



Skin substitutes – the application of tissue engineering in burn treatment

Part 1.

Substytuty skóry – wykorzystanie inżynierii tkankowej w leczeniu oparzeń

Część 1.

© J ORTHOP TRAUMA SURG REL RES 3 (11) 2008

Review article/Artykuł poglądowy

AGNIESZKA KLAMA-BARYŁA¹, JUSTYNA GLIK¹, MAREK KAWECKI¹, MARIUSZ NOWAK¹,
ALEKSANDER L. SIEROŃ²

¹ Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich,
Dyrektor: lek. med. Mariusz Nowak.

² Katedra i Zakład Biologii Ogólnej, Molekularnej i Genetyki
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach,
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Aleksander L. Sieroń.

Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Justyna Glik

Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich

ul. Jana Pawła II 2, 41-100 Siemianowice Śląskie, Poland

tel. + 48 32 229 20 00, fax +48 32 228 82 20; e-mail: clo@clo.com.pl

Statistic/Statystyka

Word count/Liczba słów 2237/1840

Tables/Tabele 0

Figures/Ryciny 2

References/Piśmiennictwo 34

Received: 02.05.2008

Accepted: 28.05.2008

Published: 10.07.2008

Summary

Skin is the largest organ of the human body which connects the environment with the body in a multifunctional manner. In the event of vast and severe burns that require more of autologous skin that could be provided to exchange burnt wound with a surgical wound, the tissue must be replaced with a substitute. Autografts involve intervention into the patient's body (collecting his own skin from healthy sites) resulting in new open wounds. In extensive burns there are either no or limited donor sites available from which skin could be collected. The only alternative in the therapy of subjects suffering from extensive burns is to replace patient's burnt skin with – substitutes.

Keywords: skin substitutes, tissue engineering

Streszczenie

Skóra jest największym narządem ciała ludzkiego, stanowiącym wielofunkcyjne połączenie między organizmem a środowiskiem. W przypadku, gdy dochodzi do rozległych i głębokich oparzeń i nie wystarczy autologicznej skóry do zamiany rany oparzeniowej na ranę chirurgiczną, tkankę tę należy zastąpić substytutem. Przeszczepy autologiczne wymagają ingerencji w organizm chorego (pobranie jego własnej skóry z miejsc zdrowych), co prowadzi, do powstania nowych ran otwartych. W sytuacji bardzo rozległych oparzeń, dostępność miejsc dawczych, z których można pobrać skórę jest ograniczona bądź niemożliwa. Jedyną alternatywą w przypadku tak rozległych oparzeń jest zastąpienie skóry własnej chorego – substytutami.

Słowa kluczowe: substytuty skóry, inżynieria tkankowa

Skin substitutes are differentiated into those of biological origin and those developed by means of tissue engineering. Substitutes of biological origin comprise allografts and/or xenografts. Skin allografts may be obtained from living donors (optimally – from a relative) or from a corpse. Allogeneic skin obtained from a corpse may only be employed as a temporary wound dressing if the burn extends to the entire thickness of the skin. Likewise xenografts of animal origin may only serve as temporary wound dressings. For the purposes of xenotransplantation porcine skin, obtained from swine, is usually employed. The advantage of such a dressing type is that the cross-species bacterial and viral infection transmission is minimal by virtue of the significant phylogenetic divergence as opposed to primate skin xenotransplantations. The contraindications against xenograft application feature unknown effects of the transfer on the recipient's organism linked to the possibility of zoonotic pathogens transfer such as *Toxoplasma gondii*, *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* [1,2]. For the time being the choice of skin substitutes of biological origin has been restrained to allografts subjected to the final radiological sterilization under the law *On the collection and transplantation of cells, tissues and organs*. However, the scarcity of human allograft donors and lesser quality of radiologically sterilized biological allogeneic dressings, there is a need to produce skin substitutes by methods of tissue engineering.

Skin substitutes, both artificial skin and epidermal components, created by means of tissue engineering are designed specifically for the replacement of extant skin defects after transplantation onto the wound surface [3]. They should provide a barrier against microorganisms, protect from the loss of systemic liquids and, additionally, they should manifest good flexibility and appropriate durability. They must also show histocompatibility with the transplantation site as well as low immunogenicity and slight or null toxicity [4, 5].

