

بررسی امکان تهیه و تولید بانک استاندارد فیبروبلاست انسانی

دکتر حمیده مروج^۱، دکتر مهناز محمودی راد^{۱*}، دکتر نریمان مصفا^۲، منصوره میرزائی^۳، دکتر پرویز طوسی^۴

۱. دانشیار، مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳. کارشناس ارشد علوم تشریح، بیمارستان بوعلی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴. استاد، مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: فیبروبلاست‌ها سلول‌های مزانشیمی هستند که به آسانی در آزمایشگاه کشت داده می‌شوند و نقش مهمی در تقابلات مزانشیم و اپیدرم و ترشح فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها مختلف دارند که اثر مستقیمی بر رشد و تمایز اپیدرم و تشکیل ماتریکس خارج سلولی دارند. تحقیق حاضر با هدف بررسی امکان تهیه و تولید استاندارد فیبروبلاست انسانی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش اکتشافی انجام گرفت. از ناحیهٔ درم پوست ختنه‌گاه نوزاد برای تهیهٔ فیبروبلاست استفاده شد. فیبروبلاست‌ها توسط آنزیم تریپسین جدا گشته و به منظور ایجاد بانک فیبروبلاست چندین بار در محیط DMEM کشت داده شدند. سلول‌ها از نظر آلودگیهای باکتریایی و ویروسی با روشهای مولکولی و از نظر کاهش عرضهٔ آنتی‌ژن‌های MHC تا پاساژ دهم مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین برای یافتن اختلالات ژنومی، کاریوتایپ سلول‌های پاساژهای اول، پنجم، دهم و بیست و دوم تعیین شد.

یافته‌ها: فیبروبلاست‌های به‌کاررفته برای تولید بانک سلول از نظر وجود برخی ویروس‌ها و باکتری‌ها به روشهای مولکولی مورد بررسی قرار گرفته که نتایج همگی منفی بود. بررسی سلول‌های پاساژ داده شده از لحاظ میزان عرضهٔ آنتی‌ژن‌های MHC در سطح آنها نشان داد که میزان این آنتی‌ژن‌ها به مرور در طی پاساژها کم شده است. نتیجهٔ کاریوتایپینگ سلول‌های فیبروبلاست پاساژ اول، پنجم و دهم طبیعی بود ولی کاریوتایپینگ فیبروبلاست‌های پاساژ بیست و دوم نشان‌دهندهٔ ناهنجاریهای زیادی در کروموزوم‌های این سلول‌ها بود. جداسازی کروموزوم‌ها از محل سانترومر در تعداد قابل توجهی از کروموزوم‌ها مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بهترین زمان برای ایجاد یک بانک فیبروبلاست از نظر حداکثر میزان فعالیت فیبروبلاست‌ها، کمترین میزان آنتی‌ژنیستی و نیز عدم وجود اختلالات ژنتیکی، سلول‌های پاساژ پنجم تا دهم است. برای ممانعت از بروز اختلالات ژنتیکی در فرایند کشت مجدد فیبروبلاست‌ها باید تمهیداتی از جمله انتخاب بهترین کلون‌ها از نظر عاری بودن از ناهنجاریهای کروموزومی در کاریوتایپینگ و نیز به حداقل رساندن زمان جداسازی سلول‌ها در روش آنزیماتیک مد نظر قرار گیرند.

واژگان کلیدی: فیبروبلاست، بانک سلولی، کاریوتایپینگ، ایمونوفلورسانسینگ.

مقدمه

فیبروبلاست یک سلول مهم است که در همه مراحل ترمیم زخم دخالت دارد. بخش زیادی از فیبروبلاست‌های زخم میوفیبروبلاست‌ها هستند که در بسته شدن زخم ظاهر می‌شوند. التیام زخم، حاصل مجموعه وقایع بیولوژیکی است که منجر به احیا و پیوستگی بافت می‌شود. فازهای مختلف این فرآیند عبارتند از: التهاب، تکثیر، تجدید ساختار. در طی

فاز التهاب، هموستاز و ارتشاح سلولهای التهابی حاد رخ می‌دهد (۱).

