

## ••• КЛІТИННА БІОЛОГІЯ ••• CELL BIOLOGY •••

УДК: [57.04 + 616.5]. 616-003. 616-008

### **Сравнение эффективности тормозящего действия объёмной аутотрансплантации фибробластов и композиции фибробластов с кератиноцитами на развитие локального лучевого ожога кожи** Л.Алтухова, Е.Кот, Ю.Кот, Е.Морозова, И.Клочко, А.Плотников, Е.Перский

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*  
altuhovalv@gmail.com

Исследована эффективность торможения развития локального рентгеновского ожога 3-й степени и лучевой язвы кожи у морских свинок объёмной аутотрансплантацией смесью фибробластов с кератиноцитами по сравнению с аутотрансплантацией только фибробластами. Показано, что глубокое введение в зону ожога смеси фибробластов с кератиноцитами через 1 час, а затем каждые 24 часа после облучения, к 35 суткам уменьшает площадь ожога по сравнению с контролем на 63%. Лучевая язва возникает на 10 сутки после облучения и полностью заживает к 25 суткам. При такой же схеме введения одних фибробластов эти показатели лечения составляют 31%, 4 и 35 суток соответственно. Содержание живых клеток, коллагена и гликозаминогликанов в зоне ожога, а также отношение противовоспалительных интерлейкинов к провоспалительным в сыворотке крови выше у животных, которым вводили смесь фибробластов с кератиноцитами, и ближе к контролю.

**Ключевые слова:** *лучевой ожог, лучевая язва, фибробласты, кератиноциты, аутотрансплантация.*

### **Порівняння ефективності гальмуючої дії об'ємної аутотрансплантації фібробластів і композиції фібробластів з кератиноцитами на розвиток локального променевого опіку шкіри** Л.Алтухова, К.Кот, Ю.Кот, К.Морозова, І.Клочко, А.Плотніков, Є.Перський

Досліджено ефективність гальмування розвитку локального рентгенівського опіку третього ступеня і променевої виразки шкіри у морських свинок об'ємною аутотрансплантацією сумішню фібробластів з кератиноцитами в порівнянні з аутотрансплантацією тільки фібробластами. Показано, що глибоке введення в зону опіку суміші фібробластів з кератиноцитами через 1 годину, а потім кожні 24 години після опромінення, до 35 доби зменшує площу опіку у порівнянні з контролем на 63%. Променева виразка виникає на 10 добу після опромінення і повністю заживає до 25 доби. При такій же схемі введення одних фібробластів ці показники лікування складають 31%, 4 і 35 дів відповідно. Вміст живих клітин, колагену і глікозаминогліканів в зоні опіку, а також відношення протизапальних інтерлейкінів до прозапальних в сироватці крові вище у тварин, яким вводили суміш фібробластів з кератиноцитами, і ближче до контролю.

**Ключові слова:** *променеви опік, променева виразка, фібробласти, кератиноцити, аутотрансплантація.*

### **Comparison of the efficiency of inhibitory effect of volumetric autotransplantation of fibroblasts and of keratinocytes with fibroblasts mixture on the local skin radiation burn development** L.Altuhova, K.Kot, Yu.Kot, K.Morozova, I.Klochko, A.Plotnikov, Y.Persky

The efficiency of inhibition of the local 3rd degree X-ray burns and radiation skin ulcers development in guinea pigs by volumetric autotransplantation of fibroblasts with keratinocytes mixture compared with only fibroblasts autotransplantation has been studied. It has been shown that a deep injection of mixture of fibroblasts with keratinocytes into a zone of burn in 1 hour, and then every 24 hours after irradiation to 35 days reduces the area of the burn compared to the control by 63%. Radiation ulcer occurs by 10 days after irradiation and completely healed by 25 days. At the same regimen of injection of fibroblasts alone, these indicators are 31%, 4 and 35 days, respectively. The content of live cells, collagen and glycosaminoglycans in the burn zone and the ratio of the serum anti-inflammatory to pro-inflammatory interleukins is higher in animals injected with the mixture of fibroblasts and keratinocytes and closer to control.

**Key words:** *radiation burn, radiation ulcer, fibroblasts, keratinocytes, autologous transplantation.*

### Введение

В настоящее время одним из наиболее перспективных направлений лечения лучевых ожогов и, особенно, лучевых язв, является клеточная терапия, которая применяется уже не только в эксперименте, но и в клинической практике. Эта терапия началась с использования стволовых клеток, в первую очередь аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Аппликация этих клеток на поражённую область существенно снижает степень воспаления и стимулирует процесс регенерации в зоне язвы (Герасимова, Назаренко, 2005; Tenenhaus, Rennekampff, 2007; Бушманов и др., 2012; Елдашов, 2013).

