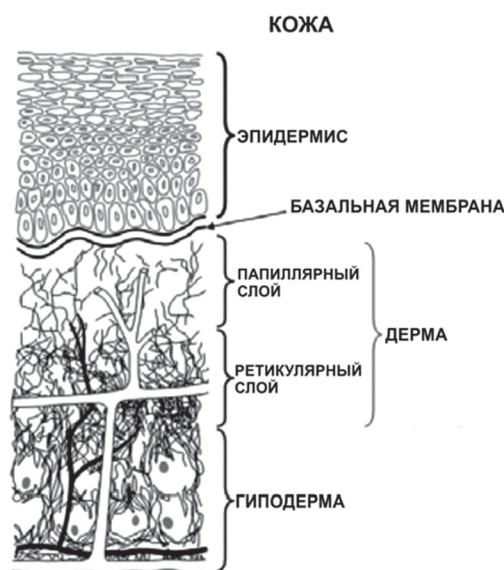


Рис. 1. Схема строения кожи [1]

Fig. 1. The structure of skin [1]

Важную функциональную роль в дерме выполняют матриксные цинк-зависимые металлопротеиназы. Они относятся к классу ферментов эндопептидаз и контролируют деградацию коллагеновых нитей в процессе ремоделирования МКМ.

К небелковым компонентам МКМ относятся гиалуроновая кислота, различные цитокины (лейкотриены IL 1, 6, 10, фактор некроза опухолей α), хемокины, факторы роста и медиаторы воспалительных процессов. Особое место среди небелковых компонентов занимает гиалуроновая кислота, которая отвечает за микровязкость дермы и участвует в ее гидродинамике. С помощью различных факторов роста контролируются эпидермальный морфогенез и ангиогенез.

Практически все белки МКМ продуцируются фибробластами, являющимися основным клеточным компонентом дермы. Это коллагены, кислые мукополисахариды, биологически активные паракринные соединения.

Дерма содержит две большие популяции фибробластов: митотически активные (МАФ), т. е. активно делящиеся, и митотически неактивные (МНАФ) [6, 7]. Предшественником фибробластов являются находящиеся в костном мозге мезенхимальные и гемопоэтические стволовые клетки, в ходе дифференцировки которых образуются сначала митотически активные, прогениторные фибробласты МАФ: $\text{МКС} \rightarrow \text{МАФ1} \rightarrow \text{МАФ2} \rightarrow \text{МАФ3}$, а затем неактивные (МНАФ) и постмитотические (ПМАФ) зрелые фибробласты: $\text{МАФ3} \rightarrow \text{МНАФ} \rightarrow \text{ПМАФ}$. МАФ-клетки относятся к прогениторной популяции, а ПМАФ – к необратимой фиброцитарной популяции [7]. У последней наиболее низкий пролиферативный потенциал, но самая высокая экскреторная активность [7]. Однако в пересчете на клетку финальные клетки ПМАФ и фиброциты продуцируют в 5–8 раз больше общего коллагена, чем МАФ1, МАФ2 и МАФ3 вместе взятые. Это означает, что по мере старения фибробластов специализация клеточных компонентов меняется, начиная с пролиферации клеток (увеличения их численности в общем пуле) и заканчивая ростом их экскреторной активности (синтезом белков и различного рода небелковых биологически активных компонентов).

Самые ранние клеточные продукты дифферона поступают сначала из костного мозга в кровеносное русло [7], а затем в дерму, где и претерпевают ряд изменений. Последние клеточные продукты постмитотические фибробласты превращаются в конечный дермальный клеточный продукт – фиброцит. Согласно другой точке зрения, предшественниками фибробластов являются эмбриональные эндогенные клетки, которые появляются в дерме на стадии эмбриогенеза и сохраняют свои характеристики во взрослом организме [8]. Именно благодаря этому, фибробласты и характеризуются дифференцировочной гетерогенностью. Наконец, фибробласты дермы, находящиеся в ее разных слоях, выполняют свой набор экскреторных и структурных функций, благодаря чему каждый из слоев характеризуется особенностями состава и организации структурных компонентов в МКМ. Что касается биомеханических свойств МКМ, то следует отметить, что они во многом определяются адгезионными свойствами фибробластов и их способностью эффективно взаимодействовать (комплексировать) с коллагеновыми тяжами. Эта способность проявляется и *in vitro*. В культуре фибробласты способны прикрепляться к поверхности культуральной посуды, что является критическим условием проявления их высокой пролиферативной активности.