در این میان فیبروبلاست‌ها نقش محوری در فرآیندهای رسوب ماده بین‌سلولی و تجدید ساختار بافت ترمیمی دارند. فیبروبلاست هم در نقش سلول سازنده ظاهر می‌شود که ماتریکس غنی از کلاژن را تولید می‌کند و هم به عنوان سلول پیام‌دهنده (signaling cell) عمل می‌نماید و فاکتورهای رشد را ترشح می‌کند که برای ارتباط بین دو سلول در طی فرآیند التیام مهم است. بروز وقفه در فرآیند التیام زخم یک

*نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر مهناز محمودی راد؛ تهران، بیمارستان شهدای تجریش، مرکز تحقیقات پوست، صندوق پستی ۱۹۸۹۹۳۴۱۴۸.
پست الکترونیک: mahnazrad@gmail.com

مشکل مهم بالینی است که هزینه‌های زیادی را بر جامعه تحمیل می‌کند (۲،۳).

لایه پاپیلار که واجد فیبروبلاست‌های اصلی پوست است فاکتوری مهم که برای آغاز فرایند تکثیر اپیدرم مورد نیاز است، تولید می‌نماید. سلول اصلی درم فیبروبلاست است که گلیکوپروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، فیبرهای الاستیک و رتیکولر، گلیکوز آمینوگلیکان‌ها و انواع کلاژن را تولید می‌کند. این سلول‌ها پروتئین‌های کلیدی اتصال اپیدرم به لایه بازال هستند که در مهاجرت و تکثیر سلول‌های اپیدرمی نقش دارند. فیبرونکتین، مشتق کلیدی سلول فیبروبلاست، معرف التیام است (۴). کلاژن فراوانترین پروتئین موجود در بافت‌های حیوانی است که نقش مهمی در هموستاز بافت همبند به عهده دارد. فیبروبلاست‌ها سلول‌های اصلی تولیدکننده کلاژن هستند و مسئول بازسازی (remodeling) آن می‌باشند (۵).

با توجه به نکات فوق و وجود انواع زخم‌های مزمن دیابتیک، سوختگی، زخم بستر، زخم‌های مزمن بعد از عمل جراحی و به منظور مطالعات بیوتکنولوژی و تولید فرآورده‌های انسانی، بررسی‌های ویروس‌شناسی (به عنوان وکتورهای انسانی) و همچنین اختلالات ژنتیکی و با توجه به اهمیت نقش سلول فیبروبلاست در فرآیند التیام زخم و آزمایشات سیتوژنتیک نیاز به داشتن یک بانک سلولی استاندارد برای نگهداری سلول فیبروبلاست کشت داده شده، ضروری است چراکه تجربیات دیگر کشورها تهیه و تولید بانک استاندارد فیبروبلاست انسانی را مورد تایید قرار داده است (۶-۸). لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی امکان تهیه و تولید بانک استاندارد فیبروبلاست انسانی در مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

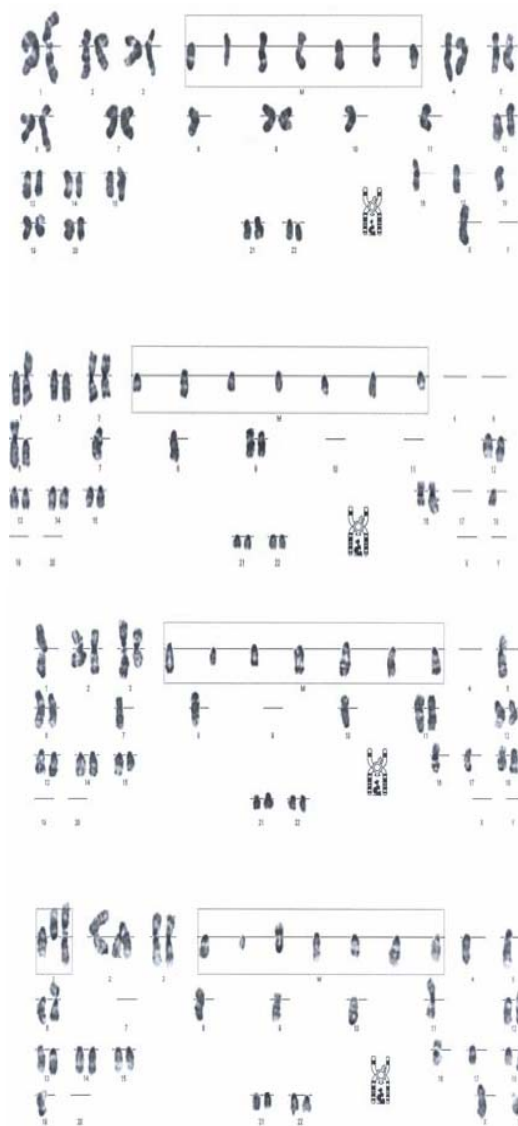
تحقیق به روش اکتشافی انجام گرفت. در این تحقیق از پوست ختنه‌گاه نوزاد در اطاق عمل تحت شرایط کاملاً استریل نمونه برداشته در محیط DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین، استرپتومایسین و فونیزون به میزان ده برابر غلظت در مقایسه با محیط کشت سلول) قرار داده شد، سپس به اطاق کشت منتقل گردید. تمام مراحل جداسازی بافت از پوست مورد نظر زیر هود لامینار و با استفاده از مواد، معرف‌ها و وسایل استریل انجام شد. کشت و ایجاد بانک فیبروبلاست انسانی در مرکز تحقیقات پوست دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پس از کسب رضایت والدین نوزاد، انجام شد.