Имеются, однако, сведения о том, что использование стволовых клеток в терапии связано с риском их трансформации в раковые (Hatzistergos et al., 2011; Herberts et al., 2011).

В то же время доказана абсолютная безопасность аутогенных дермальных фибробластов и кератиноцитов. Стандартные методики использования этих клеток состоят в нанесении их, обычно отдельно, в виде суспензий или клеточных слоёв на ожоговые раны с уже сформированными некротическими язвами (Парамонов и др., 2000; Шаповалов, 2005).

В работах (Кот и др., 2013; Алтухова и др., 2013) было показано, что более эффективным является не аппликация поверхности раны аутологичными фибробластами, а их введение внутрь объёма облучённой области, которая захватывает все слои кожи и подкожных тканей. Регулярное введение клеток, начатое через как возможно более короткий период времени после облучения, тормозит развитие ожога и формирование лучевой язвы.

В настоящей работе проведено сравнение эффективности этого метода при использовании для аутотрансплантации только фибробластов и суспензии, состоящей из смеси фибробластов и кератиноцитов.

In vivo между взаимодействующими фибробластами и кератиноцитами существует система положительных обратных связей, в основе которой лежит продукция и секреция веществ, стимулирующих взаимную пролиферацию этих клеток и регенерацию тканей (Marionnet, Pierrard, 2006; Varani, Perone, 2007).

Поэтому можно ожидать, что введение в облучённую область смеси аутофибробластов и аутокератиноцитов должно привести к более эффективному заживлению ожога, чем введение одних фибробластов.

### Объекты и методы исследования

Эксперименты проведены на морских свинках массой 350–450 г. В экспериментах соблюдали рекомендации проведения медико-биологических исследований (Закон України, 2006).

Лучевые ожоги 3-й степени кожи левого бедра вызывали у животных рентгеновским  $\text{SiK}_{\alpha}$ -излучением с мощностью дозы 4,25 Гр/мин в течение 14,1 мин, облучая выбранный участок кожи площадью 1,5 см<sup>2</sup> на бедре левой задней лапы (Кот и др., 2013; Алтухова и др., 2013). За 32 суток до облучения из правого бедра у животных под эфирным наркозом брали биоптаты кожи. Кожные раны после биопсии полностью заживали на 15 день. Из биоптатов получали первичные культуры фибробластов и кератиноцитов, которые субкультивировали стандартными для этих клеток методами (Rittié, Fisher, 2005) и (Shaw, 1996) соответственно. В эксперименте использовали оба типа клеток 3-го пассажа, которые хранили в жидком азоте (Келлер и др., 2000).

Через 1 час после облучения, а затем каждые 24 часа в первой группе животным, которых лечили, вводили суспензию, содержащую  $(200-210) \times 10^3$  фибробластов в 100 мкл, а во второй – смесь суспензий, содержащих  $(150-160) \times 10^3$  фибробластов и  $(130-140) \times 10^3$  кератиноцитов в 100 мкл стерильного физиологического раствора для инъекций. Делали 6 подкожных инъекций по периметру зоны облучения под углом 45° к её центру на глубину 1 мм. Содержание живых клеток в суспензиях составляло 80–85 %. Облучённых животных третьей, контрольной группы, не лечили. Четвёртую группу составляли необлучённые животные.

В первые сутки, а затем с интервалом в 72 часа в течение 35 суток перед каждым введением аутоклеток у облучённых животных всех трёх групп микрофотографически и с помощью программы ImageJ2x 2.1.4.7 измеряли общую площадь ожога и ожоговой язвы. Используя программное обеспечение Imaris J2x (Bitplane Scientific Software) со встроенным плагином Interactive 3D Surface Plot, строили также трёхмерные модели объёмов ожога и язвы.

На 20-е и 35-е сутки облучённых животных всех групп декапитировали под тиопенталом натрия и готовили гистологические препараты кожи с областью ожога (Протокол 1, 2015). Такие же препараты готовили из аналогичных участков кожи необлучённых животных.

На препаратах микроскопически измеряли количество живых клеток на 1 мм<sup>2</sup> ожоговой раны (Протокол 2, 2015) и площади (в %), занятые в ней общим коллагеном (Протокол 3, 2015), коллагеном I типа (LSBio Anti-COL1A1Antibody, FITC-конъюгированные моноклональные антитела) и гликозаминогликанами (Протокол 4, 2015; Протокол 5, 2015).

Эти же измерения проводили на препаратах кожи необлучённых животных.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием критерия Манна-Уитни. Достоверными считали результаты с  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены фотографии и восстановленные по ним объёмные изображения развития исследованного радиационного ожога с лучевой язвой кожи у нелеченых и леченых животных в двух вариантах аутотрансплантации, а на рис. 2 и 3 – рассчитанные по данным рис. 1 численные значения площади поверхности ожога и лучевой язвы и её объёма.