In general, skin substitutes obtained through tissue engineering may be divided into the following subgroups:

1. Autologous cultured epidermal substitutes (CES - autologous cultured skin substitute) that comprise keratinocyte layers (Epitel);
2. Allogeneic cultured dermal substitute (CDS - allogeneic cultured dermal substitute) that contain fibroblast scaffoldings (Dermagraft and Trans Cyte);
3. Allogeneic cultured skin substitute (CSS - allogeneic cultured skin substitute) composed of keratinocytes and fibroblasts (Apligraf).

Allogeneic substitutes CDS and CSS require the presence of intracellular substance that serves as the scaffolding for fibroblasts and/or keratinocytes [6]. The intracellular matrix provides scaffolding for cells, stabilizes the structure of tissues composing skin as well as its components participate in the processes of cell proliferation, differentiation and migration. The intracellular matrix is also applied for the elaboration of novel skin substitutes in the so-called "intelligent" matrix. It is most

Wyróżniamy substytuty skóry pochodzenia biologicznego oraz otrzymane na drodze inżynierii tkankowej. Do substytutów pochodzenia biologicznego należą alloprzeszczypty lub/i ksenoprzeszczypty skóry. Alloprzeszczypty skóry można pozyskać od dawcy żywego (najlepiej dawca rodzinny) lub ze zwłok. Allogeniczna skóra od zmarłego jest wykorzystywana jedynie jako opatrunek tymczasowy w przypadku oparzeń pełnej grubości skóry. Podobnie opatrunkiem tymczasowym jest przeszczep ksenogeniczny przygotowany ze skóry zwierzęcej. Do ksenotransplantacji najczęściej wykorzystuje się skórę pobraną ze świni domowej. Zaletą wykorzystania tego typu opatrunku jest to, iż poprzez dużą różnicę filogenetyczną, międzygatunkowe przeniesienie infekcji bakteryjnych i wirusowych stanowi mniejsze zagrożenie niż wykorzystanie do ksenotransplantacji skóry ssaków naczelnych. Wadą stosowania ksenoprzeszczyptów są nieznanne następstwa w organizmie biorcy wynikające z możliwości przeniesienia patogenów zoonotycznych jak np. *Toxoplasma gondii*, *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* [1,2]. Obecnie stosowanie substytutów pochodzenia biologicznego zostało ograniczone w kontekście ustawy *O pobieraniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów* jedynie do przeszczepów allogenicznych poddanych końcowej sterylizacji radiacyjnej. Jednak ze względu na brak dawców ludzkich przeszczepów allogenicznych oraz mniejszą wartość biologiczną opatrunków allogenicznych sterylizowanych radiacyjnie, istnieje potrzeba tworzenia substytutów skóry metodami inżynierii tkankowej.

Substytuty skóry tworzone na drodze inżynierii tkankowej, mają do spełnienia ściśle określone zadania, dotyczy to zarówno sztucznej skóry jak również komponentów naskórkowych, które po wszczepieniu w ranę mają zastąpić istniejące ubytki skóry [3]. Powinny one stanowić barierę dla mikroorganizmów, zabezpieczać przed utratą płynów ustrojowych, a dodatkowo powinny posiadać dobrą elastyczność i odpowiednią trwałość. Muszą być również histo-kompatybilne z miejscem wszczepienia w ranę, powinny cechować się niską immunogennością i znikomą lub zerową toksycznością [4, 5].

Ogólnie substytuty skóry uzyskiwane na drodze inżynierii tkankowej można podzielić na:

1. Autologiczne substytuty kultur naskórka (CES - autologous cultured epidermal substitute), składające się z warstw keratynocytów (Epitel);
2. Allogeniczne substytuty kultur skóry właściwej (CDS - allogeneic cultured dermal substitute), składające się z rusztowania fibroblastów (Dermagraft i Trans Cyte);
3. Allogeniczne substytuty kultur skóry (CSS - allogeneic cultured skin substitute), składające się z keratynocytów i fibroblastów (Apligraf).