Фибробласты представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, которая включает мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки и в разной степени дифференцированные фибробласты [7–10]. Популяция этих клеток получила название фибропластического дифферона. При этом клеточный пул МАФ1 обладает самым высоким пролиферативным потенциалом. Перед дифференцировкой в МАФ2 данные клетки претерпевают около 25–30 клеточных делений, в свою очередь клетки МАФ2 превращаются в клетки МАФ3 после 15–20 делений, а клетки МАФ3 перед переходом в ПМАФ – всего лишь 5–8 делений. Видимо поэтому при посеве на твердую питательную среду фибробласты образуют три типа колоний – диффузные, смешанные и плотные, каждая из которых содержит клетки, находящиеся на разных стадиях дифференцировки. В целом, гетерогенность фибропластического дифферона зависит от нескольких факторов: локализации фибробластов и тесно связанными с ней функциональными задачами, выполняемыми клетками в том или ином слое кожи. Если рассматривать функциональные свойства фибробластов, следует отметить, что слои кожи заселены фибробластами, которые находятся на

разных уровнях дифференцировки и отличаются морфологией, пролиферативной активностью и молекулярными характеристиками [8].

Иммунофенотипический анализ «чистой» культуры фибробластов обнаруживает высокий (порядка 99 %) уровень экспрессии коллагенов I и III типов и наличие на поверхности клеток белковых маркеров мезенхимальных клеток, обозначаемых как CD73+, CD90+ и CD105+ (CD – cluster of differentiation). Выявить содержание гемопоэтических стволовых клеток (CD34+ и CD45+) и эпителиальных маркеров (цитокератинов) практически невозможно. Иммунофенотипической особенностью фибробластов является также экспрессия виментина, фибронектина, эластана. К сожалению, ни один из перечисленных выше маркеров не эксклюзивен.

Гиподерма заполнена клетками жировой ткани адипоцитами, отделенными друг от друга тонкими соединительнотканными слоями. Гиподерма характеризуется развитой кровеносной системой, включающей артериолы, вены и кровеносные капилляры, лимфатические сосуды, нервы, которые в совокупности обеспечивают трофику и гиподермы, и дермы.

Уникальные свойства структурных элементов кожи и в первую очередь дермы определили актуальность разработки препаративных подходов их выделения и культивирования. При этом речь идет в первую очередь о фибробластах – основных клеточных компонентах кожи и коллагене I типа, главном белке дермы – механической основе МКМ.

Технологии выделения и культивирования фибробластов. На сегодняшний день в литературе описаны разные методики выделения и культивирования фибробластов [11–15]. Их смысл сводится в основном к следующему. Берется фрагмент (эксплант) кожи размером 1–2 мм, а еще лучше дермы, и помещается в стерильную искусственную питательную среду, в которой фибробласты активно функционируют и эффективно делятся. Последний момент чрезвычайно важен, так как задачей культивирования является накопление как можно большего количества жизнеспособных клеток (клеточной биомассы). В ходе инкубации фрагмента фибробласты мигрируют из экспланта в среду и размножаются. Другой методический подход предусматривает предварительную ферментативную обработку исходного биологического материала трипсином, коллагеназой, диспазой с целью его структурной дезинтеграции и выхода фибробластов за пределы МКМ.

В Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси был выбран первый подход. Сначала из кожи (папиллярного слоя дермы) пациента выделяли небольшой фрагмент размером 2×3 мм, помещали в чашку с ростовой средой, накрывали предметным стеклом с отверстием в центре и переносили в инкубатор на 2 недели. Ростовую среду готовили на основе DMEM (среда Дульбекко) с добавлением 10 % эмбриональной телячей сыворотки. Как только в чашке Петри образовывался сливной монослой, фрагмент переносили в другую чашку с ростовой средой того же состава для получения вторичного монослоя. Манипуляцию с эксплантом повторяли несколько раз. Каждый образовавшийся монослой снимали и пересевали в ростовую среду, содержащую DMEM/F12 в соотношении 3:1 и 10 % от общего объема эмбриональной телячей сыворотки. На третьем пассаже перед трансплантацией в ростовую среду фибробластов вместо телячей сыворотки добавляли 5 % собственной сыворотки пациента. Данный способ позволял в течение 1 мес. накопить в культуре большое количество пролиферативноактивных фибробластов. Схема выделения и экспрессного наращивания фибробластов кожи человека представлена на рис. 2.

В стационарной стадии роста культура фибробластов представлена морфологически однородными клетками (рис. 3), имеющими вытянутую форму. На поверхности клеток с помощью проточной цитофлуориметрии выявлены следующие поверхностные маркеры: CD90+ (92 %), CD 44+ (95 %), CD105+ (76 %), CD73+ (92 %) и белки виментин и фибронектин (97 и 28 % соответственно). Содержание других белков оказалось небольшим: К-19 (маркер эпителиальных клеток – предшественников кератиноцитов) – около 4 % и нестин (белок стволовых клеток) – 3–5 %. Содержание маркеров гемопоэтических стволовых клеток было незначительным: CD45+ – 2 %, CD34+ – 0,1 %. Впрочем, ввиду отсутствия у фибробластов эксклюзивных фенотипических маркеров наблюдаемые показатели культуры фибробластов оказались, при сравнении с литературными данными, практически идентичными чистым культурам фибробластов.

Дополнительные исследования культуры фибробластов дермы на биобезопасность, выполненные с помощью измерений методом ДНК-комет, показали отсутствие у культивированных

клеток генотоксичности по отношению к лимфоцитам периферической крови. Проведены также специальные опыты на цитотоксичность фибробластов. Для этого фибробласты сокультивировали с лимфоцитами периферической крови и оценивали долю некротических и апоптотических клеток в сокультуре. Эти показатели практически не отличались от контрольных величин. Клетки фибробластов не оказывали никакого сенсибилизирующего и раздражающего действия при нанесении на кожу животных и не обладали канцерогенным действием при введении под кожу иммунодефицитным или иммуносупрессивным животным. В ходе наблюдения за животными в течение 2,5 мес. и более опухоли в месте введения фибробластов не обнаруживались.

Моделирование межклеточного матрикса, создание искусственных дермальных эквивалентов. Для восстановления целостности кожного покрова при его разрушении под влиянием физических и химических факторов очень важно вновь воссоздать структуру дермы и его ключевого структурного компонента межклеточного матрикса, что может быть взято за основу при разработке клеточной технологии лечения повреждений кожных покровов.

Моделирование МКМ получило широкое распространение в странах ближнего, в первую очередь в Российской Федерации, и дальнего зарубежья [16–18]. Создаются модельные системы МКМ на основе коллагена I типа и фибробластов, получивших название дермальных или тканевых эквивалентов (биомедицинских клеточных продуктов) кожи. Из простой смеси коллагена



Рис. 2. Схема выделения и экспрессного наращивания фибробластов кожи человека в условиях культуры

Fig. 2. The scheme of isolation and express cultivation of human skin fibroblasts under culture conditions

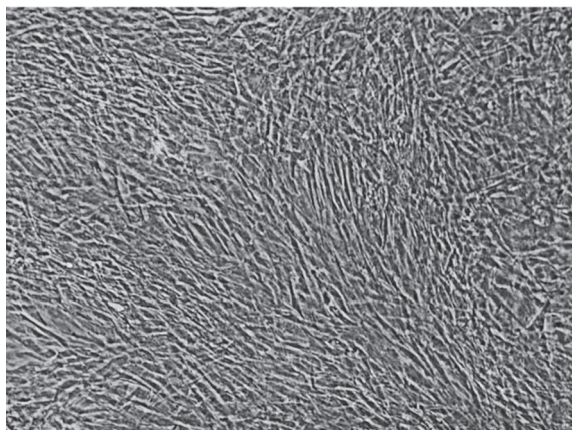


Рис. 3. Монослойная культура фибробластов дермы человека, 2-й пассаж, 4-е сутки роста. Фазово-контрастная микроскопия. $\times 100$