Как видно, у нелеченых животных общая площадь ожога и объём поражения значительно увеличились к 35 суткам после облучения. На 35 сутки увеличение площади язвы прекратилось, но самостоятельное заживление лучевого ожога не только не происходило, но и не начиналось.

В то же время и площадь ожога, и общий объём поражения при обоих видах аутотрансплантации за всё время наблюдения остаются меньшими, чем без неё, а между 15-ми и 20-ми сутками эти показатели перестают увеличиваться.

На 25-е сутки они уже значительно меньше, чем поражения, которые развивались без торможения аутотрансплантацией. К этому времени площади ожогов при введении только фибробластов и смеси фибробластов с кератиноцитами составляют соответственно 69% и 37% их площади у облучённых нелеченых животных.

Еще сильнее, хотя и с разной эффективностью, тормозят оба вида аутотрансплантации развитие и ускоряют заживление лучевой язвы. Так, при введении только фибробластов она появляется на 4-е, а при введении смеси фибробластов с кератиноцитами – на 10-е сутки. Хотя при обоих видах аутотрансплантации площадь поверхности и объём язвы достигают максимальных размеров на 15-е сутки, язва заживает и полностью исчезает к 35-и суткам при введении в зону облучения аутофибробластов и к 25-и суткам при введении смеси фибробластов с кератиноцитами.

Таким образом, как оригинальные фотографии зоны ожога, так и восстановленные по этим фотографиям объёмные изображения, указывают на существенно большую лечебную эффективность смеси фибробластов с кератиноцитами по сравнению с одними только фибробластами.

Это касается и всех изученных гистологических показателей образования, развития и роста зоны ожога и язвы, которые приведены в табл. 1.

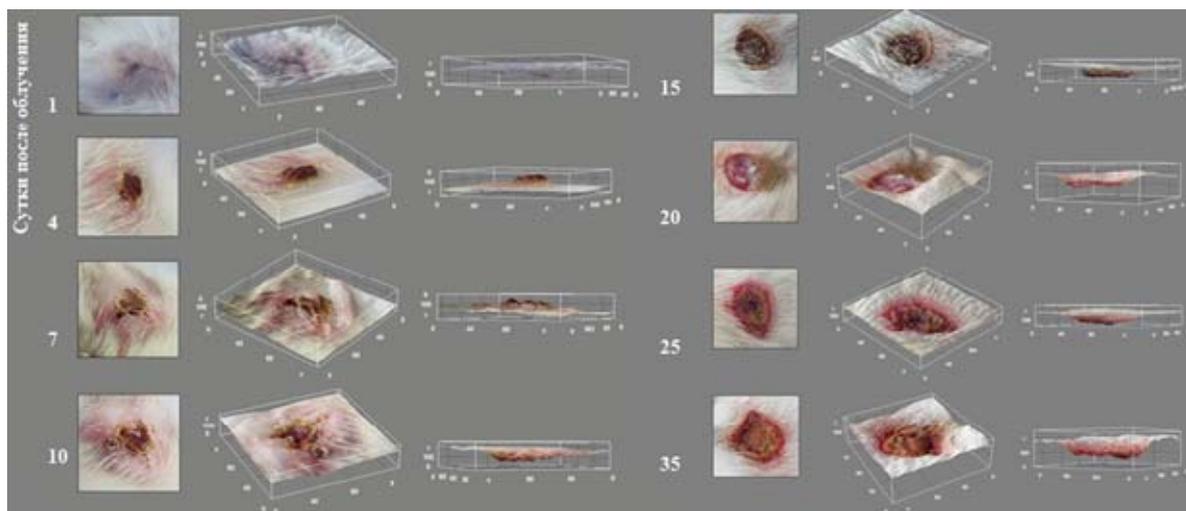
Эти данные свидетельствуют о том, что наиболее существенным результатом аутотрансплантации является резкое повышение содержания живых клеток в зоне лучевого поражения.

При введении фибробластов уже на 20-е сутки после облучения их содержание в ожоге составляет 67%, а на 35-е сутки достигает 95% по сравнению с контролем. В то же время у облучённых нелеченых животных содержание живых клеток в ране составляет, в эти сроки, только 17% и 10% от контроля соответственно.