Allogeniczne substytuty CDS i CSS, wymagają obecności substancji międzykomórkowej, stanowiącej rusztowanie dla fibroblastów i/lub keratynocytów [6]. Macierz międzykomórkowa, tworzy rusztowanie dla komórek, stabilizuje strukturę tkanek budujących skórę, jak również jej składowe uczestniczą w procesach proliferacji, różnicowania i migracji komórek. Macierz międzykomór-

frequent to employ natural biomaterials such as collagen or fibronectin for the sake of such matrix generation.

NATURAL BIOMATERIALS EMPLOYED FOR THE PURPOSES OF TISSUE ENGINEERING

1. Collagen

The term „collagen” refers to a protein group (collagen proteins) common in the human and animal organism. Collagen is one of the most abundant proteins of natural origin responsible for the generation of structural integrity. Collagen as it appears in the skin is mainly synthesized by fibroblasts and myofibroblasts. In tissues such as skin, tendons and bones, collagen occurs in the form of collagen fibers [7]. Among collagen proteins there are to be distinguished fiber producing collagens (types I, II, III, V, XI), meshwork producing collagens (mainly components of basal membranes- types IV, VIII, X) and collagens with interrupted superhelix structure that co-exist with collagen fibers (i.e. FACIT – fibril-associated collagen with interrupted triple helices, types IX, XII, XIV, XVI, XIX), collagen producing “beaded” fibers (type VI), collagen producing „anchor” fibers (type VII), collagens with permembranous domain (type XIII and XVII) as well as unclassified collagens types XV and XVIII [8]. Type I of collagen is present in the skin and is the most prominent element composing cicatrix tissue [7].

Collagen serves to produce the substitutes of artificial skin. The tissue engineering depicted uses disaggregation of autologous keratinocytes and highly porous non-cellular matrix made of collagen and glycosaminoglycans [9] which have been used in the porcine model so as to reconstruct epidermis and epithelium *in vitro*. By means of an animal model an allogeneic skin substitute of CDS proper has been investigated, built from cancellous collagen and containing fibroblasts. After the inquiry into the efficacy of the said substitute in animals in initial clinical trials, a method of a more sophisticated CDS substitute has been developed, containing cultured fibroblasts and two-layered cancellous hyaluronic acid (HA) matrix and collagen (Col). HA possesses a vast capacity for hydration ensuring moisture at the wound site. The molecules of the said acid play an essential role in some cellular functions such as cell proliferation or migration as well as affect the adhesive properties of cells. Collagen functions as a chemotactic factor for fibroblasts both *in vitro* and *in vivo*. Whereas fibroblasts that build up such a substitute of CDS may secrete cytokines to extracellular matrix (ECM) which is central to wound healing. A substitute made of fibroblasts and intracellular matrix has been developed in order to contribute to the healing process of the wound, through a synergic effect of the impact of both components [10].

kową wykorzystuje się również w opracowywaniu nowych substytutów skóry, w postaci tzw. „inteligentnej” macierzy. Bardzo często wykorzystuje się do tworzenia takiej macierzy, naturalne biomateriały takie jak: kolagen czy fibronektyna.

NATURALNE BIOMATERIAŁY WYKORZYSTYWANE W INŻYNIERII TKANKOWEJ

1. Kolagen

Termin „kolagen” określa grupę białek (białka kolagenowe) występujących powszechnie w organizmie człowieka i zwierząt. Kolagen jest jednym z najbardziej obficie naturalnie występujących białek, odpowiedzialnych za tworzenie strukturalnej integralności. Kolagen występujący w skórze jest głównie syntetyzowany przez fibroblasty i myofibroblasty. W takich tkankach jak skóra, ścięgna, kości, kolagen jest ułożony w postaci włókien kolagenowych [7]. Wśród białek kolagenowych wyróżniamy kolageny tworzące włókna (typy I, II, III, V, XI), kolageny tworzące układy sieciowe (głównie składniki błon podstawnych - typy IV, VIII, X) oraz kolageny z przerywaną strukturą superhelisy, współwystępujące z włóknami kolagenowymi (tzw. FACIT – fibril-associated collagen with interrupted triple helices, typy IX, XII, XIV, XVI, XIX), kolagen tworzący włókna „koralikowe” (typ VI), kolagen tworzący włókna „kotwiczące” (typ VII), kolageny o domenie przezbłonowej (typ XIII i XVII) oraz niesklasyfikowane kolageny typu XV i XVIII [8]. Typ I kolagenu jest obecny w skórze i jest główną składową tkanki blizny [7].