کشت فیبروبلاست: برای جدا کردن سلول‌ها، نمونه پوست از محلول DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک خارج و با محلول PBS شستشو داده شد. با تریپسینه کردن، اپیدرم طی چند مرحله از درم جدا گردید و سپس درم به قطعات کوچکتر از ۱ میلی‌متر تقسیم و با روش explantation در فلاسک‌های کشت ۵۰ میلی‌لیتر کشت داده شد. آنگاه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ دی‌اکسیدکربن قرار داده شد. سپس محیط کشت کامل شامل: محیط کشت DMEM با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (fetal bovine serum)، L-glutamine، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر و فونیزون ۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر، به فلاسک اضافه گردید. پس از آن سلول‌های کشت داده شده هر سه روز یکبار تغذیه شدند. در زمانی که به هم پیوستگی کلنی‌ها صورت گرفت، با تریپسینه کردن (trypsinization) کوتاه مدت، فیبروبلاست‌ها از سایر سلول‌ها جدا شد و پس از تهیه سوسپانسیون و سانتریفوژ، فیبروبلاست‌های جمع و در یک فلاسک جدید کشت داده شد. کشت مجدد این سلول‌ها با این روش تا پاساژ بیست‌ودوم به مدت ۵ ماه ادامه پیدا کرد و پاساژهای پنجم تا دهم در ۸۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند. در واقع نمونه‌های آماده شده در کرایوپال قرار داده شدند و پس از نصب برچسب مشخصات در ۸۰- درجه سانتیگراد برای مصارف بعدی ذخیره گردیدند. در نهایت برای حفظ طولانی مدت، سلول‌ها از فریزر خارج شدند و بعد از بررسی آنها از نظر زمان دو برابر شدن و نیز میزان سلول‌های زنده (حداقل تعداد 10^4 سلول در هر میلی‌لیتر)، در بهترین شرایط به تانک ازت منتقل شدند.

ایمونوفلورسانسینگ برای ارزیابی وضعیت عرضه مولکول‌های MHC: در تهیه این بانک فیبروبلاست با توجه به کاربرد آن در آلوگرافت‌های پوستی، از بین رفتن آنتی‌ژن‌های سطحی تا پاساژ دهم توسط immunocytochemistry با monoclonal anti HLA class I FITC و monoclonal anti HLA DR-FITC و monoclonal anti HLA DQ-FITC (Sigma, Cat No: F5662, F1777, F1902) بررسی گردید. از non-specific mouse immunoglobulin M (negative control, Sigma Cat No. 5284) به عنوان کنترل منفی استفاده شد و ماکروفاژهای کشت شده انسانی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

در ابتدا سلول‌ها روی slide chamber ۴حفره‌ای (Nunc lab-tek, Cat No. C6932) ریخته شد و پس از تشکیل یک لایه سلولی، سلول‌ها توسط ترکیب استن و اتانول سرد به نسبت دو