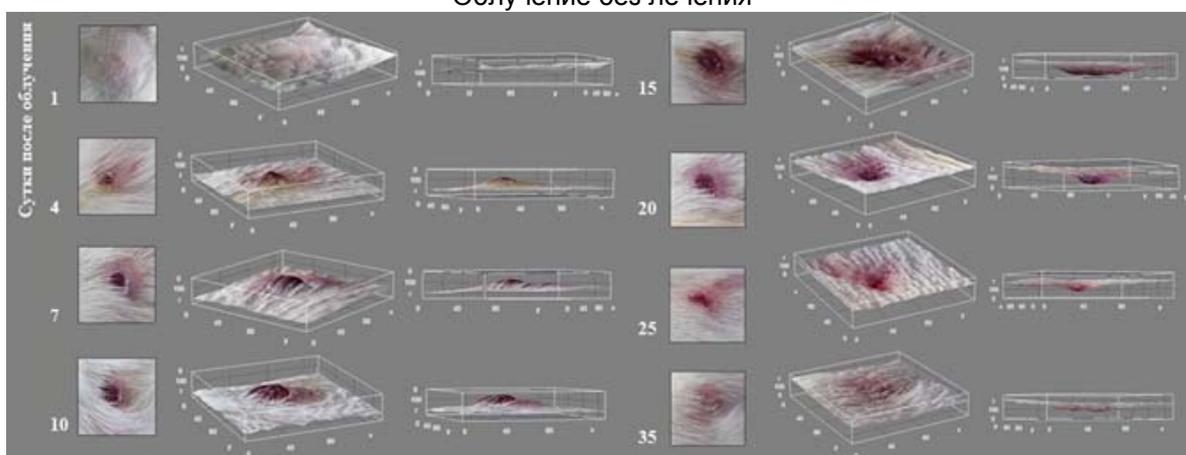
Еще эффективнее действует смесь фибробластов с кератиноцитами. При её введении на 20-е сутки количество живых клеток в ожоге достигает 90%, а на 35-е сутки даже превышает контрольные значения и оказывается равным 117%.

Известно, что в зоне рентгеновского ожога происходит массовая гибель соединительнотканых клеток (Герасимова, Назаренко, 2005; Парамонов и др., 2000; Tenenhaus, Rennekampff, 2007; Клигуненко и др., 2005). Их разрушение приводит к резкому смещению обмена структурных биополимеров соединительнотканного матрикса в сторону деградации.

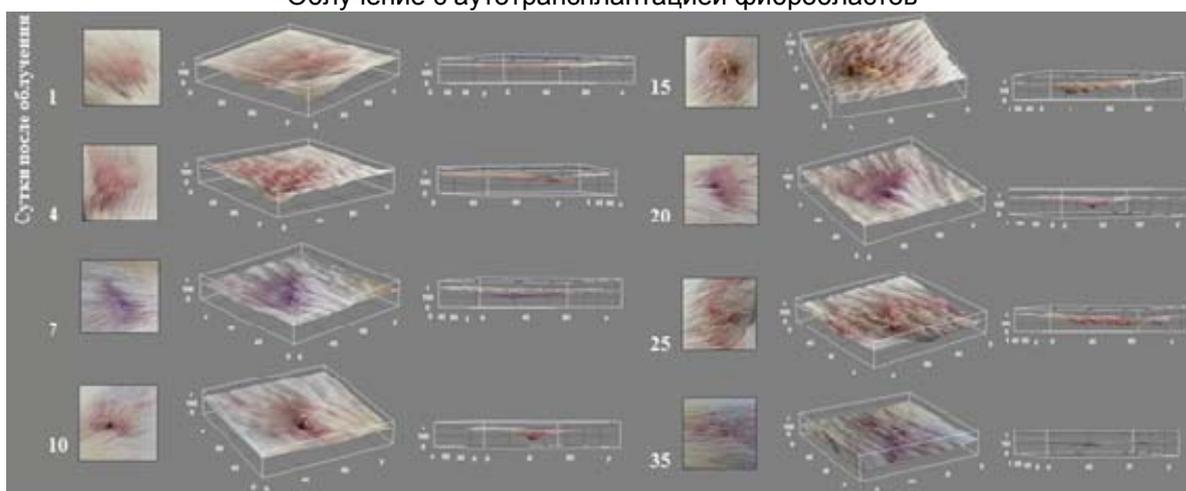
Это происходит как за счёт снижения синтеза биополимеров из-за уменьшения числа живых клеток, так и в результате активации ферментативного расщепления, в частности, кислыми катепсинами, которые выходят в межклеточную среду при разрушении клеток.