Kolagen jest wykorzystywany w tworzeniu substytutów sztucznej skóry. Opisano, technikę inżynierii tkankowej wykorzystującej dezagregację autologicznych keratynocytów i wysoce porowatej bezkomórkowej macierzy zbudowanej z kolagenu i glikozoaminoglikanów [9], którą zastosowano na modelu świńskim do rekonstrukcji skóry i naskórka *in vitro*. Wykorzystując również model zwierzęcy zbadano allogeniczne substytuty skóry właściwej CDS, zbudowane z gąbczastego kolagenu i zawierające fibroblasty. Po zbadaniu skuteczności tego substytutu u zwierząt i wstępnych próbach klinicznych, wypracowano metodę otrzymania bardziej rozbudowanego substytutu CDS, składającego się z wyhodowanych fibroblastów na dwu-warstwowej gąbczastej matrycy kwasu hialurowego (HA - hyaluronic acid) i kolagenu (Col - collagen). HA posiada dużą pojemność uwodnienia, dzięki czemu zapewnia wilgotne środowisko w miejscu rany. Molekuły tego kwasu odgrywają decydującą rolę w niektórych funkcjach komórkowych, takich jak proliferacja czy migracja komórek, jak również wpływają na ich adhezję. Kolagen spełnia rolę czynnika chemotaktycznego dla fibroblastów zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Natomiast fibroblasty wchodzące w skład takiego substytutu CDS, mogą wydzielać cytokiny do pozakomórkowej macierzy (ECM - extracellular matrix), co jest elementem niezbędnym w gojeniu ran. Substytut zbudowany z fibroblastów jak i macierzy międzykomórkowej został

2. Fibronectin

Fibronectin (FN - fibronectin) is an adhesive glycoprotein found commonly in the human body. Present on the cell surface, within inter- and extracellular matrices of various types of connective tissue and in biological fluids, it is a relatively conservative protein with a mosaic composition [11]. The dissolvent form of fibronectin (dimeric) is observed in the plasma and produced mainly by hepatocytes. The non-dissolvent form (oligo- or polymeric) is common in the extracellular matrix and on the cell surface and is generated by a broad spectrum of various cells such as chondrocytes, macrophages, fibroblasts, endothelial cells as well as squamous cells [12]. In order to develop fully functional skin substitutes it is of crucial importance to take into consideration the effect of mechanical forces and the interactions emerging in the course of the wound healing process. Of special concern is the complexity of interrelations between skin fibroblasts and integrins that constitute a group of proteins that contribute to cell development and migration as well as the generation of blood vessels and extracellular substance.

Integrins affect many cell properties. Apart from their bidirectional impulse transmission, they are also responsible for the cell shape regulation.

All integrins are composed of two different subunits - α and β . Since the integrin subunits α and β encode several genes each, the tissues contain over 20 combinations of different integrin receptors, capable of various ligands recognition independently or in complexes with other polypeptides. In the skin most of fibroblast interactions occurs through $\beta 1$ type integrin while integrins type $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ have receptors localized directly within the fibronectin matrix. These and other integrins interact with the actins of the cytoskeleton and other significant factors composing the intracellular substance [7]. A substantial problem in the application of the currently available skin substitutes are the difficulties in their vascularity. The mechanical tensions affect fibronectin function, according to received knowledge. It has been demonstrated that excessive tensions generated by cells in contact with biomaterials bear the responsibility for the angiogenesis of the fibronectin fibers and this is the reason behind no vascularity is developed in case of biomaterials application [13]. Fibrin coupled with fibronectin boosts the growth of keratinocytes and fibroblasts, both *in vivo* and *in vitro* which may ameliorate the migration of cells within the wound [14]. Thus standard transplantations require that fibrin glue be employed as the carrier of the keratinocyte and fibroblast culture [14]. Fibrin glue is a haemostatic factor of tissue origin and contains serum proteins that undergo spontaneous degradation. It commonly contains fibrinogen, an ingredient that stabilizes fibrinogen, thrombin – responsible for the conversion of fibrinogen into fibrin in the presence of calcium chloride and aprotinin, inhibitor fibrinolysis inhibitor [15]. Since the said glue undergoes biodegradation, it may be widely used in tissue engineering as

opracowany, by wspomagać leczenie rany, poprzez synergiczny efekt działania obu tych komponentów [10].