بیست و دوم کاربوتایپینگ نشان‌دهنده ناهنجاریهای متعددی در کروموزوم‌های این سلول‌ها بود. شکستهای سانترومریک متعددی در گسترشهای متافازی دیده شد و تشخیص کروموزوم‌های مختلف به علت بازآرایی پیچیده و حذف برخی از نواحی ممکن نبود. کلنی‌های متعددی در اثر کشتهای مجدد تشکیل شده بودند. این تغییرات منحصر به کروموزوم خاصی نبوده و از نظر تعداد و ساختمان در کروموزوم‌های مختلف ناهنجاریهایی مشاهده شد که نشان می‌دهد اکثر سلول‌ها نه تنها از نظر تعداد در حد دیپلوئید یا سلول سالم نمی‌باشند بلکه جذاشدگی کروموزوم‌ها از محل سانترومر در تعداد قابل توجهی از کروموزوم‌ها مشاهده می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱- ناهنجاری‌های کروموزومی در چهار گسترش متافازی تهیه شده از فیبروبلاست‌های پاساژ ۲۲

به سه به مدت ۸ دقیقه فیکس گردیدند. بعد از شستشو، مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر آنتی‌بادی به بافر رقیق کننده شامل سدیم آزاید، bovine serum albumin و PBS اضافه و به حفره‌ها افزوده می‌شد و پس از شستشو بلافاصله نمونه‌ها با میکروسکوپ ایمونوفلورسانس (Nikon) بررسی می‌گردید (۶). بررسی آلودگی‌های میکروبی: به منظور بررسی وجود هر گونه آلودگی که مختص محیط‌های کشت سلول است، فیبروبلاست‌های پاساژهای پنجم تا دهم از نظر HBV، HSV I، HSV II، CMV، EBV، Treponema pallidum، Mycoplasma spp. و Chlamydia با آنالیز DNA و از نظر HCV و HIV با آنالیز RNA بررسی گردیدند.

برای PCR نمونه‌ها از نظر HBV و HCV به ترتیب از کیت‌های AMPLICOR HBV & HCV MONITOR® (Roche Diagnostics, USA) Test, v2.0 استفاده شد. ارزیابی بقیه میکروارگانیسم‌ها توسط DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Cat. No.: 69504, Crawley, United Kingdom) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR صورت گرفت (۷-۱۴).

کاربوتایپینگ فیبروبلاست‌ها: در این تحقیق سلول‌های پاساژهای اول، پنجم، دهم و بیست و دوم از نظر کاربوتایپ بررسی شدند تا از وضعیت کروموزومی نمونه‌ها اطلاعاتی حاصل شود. سلول‌های فیبروبلاست تکثیر شده در آزمایشگاه پس از تیمار با کلشی‌سین و متوقف کردن تقسیم سلولی در مرحله متافاز محصول برداری شده و برای تهیه گستره متافازی مراحل فیکساسیون و تهیه لام انجام شد (۱۵، ۱۶).

یافته‌ها

ایمونوفلورسانس: بررسی سلول‌های پاساژ داده شده از لحاظ میزان بروز آنتی‌ژن‌های MHC در سطح آنها نشان داد میزان این آنتی‌ژن‌ها به مرور در طی پاساژها کم شده است و در پاساژ دهم خیلی ضعیف گردیده است. همچنین میزان عرضه آنتی‌ژن HLA کلاس I در فیبروبلاست‌های پاساژ ۱ نسبت به ماکروفاژها (کنترل مثبت) حدود ۸۰٪، در فیبروبلاست‌های پاساژ ۵ حدود ۴۰٪ و در فیبروبلاست‌های پاساژ ۱۰ حدود ۱۰٪ می‌باشد.

آلودگی میکروبی سلول‌ها: آنالیز DNA و RNA برای تشخیص آلودگی سلول‌ها همگی منفی بودند.

کاربوتایپینگ: از فیبروبلاست پاساژهای اول، پنجم و دهم تعداد ۲۰ گسترش متافازی با تکنیک GTG مورد مطالعه قرار گرفت و ۴۶ کروموزوم بدون هیچگونه اختلال کروموزومی مشاهده گردید. ولی در مورد فیبروبلاست‌های پاساژ

بحث

در سالیان گذشته، از فیبروبلاست‌های پاساژهای پنجم تا دهم به منظور پیوند و تسريع ساخته شدن اپیدرم در بیماران سوختگی استفاده شده است. این روش به دلیل کاهش عرضه آنتی‌ژن‌های سطحی فیبروبلاست‌ها در پاساژهای متعدد صورت می‌گیرد تا پیوند سلول‌های غیرخودی امکان‌پذیر باشد (۱۷-۱۹). در مطالعه حاضر که با همین روش صورت گرفت در سلول‌های پاساژهای اول تا دهم هیچگونه اختلال کروموزومی مشاهده نشد. این پاساژها تا بیست‌ودو پاساژ ادامه یافت تا از نظر زمان پیدایش اختلالات کروموزومی مورد بررسی قرار گیرند. در فیبروبلاست‌های پاساژ بیست‌ودوم اختلالات کروموزومی متعددی یافت شد.