Fig. 3. The monolayer culture of human derma fibroblasts, 2nd passage, 4th day of growth, Fase-contrast microscopy. $\times 100$

в виде пленки или мембраны с введенными в нее фибробластами самоорганизуется сложная надмолекулярная сеть из коллагеновых фибрилл и находящихся в ней фибробластов. При этом между фибриллами и фибробластами постепенно восстанавливаются интенсивные взаимодействия, присущие МКМ *in vivo*, что придает ранее поврежденной коже исходные или близкие к исходным биомеханические свойства.

Коллаген выделяют из соединительной ткани животных (например, из сухожилий) согласно довольно простой процедуре, предложенной П. Е. Анфимовым и Н. С. Красновой (патент Российской Федерации на «Способ получения коллагена из биологического материала»). Материал с высоким содержанием коллагена разрезают на маленькие кусочки (0,5–1 см²) и помещают на 1 ч в 10–20 %-ный раствор NaOH или KOH. Затем фрагменты тщательно промывают проточной водой и помещают в 20 %-ную уксусную кислоту для растворения материала. После этого в раствор добавляют, помешивая, ацетон. Коллаген выпадает в осадок. Сгусток коллагена разрезают на небольшие кусочки, высушивают на воздухе и лиофилизируют.

В последние годы ведутся интенсивные работы по получению генно-инженерного коллагена человека. Следует отметить, что на рынке уже появился рекомбинантный белковый продукт – human like collagen recombinant protein (Novus Biological, США). Однако он представляет собой не трех-, а односпиральную полипептидную цепочку с молекулярной массой 90 кДа. Фирма-изготовитель предлагает его использовать не в клинической практике, а только в научно-исследовательских целях. И хотя данный коллаген не вызывает аллергии и иммунологически полностью совместим с белками и тканями человеческого организма, его использование для создания, например, МКМ дермы вряд ли возможно.

Учитывая данное обстоятельство, широко используется коллаген, получаемый из биологического материала животного происхождения. Животный коллаген не обладает какой-либо токсичностью и не вызывает иммунологического конфликта при контакте с белками и тканями организма человека [19].

В некоторых лабораториях в модельную систему, состоящую из коллагена I типа и фибробластов, добавляются кератиноциты в расчете на то, что они будут способствовать формированию в модели эпидермиса (полный эквивалент дермы) [19, 20]. Остается непонятным, в какой мере в качестве носителя вместо коллагена можно использовать другие биodeградируемые полимерные матрицы (скаффолды), например производные молочной кислоты или хитозана [21]. Дело в том, что и человеческий коллаген I типа, и фибробласты достаточно дороги. Биodeградируемые скаффолды заменить коллаген полностью не смогут, а без него МКМ не образуется. Однако, учитывая, что фибробласты сами синтезируют коллаген, формирование МКМ (правда, в течение более продолжительного времени) исключить нельзя [22]. Именно поэтому в ряде работ предлагается создание дермальных эквивалентов на основе неколлагеновых биodeградируемых скаффолдов. Зарубежные фирмы начали производить биомедицинские клеточные продукты на основе коллагена и других биodeградируемых матриц под разными названиями, они доступны на рынке и используются в клинических условиях для лечения повреждений кожи и в первую очередь ожогов [20, 23].

Ввиду отсутствия юридической базы производимые в ряде научно-исследовательских учреждений Российской Федерации дермальные эквиваленты [24–26] до настоящего времени не получили широкого использования в клинике. С 1 января 2017 г. вступил в силу Закон Российской Федерации «О медицинских клеточных продуктах», регламентирующий все аспекты производства и использования клеточных продуктов в медицинской практике. В 2014 г. внесены дополнения в Закон Республики Беларусь «О здравоохранении», касающиеся биомедицинских клеточных продуктов, и ряд положений о их разработке, оценке биологической активности и порядке регистрации. В связи с этим в ближайшие годы клеточные технологии восстановления кожных покровов займут свое достойное место в арсенале протоколов лечения указанной патологии.