2. Fibronektyna

Fibronektyna (FN - fibronectin) jest glikoproteiną adhezyjną powszechnie występującą w ludzkim organizmie. Znajdująca się na powierzchni komórek, w macierzy wewnątrz i zewnątrzkomórkowej różnych typów tkanki łącznej oraz w płynach biologicznych, jest białkiem względnie konserwatywnym o budowie mozaikowej [11]. Forma rozpuszczalna fibronektyny (dimerycznej), obecna jest w osoczu i produkowana głównie przez hepatocyty. Forma nierozpuszczalna (oligo lub polimerycznej), powszechna w macierzy zewnątrzkomórkowej i na powierzchni komórek, wytwarzana jest przez szerokie spektrum różnych komórek między innymi: chondrocyty, makrofagi, fibroblasty, komórki śródbłonna i niektóre komórki nabłonkowe [12]. Przy opracowywaniu w pełni funkcjonalnych substytutów skóry, należy zwrócić uwagę na działanie sił mechanicznych i interakcje powstające podczas procesu gojenia się rany. To stanowi złożoność wzajemnych oddziaływań pomiędzy fibroblastami skóry a integrzynami stanowiącymi rodzinę białek, które uczestniczą w rozwoju komórek i ich migracji, oraz w tworzeniu naczyń krwionośnych i substancji międzykomórkowej. Integryny wpływają na wiele właściwości komórek. Poza dwukierunkowym przekazywaniem sygnału pobudzenia kontrolują także kształt komórek. Wszystkie integryny są zbudowane z dwóch różnych podjednostek - α i β . Ponieważ podjednostki α i β integrzyn koduje kilka genów, w tkankach występuje ponad 20 kombinacji polipetydów tworzących różne receptory integrzynowe, zdolne do rozpoznawania różnych ligandów samodzielnie, lub w kompleksach z innymi białkami. W skórze większość oddziaływań fibroblastów następuje za pośrednictwem $\beta 1$ typ integrzyn. Natomiast integryny typu $\alpha 5 \beta 1$ i $\alpha v \beta 3$ mają głównie receptory zlokalizowane bezpośrednio w macierzy fibronektyny. Te i inne integryny oddziałują z aktynami cytoszkieletu i innymi istotnymi czynnikami wchodzącymi w skład substancji międzykomórkowej [7]. Zasadniczym problemem w zastosowaniu aktualnie dostępnych substytutów skóry są trudności w ich unaczynieniu. Mechaniczne napięcia, jak wiadomo wpływają na funkcję fibronektyny. Wykazano, że nadmierne napięcia generowane przez komórki w kontakcie z biomateriałami odpowiadają za zahamowanie angiogenezy włókienek fibronektyny, dlatego nie dochodzi do unaczynienia w przypadku wykorzystania biomateriałów [13]. Fibryna w połączeniu z fibronektyną, wspomaga wzrost keratynocytów i fibroblastów zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, co może wpłynąć na polepszenie migracji komórek w obrębie rany [14]. Dlatego podczas standardowych przeszczepów skóry stosuje się klej fibrynowy jako nośnik hodowli keratynocytów i fibroblastów [14]. Klej fibrynowy jest hemostatycznym czynnikiem pochodzenia tkankowego, zawierającym białka surowicy ulegające samoistnej degradacji. Najczęściej zawiera on fibrynogen, czynnik stabilizujący fibrynogen,

a so-called fibrin adhesive dressing (*bandage, dressing*) which is resorptive and impregnates healing wounds safeguarding them against leaks and simultaneously regulates the processes associated with bleeding/clotting when applied directly to a bleeding site. The features described above account for the possibility to put fibrin glue to use in the wound healing process [16,17,18,19, 20, 21].