هرگونه پریشانی کروموزومی و تغییرات وراثتی را می‌توان با شمارش کروموزومی و تجزیه و تحلیل کاریوتایپی ملاحظه کرد. اصولاً تغییرات وراثتی در تیره‌های یاخته‌ای کم‌وبیش وجود دارند. این ناپایداری‌ها ناشی از ساختمان بی‌نظم کروموزوم‌ها است. حتی در کشتهای کوتاه مدت، گرچه ممکن است از نظر وراثتی پایدار باشند، ناهمگنی مجموعه یاخته با توجه به میزان رشد یاخته از یک پاساژ به پاساژ بعدی می‌تواند تغییراتی به همراه داشته باشد (۱۵).

ناهنجاریهای کروموزومی و شکستهای سانترومریک متعددی که در گسترشهای متافازی در فیبروبلاست‌های پاساژ بیست‌ودوم در این بررسی دیده شد، تشخیص کروموزوم‌های مختلف را به علت بازآرایی پیچیده و حذف برخی از نواحی غیرممکن ساخته بود. همچنین کلنی‌های متعددی در اثر کشتهای مجدد تشکیل شد. این گونه تغییرات وسیع کروموزومی از ویژگیهای سلول‌های سرطانی است که به دلیل سرعت تکثیر، تقسیمات سلولی متوازی را پشت سر نمی‌گذارند. لذا باید تمهیداتی در نظر گرفته شود تا این سلول‌ها نیز قابل استفاده برای ایجاد بانک سلولی با مقاصد یاد شده باشند چراکه هر چه تعداد پاساژها بیشتر باشد، میزان حذف آنتی‌ژن‌های سطحی بیشتر خواهد شد.

هانسون و همکارانش شرایط کشت در محیط آزمایشگاه و نیز روشهای کشت را در ایجاد اختلالات کروموزومی مؤثر می‌دانند. آنها نشان دادند در پاساژ سلول‌ها به روش مکانیکی، سلول‌ها پس از ۳۵ ماه کشت دچار تغییرات کروموزومی نشدند (۱۶).

ناهنجاریهای کروموزومی بیشتر در پاساژهایی دیده می‌شود که در آنها از آنزیم یا مواد شیمیایی استفاده می‌شود. علاوه بر آن در این موارد انتخاب سلول‌ها امکان‌پذیر نیست در حالی که در پاساژهای مکانیکی این امکان وجود دارد. وقتی کلونی‌ها به روش مکانیکی به قسمتهای کوچکتر تقسیم می‌شوند، کلون کردن بر اساس شکل سلول‌ها صورت می‌گیرد و کلنی‌هایی که تغییر شکل یافته‌اند، پاساژ داده نمی‌شوند.

در مواردی که از آنزیم استفاده می‌شود، احتمال تغییراتی در سلول‌ها به واسطه حساسیت آنها به آنزیم‌ها وجود دارد. عوامل دیگری نظیر استفاده از بسترهایی با منشا حیوانی و سرم ممکن است با افزایش تغییرات ژنتیکی همراه گردد. در بررسی کای‌ساندر و همکارانش از روش مکانیکی برای پاساژ سلول‌ها تا ۱۳۴ پاساژ استفاده و نشان داده شد کاریوتایپ این سلول‌ها تغییری پیدا نکرده است. در این مطالعه توصیه شده است از کاریوتایپینگ و یا CGH برای آنالیز ابتدایی سلول‌ها، بعد از ذوب و انجمادها و نیز در زمان کشتهای طولانی مدت در شرایط آزمایشگاه، استفاده شود (۱۵).