Список использованных источников

1. Stephens, P. Non-epithelial and mucosal progenitor cell population / P. Stephens, P. Genever // Oral Dis. – 2007. – Vol. 13, N 1. – P. 1–10.
2. Sonell, J. M. Fibroblasts – a diverse population at the center of it all / J. M. Sonell, A. I. Caplan / Int. Rev. Cell Mol. Biol. – 2009. – Vol. 276. – P. 161–214.

3. Серов, В. В. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология) / В. В. Серов, А. Б. Шехтер. – М. : Медицина, 1981. – 312 с.
4. Шехтер, А. Б. Фибробласты и развитие соединительной ткани. Ультраструктурные аспекты, биосинтез, фибриллогенез и катаболизм коллагена / А. Б. Шехтер, Г. Н. Берченко // Архив патологии. – 1978. – № 8. – С. 70–80.
5. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts / H. Y. Chang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 99, N 20. – P. 12877–12882.
6. Diversity of fibroblasts – a review of implication for skin tissue engineering cell tissue organs / S. V. Nolte [et al.] // *Cell Tissue Organs.* – 2008. – Vol. 187, N 3. – P. 165–176.
7. Witte, R. P. Keratinocyte fibroblast paracrine interaction: The effects of substrate and culture condition / R. P. Witte, W. J. Kao // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26, N 17. – P. 3673–3682.
8. Бозо, И. Я. Фибробласт – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезехимального происхождения / И. Я. Бозо, Р. В. Деев, Г. П. Пинаев // Цитология. – 2010. – Т. 52. – С. 99–109.
9. Sorrel, J. M. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep / J. Sorrel, M. Caplan // *J. of Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117. – P. 667–675.
10. Age-dependent depletion of if human skin derived progenitor cell / N. Gago [et al.] // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1164–1172.
11. Culturing skin *in vitro* for wound therapy / H. A. Navsaria [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 1995. – Vol. 13, N 3. – P. 91–100.
12. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток : практ. рук. / Р. Я. Фрешни ; пер. с 5-го англ. изд. Ю. Н. Хомякова, Т. И. Хомяковой. – М. : Бином Лаборатория знаний, 2011. – 691 с. – (Методы в биологии).
13. Toma, J. G. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin / J. G. Toma [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 3, N 9. – P. 778–784.
14. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin / J. G. Toma, I. A. McKenzie, D. Bagli, F. D. Miller // *Stem Cells.* – 2005. – Vol. 23. – P. 727–737.
15. Optimizing in vitro culture conditions leads to significantly shorter production time of humandermo-epidermal skin substitutes / L. Pontigia [et al.] // *Pediatr. Surg. Int.* – 2013. – Vol. 29, N 3. – P. 249–256.
16. Varkey, M. Differential collagenglycosaminoglycan matrix remodeling by superficial and deep dermal fibroblasts: Potential therapeutic targets for hypertrophic scar / M. Varkey, J. Ding, E. E. Tredget // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32. – P. 7581–7591.
17. Tajima, S. Collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture: studies of fibroblasts explanted from papillary and reticular dermis / S. Tajima, S. R. Pinnell // *J. Invest. Dermatol.* – 1981. – Vol. 77. – P. 410–412.
18. Richard, A. F. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds / A. F. Richard, C. K. Ghosh, M. G. Tonnesen // *J. Invest. Dermatol.* – 2007. – Vol. 127. – P. 1018–1029.
19. Cultivation of keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional bovine collagen-elastin matrix (Matriderm®) and application for full thickness wound coverage *in vivo* / J. Killat [et al.] // *Int. J. Mol.* – 2013. – Vol. 14. – P. 14460–14474.
20. Petrof, G. Cell therapy in dermatology / G. Petrof, A. Abdul-Wahab, J. A. McGrath // *Cold Spring Harb. Perspect Med.* – 2014. – Vol. 4, N 6. – P. 1–29.
21. Minlong, Y. L. Study on biodegradable polymers synthesis and characterization of poly (DL-lactic acid-co L-Lysine) random copolymer / Y. L. Minlong, Y. Xianmo // *Eur. Polymer J.* – 2003. – Vol. 39, N 5. – P. 977–983.
22. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA / M. Ali-Bahar [et al.] // *Wound Repair Regen.* – 2004. – Vol. 12, N 2. – P. 175–182.
23. Huanjing, B. Current progress of skin tissue engineering seed cells bioscaffolds and construction strategies / B. Huanjing, J. Yan // *Burns & Trauma.* – 2013. – Vol. 1, N 2. – P. 63–72.
24. Современные методы клеточной терапии при лечении ожогов / С. В. Смирнов [и др.] // *Хирургия.* – 2003. – № 12. – С. 58–62.
25. Клеточные технологии для регенеративной медицины : сборник / под ред. Г. П. Пинаева, М. С. Богдановой, А. М. Кольцовой. – СПб. : Изд-во Политех. ун-та, 2011. – 333 с.
26. Туманов, В. П. 30-летний опыт разработки и применения клеточных технологий в клинической практике / В. П. Туманов, Д. А. Жакота, Н. С. Корчагина // *Пластическая хирургия и косметология.* – 2012. – № 3. – С. 433–449.