Облучение без лечения



Облучение с аутотрансплантацией фибробластов

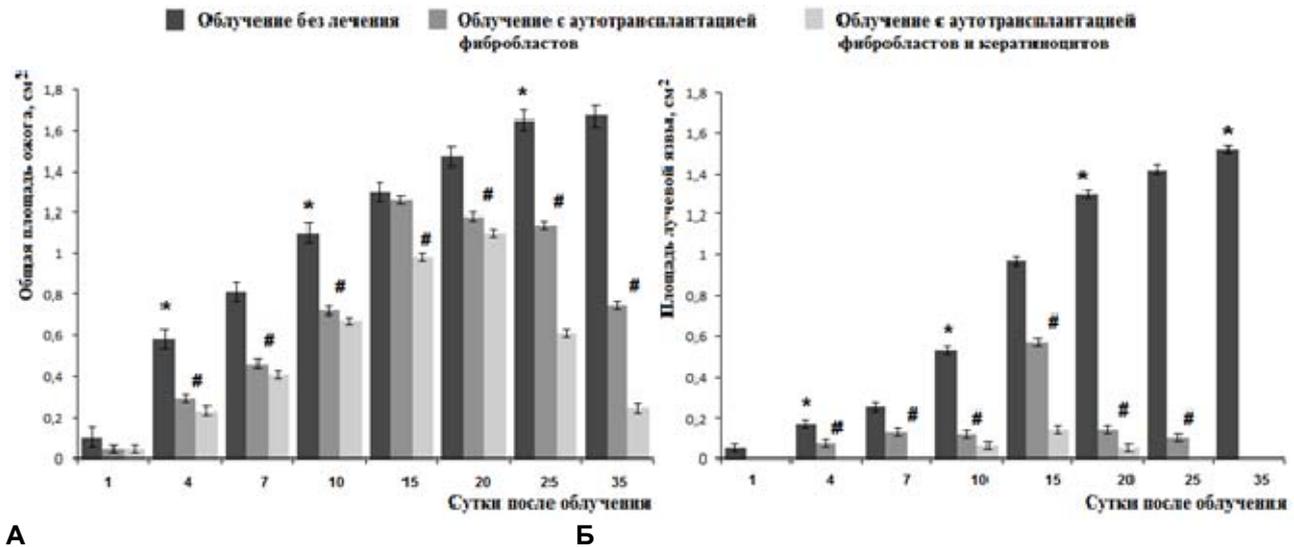


Облучение с аутотрансплантацией фибробластов и кератиноцитов

**Рис. 1.** Динамика развития лучевого ожога и лучевой язвы кожи морских свинок без и при клеточной терапии с использованием только фибробластов и смеси фибробластов с кератиноцитами. На каждые сутки слева – направо: фотография ожога, вид сверху и восстановленное трёхмерное изображение ожога

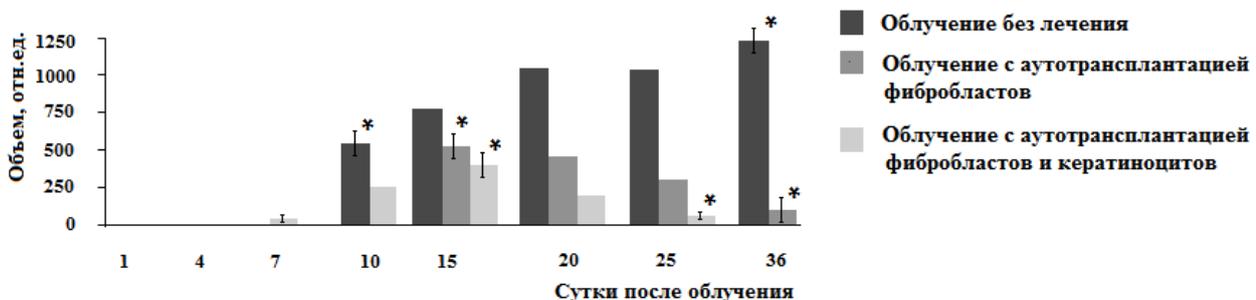
Поэтому постоянное замещение живыми клетками погибающих клеток в зоне поражения сдвигает это смещение обмена в сторону его нормализации.

Так, при введении аутофибробластов, на 20-е и 35-е сутки после облучения общее содержание коллагена в зоне ожога у облучённых леченных животных составляет 81% и 88%, а у нелеченных – 76% и 55% по сравнению с контролем.



**Рис. 2.** Динамика площади лучевого ожога (А) и лучевой язвы (Б) без и при использовании клеточной терапии

Примечание: \* – изменения достоверны ( $p < 0,05$ ) относительно предыдущих суток, # – изменения достоверны ( $p < 0,05$ ) относительно облучения и действия аутоклеток на соответствующие сутки.



**Рис. 3.** Динамика объёма лучевой язвы кожи без и при использовании клеточной терапии  
 Примечание: \* – изменения достоверны ( $p < 0,05$ ) относительно предыдущих суток.

При этом содержание в общем коллагене коллагена типа I, который входит в состав наиболее сформированных, «зрелых» надмолекулярных образований матрикса, также выше у облучённых леченных животных по сравнению с нелечеными.