نتیجه‌گیری

بهترین زمان برای ایجاد یک بانک فیبروبلاست از نظر حداکثر میزان فعالیت فیبروبلاست‌ها، کمترین میزان آنتی‌ژنیسیته و نیز عدم وجود اختلالات ژنتیکی، سلول‌های پاساژ پنجم تا دهم است. برای ممانعت از بروز اختلالات ژنتیکی در فرایند کشت مجدد فیبروبلاست‌ها باید تمهیداتی از جمله انتخاب بهترین کلون‌ها از نظر عاری بودن از ناهنجاریهای کروموزومی در کاریوتایپینگ و نیز به حداقل رساندن زمان جداسازی سلول‌ها در روش آنزیماتیک مد نظر قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از همکاری آقای دکتر حسین کیوانی، رئیس آزمایشگاه ویروس‌شناسی کیوان، آقای دکتر کریمی‌نژاد رئیس آزمایشگاه ژنتیک کریمی‌نژاد، سرکار خانم یاسمن میردامادی و سرکار خانم نیکی محمودی‌راد کارشناسان آزمایشگاه مرکز تحقیقات پوست کمال تشکر را دارند.

REFERENCES

1. Lorenz HP, Longaker MT, editors. Wounds: biology, pathology, and management; Basic science and clinical evidence. New York Inc, 2001;p:221-36.
2. Takehara K. Growth regulation of skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2000; 24 suppl 1:S70-S77.
3. Mansbridge JN, Liu K, Piney RE, Patch R, Ratcliffe A, Naughton GK. Growth factors secreted by fibroblasts: role in healing diabetic foot ulcers. *Diabetes Obes Metab* 1999;1:265-79.
4. Çinar S, Artificial Skin, Biomaterials Research Group, Middle East Technical University-Biotechnology Research Unit. 2006. Available from: http://www.biomed.metu.edu.tr/courses/term_papers/artificial%20skin_cinar.htm.
5. Christine A, Shearwood C, Walker M, Bowler P, Detek C. The application of a fibroblast gel contraction model to assess the cytotoxicity of topical antimicrobial agents. *Wounds* 2003;15(8):265-27.
6. Branchet MC, Boisnic S, Bletry O. Expression of HLA class II antigens on skin fibroblasts in scleroderma. *Br J Dermatol* 1992;126(5):431-5.
7. Benjamin DK, Miller WC, Fiscus SA. Rational testing of the HIV-exposed infant. *Pediatrics* 2001;108(1):e3.
8. Kimura M, Kuzushima K, Nishikawa K, Nishiyama Y, Morishima T. Detection and direct typing of herpes simplex virus by polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1990;179:177-84.
9. Landers RJ, O'Leary JJ, Crowley M. Epstein-Barr virus in normal, pre-malignant, and malignant lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 1993;46:931-5.
10. Chang MS, Kim WH, Kim CW, Kim YI. Epstein-Barr virus in gastric carcinomas with lymphoid stroma. *Histopathology* 2000;37:309-15.
11. Bitsch A, Kirchner H, Dupke R, Bein G. Cytomegalovirus transcripts in peripheral blood leukocytes of actively infected transplant patients by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1993;167:740-43.
12. Siqueira JF, Rôças IN, Favieri A, Santos KRN. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2002;15(5):335-37.
13. Rawadi G, Dussurget O. Advantages in PCR-based detection of mycoplasmas contaminating cell cultures. *PCR Methods Appl* 1995;4:199-208.
14. Bauwens JE, Clark AM, Loeffelholz MJ, Herman SA, Stamm WE. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* urethritis in men by polymerase chain reaction assay of first-catch urine. *J Clin Microbiol* 1993;31:3013-16.
15. Caisander G, Park H, Frej K, Lindqvist J, Bergh C. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture. *Chromosome Res* 2006;14:131-37.
16. Hanson C, Caisander G. Human embryonic stem cells and chromosome stability. *APMIS* 2005;113(11-12):751-5.
17. Sarkisov DS, Alekseev AA, Tumanov VP, Glushchenko EV, Morozov SS, Paltsyn AA. Cultured human skin cells in the treatment of burns. *Khirurgiia (Mosk)* 1993;(3):22-7.
18. Glushchenko EV, Alekseev AA, Tumanov VP, Serov GG. The treatment of thermal skin burns by using cultured fibroblasts. *Arkh Patol* 1994;56(5):29-34.
19. Tumanov VP, Alekseev AA, Budkevich LI. 10 years' experience of using cultured human skin cells for the treatment of thermal burns. *Arkh Patol* 1999;61(4):5-9.