3. Biopolymers of the novel generation

The protein components of the extracellular matrix (ECM) such as collagen, fibrin, lamin, elastin or their mixture are commonly used in combination with cultured cells in order to form fully functional skin substitutes. This application is made possible thanks to the affinity between the said skin substitutes and the natural ECM as well as the possibility of the emergence of signal connections [22]. The structure of such a matrix may be modified through its permanent content change, gel formation or through the addition of molecules that cause fiber aggregation that impedes cross connections from forming [23]. The application of the synthetic derivatives for the purpose of gel degradation is predominantly employed to provide cells that are cultured *in vitro* or molecules *in situ* designed for the formation of the so-called “clever” matrices. There are reports of the creation of gels with photopolymer properties with macromeric substrates - polyethylene oxide. A novel class of synthetic analogues of ECM has been elaborated which analogues limit cell migration by virtue of their homogenous microstructure and thus causes their proteolytic transformation [7]. The said molecules that constitute synthetic hydrogels were developed on the basis of the features evinced by numerous micromers of polyethylene glycol (PEG) which interact in a reaction of Michael type with peptide sequences containing cystein. This leads to the formation of hybrid meshworks generated from their hydrated precursors in the presence of living cells. Such

trombinę – odpowiedzialną za konwersję fibrynogenu w fibrynę w obecności chlorku wapnia i aprotyninę, inhibitor fibrynolizy [15]. Ponieważ klej ten ulega biodegradacji, może być powszechnie stosowany w inżynierii tkankowej jako tzw. fibrynowy adhezyjny bandaż (*bandage, dressing*), który jest resorbowalny, impregnuje gojące się rany, uszczelnia je i jednocześnie kontroluje procesy związane z krwawieniem/krzepnięciem przy bezpośredniej aplikacji na krwawiące miejsce. Opisane powyżej cechy kleju fibrynowego wskazują na możliwość jego zastosowania w procesie gojenia się ran [16,17,18, 19, 20, 21].

3. Biopolimery nowej generacji

Białkowe komponenty substancji pozakomórkowej (ECM - extracellular matrix), takie jak: kolagen, fibryna, lamina, elastyna, czy ich mieszanina, powszechnie są wykorzystywane w połączeniu z hodowlami komórkowymi, w celu stworzenia w pełni funkcjonalnych substytutów skóry. Wykorzystanie to jest wynikiem podobieństwa tych substytutów skóry do naturalnego ECM i możliwości wystąpienia w nich połączeń sygnałowych [22]. Budowa takiej macierzy może zostać zmodyfikowana poprzez zmianę jej stałej zawartości, wytworzenie żelu lub przez dodanie molekuł, które wywołują agregację włókien uniemożliwiając tworzenie krzyżowych połączeń [23]. Wykorzystanie syntetycznych pochodnych do degradacji żelów znajduje głównie zastosowanie w dostarczeniu komórek wyhodowanych *in vitro*, bądź molekuł *in situ* do tworzenia tzw. “sprytnych” macierzy. Opisano tworzenie się fotopolimeryzujących żeli z makromerycznych substratów - tlenku polietylenowego. Opracowano również nową klasę syntetycznych analogów ECM, które z powodu ich homogenych mikrostruktur, ograniczają migrację komórek, co spowoduje ich proteolityczną przebudowę [7]. Te molekuły będące syntetycznymi hydrożelami opracowano w oparciu o właściwości wielu makromerów glikolu polietylenowego (PEG – polyethy-