Введение смеси аутофибробластов с аутокератиноцитами полностью нормализует содержание коллагена в зоне ожога уже на 20-е сутки после облучения, а на 35-е сутки даже превышает его, составляя 110% от контроля.

Оба вида трансплантации нормализуют и содержание гликозаминогликанов в зоне ожога, но в разной степени.

У облучённых нелеченных животных общее содержание гликозаминогликанов в зоне ожога составляет 50% на 20-е и 23% на 35-е сутки после облучения.

У животных, леченых аутофибробластами, содержание гликозаминогликанов в ожоге и на 20-е и на 35-е сутки после облучения выше контроля и составляет 130% и 170% соответственно

Таблица 1.

**Динамика количества живых клеток, содержания коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ) в области локального лучевого ожога кожи морских свинок при лечении введением аутофибробластов и аутофибробластов с аутокератиноцитами**

Условия облучения и лечения животных			Количество клеток в общей площади ожога, $10^4/\text{мм}^2$	Площадь, занятая биополимерами в общей площади ожога, %			
				общий коллаген	коллаген типа I	ГАГ	
Необлучённые			2,52±0,12	33,1±1,8	32,6±1,4	20,4±1,1	
Сутки после облучения	20	Облучённые нелеченные	0,49±0,13 #	25,0±1,5 #	23,1±0,9 #	11,6±0,8 #	
		Аутотрансплантация	Фибробласты	1,73±0,15 #	27,8±1,2 #	31,5±1,1	25,8±1,5 #
			Фибробласты и кератиноциты	2,31±0,10 +	32,4±1,3 +	32,1±1,3	21,1±1,2 +
	35	Облучённые нелеченные	0,34±0,08 #	18,3±1,5 #	16,4±1,5 #	5,1± 0,6 #	
		Аутотрансплантация	Фибробласты	2,39±0,14	29,2±1,3 #	27,0±1,2 #	32,9±2,1 #
			Фибробласты и кератиноциты	3,18±0,11 +	37,8±2,1 +	36,9±2,3 +	17,7±1,4 #+

*Примечания: # – изменения достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с необлучёнными животными; + – изменения достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с лечением фибробластами на соответствующие сутки.*

В то же время аутотрансплантация смесью фибробластов с кератиноцитами на 20-е сутки после облучения полностью нормализует содержание гликозаминогликанов в ожоге, а на 35-е сутки приводит к незначительному, но достоверному его уменьшению.

Известно, что на начальных стадиях развития соединительной ткани в зоне формирования межклеточного матрикса синтез гликозаминогликанов начинается раньше синтеза конструктивных белков. Соответственно, и содержание гликозаминогликанов на этом этапе превышает содержание белков, в том числе и коллагена (Waller, Maibach, 2006). После окончания формирования матрикса отношение содержания гликозаминогликанов к коллагену снижается. Это свидетельствует о существовании отрицательной обратной связи между обменами этих биополимеров, интенсивность которых и определяет характер формирования и степень организации матрикса.

Как видно из данных табл. 1, при трансплантации только аутофибробластами, и на 20-е, и на 35-е сутки после облучения содержание коллагена в зоне ожога значительно ниже, а гликозаминогликанов – значительно выше контроля. Это указывает на то, что, хотя за счёт отрицательной обратной связи обмена этих биополимеров отчасти нормализуются, образующиеся надмолекулярные структуры матрикса остаются на ранних стадиях формирования.

При трансплантации же смесью аутофибробластов с аутокератиноцитами на 20-е сутки после облучения содержание и коллагена, и гликозаминогликанов полностью соответствует норме, а на 35-е сутки лишь незначительно отличается от неё, что свидетельствует о большей «зрелости» образующихся надмолекулярных образований матрикса.

Таким образом, лечебное действие смеси аутофибробластов с аутокератиноцитами явно эффективнее.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что аутотрансплантация приводит к двум взаимодействующим механизмам – это, во-первых, торможение развития лучевого ожога и формирования лучевой язвы и, во-вторых, интенсификация репаративных процессов.

Большая эффективность терапевтических свойств смеси аутофибробластов с аутокератиноцитами объясняется их синергетическим взаимодействием в процессах морфогенеза и

репарации поврежденной кожи. В основе этой синергетики находится система взаимно стимулирующих положительных обратных связей.

Так, фибробласты продуцируют, в частности, фактор роста соединительной ткани, фактор роста кератиноцитов (KGF), эпидермальный фактор роста (EGF), а кератиноциты синтезируют интерлейкин-1 (IL-1), который стимулирует фибробласты к синтезу KGF (Voxman et al., 1993; Werner et al., 2007).