References

1. Stephens P., Genever P. Non-epithelial and mucosal progenitor cell population. *Oral Diseases*, 2007, vol. 13, pp. 1–10. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01314.x.
2. Sonell M., Caplan A. I. Fibroblasts – a diverse population at the center of it all. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2009, vol. 276, pp. 161–214.
3. Serov V. V., Shekhter A. B. *Connective tissue. Functional morphology and general pathology*. Moscow, Meditsina [Medicine], 1981. 82 p. (in Russian).
4. Shekhter A. B., Berchenko G. N. Fibroblasts and development of connective tissue. Ultrastructural aspects, biosynthesis, fibrillogenesis, and collagen catabolism. *Archiv patologii* [Archive of Pathology], 1978, vol. 8, pp. 70–81. (in Russian).
5. Chang H. Y., Chi J. T., Dudoit S., Bondre C., Van de Rijck M., Borstein D., Brown P. O. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 2002, vol. 99, no. 20, pp. 12877–12882. doi: 10.1073/pnas.162488599.
6. Nolte S. V., Xu W., Rennekampff H. O., Rodemann H. P. Diversity of fibroblasts – a review of implication for skin tissue engineering cell tissue organs. *Cells Tissues Organs*, 2008, vol. 187, no. 3, pp. 165–176.
7. Witte R. P., Kao W. J. Keratinocyte fibroblast paracrine interaction: The effects of substrate and culture condition. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 17, pp. 3673–3682. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.054.