Все это способствует пролиферации и миграции введенных кератиноцитов от глубоких слоев ожоговой раны к её поверхности, и формированию нормального строения кожи в заживающей ране.

### Выводы

1. Ежедневная 4,5-недельная объёмная аутотрансплантация как фибробластов, так и смеси фибробластов с кератиноцитами в область локального рентгеновского ожога кожи 3-й степени у морских свинок, начатая через 1 час после облучения, значительно тормозит деструкцию соединительной ткани, увеличивает количество живых клеток, нормализует биополимерный состав соединительнотканного матрикса в зоне ожога, задерживает и в значительной степени предотвращает образование, развитие и рост радиационного ожога и радиационной язвы.

2. Лечебная эффективность аутотрансплантации смесью фибробластов с кератиноцитами существенно выше по сравнению с аутотрансплантацией одними только фибробластами.

### Список литературы

Алтухова Л.В., Гриценко М.А., Кот Е.В. и др. Нормализация содержания соединительнотканых клеток и структурных биополимеров межклеточного матрикса в зоне локального лучевого ожога кожи объёмной трансплантацией аутофибробластов // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2013. – №1079, вип.18. – С. 5–8. /Altukhova L.V., Gritsenko M.A., Kot Ye.V. i dr. Normalizatsiya soderzhaniya soyedinitel'notkannykh kletok i strukturnykh biopolimerov mezhkletechnogo matriksa v zone lokal'nogo lucheвого ozhoga kozhi obyemnoy transplantatsiyey autofibroblastov // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2013. – №1079, vyp.18. – S. 5–8./

Бушманов А.Ю., Еремін І.І., Мороз Б.Б. и др. Опыт современного лечения лучевых ожогов у лиц, подвергавшихся воздействию ионизирующего излучения // Медицина труда и промышленная экология. – 2012. – №10. – С. 20–27. /Bushmanov A.Yu., Yeremin I.I., Moroz B.B. i dr. Opyt sovremennogo lecheniya luchevykh ozhogov u lits, podvergavshikhsya vozdeystviyu ioniziruyushchego izlucheniya // Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya. – 2012. – №10. – S. 20–27./

Герасимова Л.И., Назаренко Г.И. Термические и радиационные ожоги. – М.: Медицина, 2005. – С.384. /Gerasimova L.I., Nazarenko G.I. Termicheskiye i radiatsionnyye ozhogi. – M.: Meditsina, 2005. – S.384./

Елдашов С.В. Экспериментальное обоснование современных методов хирургического лечения сочетанных лучевых поражений. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – СПб, 2013. – С.19. /Yeldashov S.V. Eksperimental'noye obosnovaniye sovremennykh metodov khirurgicheskogo lecheniya sochetannykh luchevykh porazheniy. Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. – SPb, 2013. – S.19./

Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження». (Електронний ресурс) // Верховна Рада України. – Закон №3447-IV від 21.02.2006. – Київ, 2006. /Zakon Ukrainy «Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokogo povodzhennya». (Elektronnyy resurs) // Verkhovna Rada Ukrainy. – Zakon №3447-IV vid 21.02.2006. – Kiev, 2006. / (<http://www.uapravo.net/data/base12/ukr12108.htm>)

Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомбе Ю. и др. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов // Бюл. Эксп. Биол. Мед. – 2000. – Т.130 (8). – С. 203–206. /Keller G., Sebastian Dzh., Lakombe Yu. i dr. Sohrannost' inyetsiruyemykh autologichnykh chelovecheskikh fibroblastov // Byul. Eksp. Biol. Med. – 2000. T.130 (8). – S. 203–206./

Клигуненко Е.Н., Лещев Д.П., Слесаренко С.В. и др. Интенсивная терапия ожоговой болезни. – М.: «МЕДпресс-информ», 2005. – С.144. /Kligunenکو Ye.N., Leshchev D.P., Slesarenko S.V. i dr. Intensivnaya terapiya ozhogovoy bolezni. – M.: «MEDpress-inform», 2005. – S.144./

Кот Ю.Г., Кот Е.В., Перский Е.Э. и др. Торможение развития локального лучевого ожога объёмной аутотрансплантацией фибробластов // Доповіди Національної академії наук України. Математика, природознавство, технічні науки. – 2013. – №4. – С. 144–147. /Kot Yu.G., Kot Ye.V., Perskiy Ye.E. i dr. Tormozheniye razvitiya lokal'nogo lucheвого ozhoga obyemnoy autotransplantatsiyey fibroblastov // Dopovidi Natsional'noi akademii nauk Ukrainy. Matematika, pryrodoznavstvo, tehniczni nauky. – 2013. – №4. – S. 144–147./

Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Ожоги: Руководство для врачей. – СПб.: Спецлит., 2000. – С.488. /Paramonov B.A., Poremskiy Ya.O., Yablonskiy V.G. Ozhogi: Rukovodstvo dlya vrachey. – SPb.: Spetslit., 2000. – S.488./

Протокол 1. Fixation & Tissue process Protocol. (Электронный ресурс). – Penn Medicine, 2015.