8. Bozo I. Ia., Deev R. V., Pinaev G. P. Fibroblast – a specialized cell or functional state of the cells of mesenchimal origin. *Tsitologiya* [Cytology], 2010, vol. 52, pp. 99–109. (in Russian).
9. Sorrel J. M., Caplan A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of Cell Science*, 2004, vol. 117, pp. 667–675. doi: 10.1242/jcs.01005.
10. Gago N., Perez-Lopes V., Sanz-Jaka J., Cormenzana P., Eizaguirre I., Bernad A., Izata A. Age-dependent depletion of human skin derived progenitor cell. *Stem Cells*, 2009, vol. 27, pp. 1164–1172. doi:10.1002/stem.27.
11. Navsaria H. A., Myers S. R., Leigh I. M., McKay I. A. Culturing skin in vitro for wound therapy. *Trends Biotechnology*, 1995, vol. 13, no. 3, pp. 91–100. doi: 10.1016/S0167-7799(00)88913-1.
12. Freshni, R. Ia. *Culture of animal cells: practical guidance*, series: Methods in Biology, translation from the 5th English edition: Iu. N. Khomiakov, T. I. Khomiakova. Moscow, Binom Laboratoriia znaniy [Binom Knowledge Laboratory], 2011. 691 p. (in Russian).
13. Toma J., Akhavan M., Fernandes K., Toma J. G., Akhavan M., Fernandes K. J., Barnabé-Heider F., Sadikot A., Kaplan D. R., Miller F. D. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology*, 2001, vol. 3, no. 9, pp. 778–784. doi: 10.1038/ncb0901-778.
14. Toma J. G., McKenzie I. A., Bagli D., Miller F. D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*, 2005, vol. 23, pp. 727–737. doi: 10.1634/stemcells.2004-0134.
15. Pontigia L., Klar A., Bottcher-Haberzeth S., Biedermann T., Meuji M., Reichman E. Optimizing *in vitro* culture conditions leads to significantly shorter production time of human-dermo-epidermal skin substitutes. *Pediatric Surgery International*, 2013, vol. 29, no. 3, pp. 249–256. doi: 10.1007/s00383-013-3268-x.
16. Varkey M., Ding J., Tredget E. E. Differential collagen-glycosaminoglycan matrix remodeling by superficial and deep dermal fibroblasts: Potential therapeutic targets for hypertrophic scar. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no. 30, pp. 7581–7591. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.070.
17. Tajima S., Pinnell S. R. Collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture: studies of fibroblasts explanted from papillary and reticular dermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 1981, vol. 77, no. 5, pp. 410–412.
18. Richard A. F., Ghosh C. K., Marcia G. T. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007, vol. 127, no. 5, pp. 1018–1029. doi: 10.1038/sj.jid.5700715.
19. Killat J., Reimers K., Choi C. Y., Jahn S., Vogt P. M., Radtke C. Cultivation of keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional bovine collagen-elastin matrix (Matriderm®) and application for full thickness wound coverage *in vivo*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, vol. 14, pp. 14460–14474. doi: 10.3390/ijms140714460.
20. Petrof G., Abdul-Wahab A., McGrath J. A. Cell therapy in dermatology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2014, vol. 4, no. 6, pp. 1–29 a015156. doi: 10.1101/cshperspect.a015156.
21. Minlong Y. L., Xianmo D. Study on biodegradable polymers synthesis and characterization of poly(DL-lactic acid-co L-Lysine) random copolymer. *European Polymer Journal*, 2003, vol. 39, no. 5, pp. 977–983.
22. Ali-Bahar M., Bauer B., Tredget E. E., Ghahary A. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Repair Regen*, 2004, vol. 12, no. 2, pp. 175–182. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.012110.x.
23. Huanjing B., Yan J. Current progress of skin tissue engineering seed cells bioscaffolds and construction strategies. *Burns & Trauma*, 2013, vol. 1, no. 2, pp. 63–72. doi: 10.4103/2321-3868.118928.
24. Smirnov S. V., Kiselev I. V., Vasil'ev A. V., Tersikh V. V. Modern methods of cellular therapy of burnes. *Khirurgiya* [Surgery], 2003, no. 12, pp. 58–62. (in Russian).
25. *Cell technologies for regenerative medicine*, ed.: G. P. Pinaev, M. S. Bogdanova, A. M. Kol'tsova. St. Petersburg, Izdatel'stvo Politehnicheskogo universiteta [Publishing house of the Polytechnic University], 2011. 333 p. (in Russian).
26. Tumanov V. P., Zhakota D. A., Korchagina N. S. 30-year experience of development and application of cell technologies in clinical practice. *Plasticheskaya khirurgiya i kosmetologiya* [Plastic Surgery and Cosmetology], 2012, no. 3, pp. 433–444. (in Russian).

Информация об авторах

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик НАН Беларуси, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovskii@yahoo.com.

Квачева Зинаида Болеславовна – вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kvach zb@tut.by.

Information about the authors

Igor D. Volotovskii – Academician, D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Zinaida B. Kvacheva – Leading researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kvach zb@tut.by.

Для цитирования

Волотовский, И. Д. Морфофункциональные основы создания искусственной кожи (дермальных эквивалентов) / И. Д. Волотовский, З. Б. Квачева // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 3. – С. 96–103.

For citation

Volotovskii I. D., Kvacheva Z. B. Morphology and function basis of the creation artificial skin (dermal equivalents). *Vestsi Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series], 2017, no. 2, pp. 96–103.