- (<http://www.google.com.ua/url?url=http://www.pennmedicine.org/heart/docs/cvi-docs/refs-protocols/C9%2520Fixation%2520%26%2520Tissue%2520Process.doc&rct=j&q=&esrc=s&sa=U&ved=0CVMQFjAAahUKEwjlm53XtYvIAhUDv3IKHe8TDhM&usq=AFQjCNGj4ZmV4wkbJ23BzJzftwktAiuXhg>)
- Протокол 2.** Протокол обработки соединительной ткани в парафиновых срезах гематоксилином и эозином. (Электронный ресурс). 2015. ([http://www.histomix.ru/product\\_8.html](http://www.histomix.ru/product_8.html)) /Protokol obrabotki soyedinitel'noy tkani v parafinovykh srezakh gematoksilinom i eozinom. (Elektronnyy resurs). 2015./
- Протокол 3.** Протокол обработки соединительной ткани в парафиновых срезах для окрашивания по Ван-Гизону. (Электронный ресурс). 2015. ([http://www.histomix.ru/product\\_5.html](http://www.histomix.ru/product_5.html)) /Protokol obrabotki soyedinitel'noy tkani v parafinovykh srezakh dlya okrashivaniya po Van-Gizonu. (Elektronnyy resurs). 2015./
- Протокол 4.** Протокол обработки соединительной ткани в парафиновых срезах для окрашивания кислых гликозаминогликанов алциановым синим. (Электронный ресурс). 2015. ([http://www.histomix.ru/product\\_4.html](http://www.histomix.ru/product_4.html)) /Protokol obrabotki soyedinitel'noy tkani v parafinovykh srezakh dlya okrashivaniya kislykh glikozaminoglikanov altsianovym sinim. (Elektronnyy resurs). 2015./
- Протокол 5.** Гистохимическая идентификация углеводов. (Электронный ресурс). 2015. ([http://www.histopathology.narod.ru/documents/gistohimija\\_uglevodov.html](http://www.histopathology.narod.ru/documents/gistohimija_uglevodov.html)) /Gistokhimicheskaya identifikatsiya uglevodov. (Elektronnyy resurs). 2015./
- Шаповалов С.Г.** Современные раневые покрытия в комбустиологии. – Фарм Миндекс-практик. – 2005. – №8. – С. 38–46. /Shapovalov S.G. Sovremennyye ranevyye pokrytiya v kombustiologii. – Farm Mindeks-praktik. – 2005. – №8. – S. 38–46./
- Boxman I., Löwik C., Aarden L., Ponc M.** Modulation of IL-6 production and IL-1 activity by keratinocyte-fibroblast interaction // J. Invest. Dermatol. – 1993. – Vol.101 (3). – P. 316–324.
- Hatzistergos K.E., Blum A., Ince T.A. et al.** What is the oncologic risk of stem cell treatment for heart disease? // Circ Res. – 2011. – Vol.108. – P. 1300–1303.
- Herberts C.A., Kwa M.S.G., Hermesen H.P.H.** Risk factors in the development of stem cell therapy // Journal of Translational Medicine. – 2011. – Vol.9. – P. 29–42.
- Marionnet C., Pierrard C.** Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin // Journal of Investigative Dermatology. – 2006. – Vol.126. – P. 971–979.
- Rittié L., Fisher G.J.** Isolation and culture of skin fibroblasts // Methods in Molecular Medicine. – 2005. – Vol.117. – P. 83–98.
- Shaw A.J.** Epithelial cell culture. Reconstruction of human skin epidermis in vitro. The practical approach series. / Ed. D.Richwood, B.D.Hames. – 1996. – P. 179–200.
- Tenenhaus M., Rennekampff H.O.** Burn surgery. Clinics in Plastic // Surgery. – 2007. – Vol.34, Is.4. – P. 697–715.
- Varani J., Perone P.** Human skin in organ culture and human skin cells (keratinocytes and fibroblasts) in monolayer culture for assessment of chemically induced skin damage // Toxicologic Pathology. – 2007. – Vol.35, no.5693–701. – P. 355–372.
- Waller J.M., Maibach H.I.** Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water and lipid content and structure // Skin Research Technology. – 2006. – Vol.12, №3. – P. 145–154.
- Werner S., Krieg T., Smola H.** Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing // J. Invest. Dermatol. – 2007. – Vol.127 (5). – P. 998–1008.

**Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov**

**Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina**

*Подано до редакції / Received: 23.04.2015*