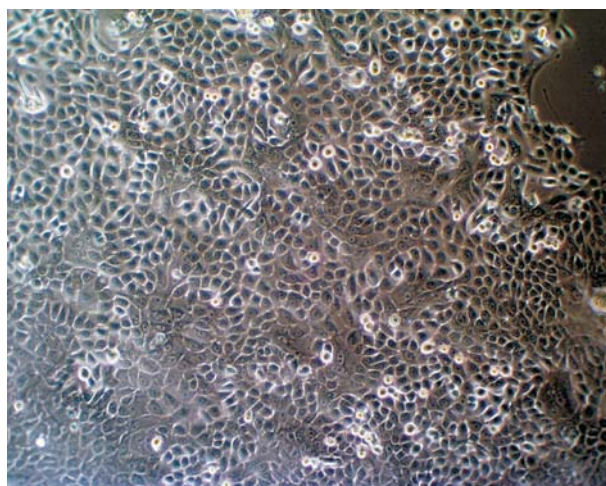


Fig. 1. Human keratinocytes cultured *in vitro*

Rys. 1. Ludzkie keratynocyty hodowane w warunkach *in vitro*

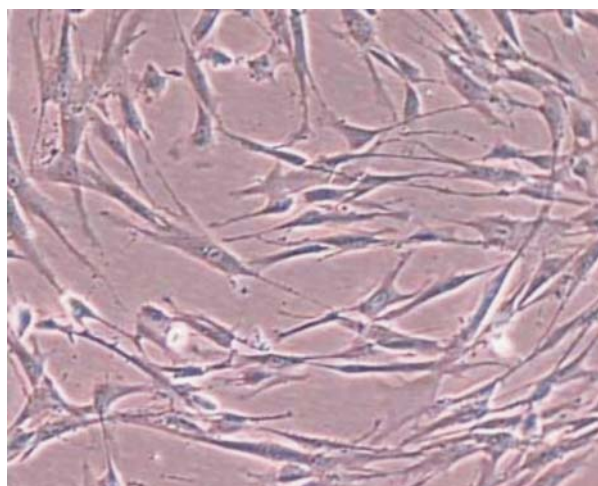


Fig. 2. Human fibroblasts cultured *in vitro*

Rys. 2. Ludzkie fibroblasty hodowane w warunkach *in vitro*

an approach specifically calls for the introduction of bioactive ligands into those structures [24, 25]. Polyethylene glycol behaves as an inert structural platform by virtue of its hydrophilic properties and its resistance to protein adsorption [22]. It imitates two ECM functions that are significant in biological terms: cell adhesion and degradation caused by proteases. The meshwork of macromer polyethylene glycol chains gained additional flexibility by means of the connection of peptides with oligopeptides sensitive to proteases by the unbound ends of Arg-Gly-Arg (RGD) sequence [22].

CELL CULTURES EMPLOYED FOR THE PURPOSE OF SKIN SUBSTITUTE GROWTH

Deep and extensive damage to the skin across its entire thickness fails to undergo spontaneous process of recovery. In order to grow a fully functional skin substitute a complete cycle of consecutive ontogenesis stages would have to be reconstructed which is impossible *in vitro* [26]. The phenotype of cultured human skin cells corresponds precisely with the cells found in wounds that undergo physiological healing by way of cytogenesis, morphogenesis and histogenesis but not organogenesis. In the literature available there is data that testifies to the possibility of the application of individual skin components obtained through culture and then transplanted. Although they lack the features of fully functional substitutes that replace the skin, they assist the healing process after transplantation [27,28]. Research has been carried out in which melanocytes have been used to fill the cicatrices formed after burns and in cases of leukoderma [29]. In order to obtain skin substitute melanocytes were added to various kinds of polymers which served as a scaffolding [30, 31]. The challenge encountered by current research consists in the formation of skin substitutes built from cells contained within a biodegradable matrix. It has been established upon the basis of the proliferation of autologous keratinocytes and the employment of a porous collagen-glycoamino matrix devoid of cells (as shown by the study of dermis and epidermis *in vivo* performed on a porcine model), that basal membrane regeneration is accompanied by the connection between epidermal and dermal cells effected through the emerging vascular system [2].

A large number of keratinocytes and fibroblasts are needed in order to restore normal skin function (Fig.1) (Fig.2) and these may be provided by means of a culture lasting from two to three weeks. Human keratinocytes may be cultured upon skin substitutes *in vitro* and positioned so as to ensure exposure to air which may result in the formation of layered epidermis [33]. Such conditions bear resemblance to *in vivo* growth conditions and prove propitious for the keratinization and migration of cells by virtue of providing exposure to air.

lene glycol), które oddziałują w reakcji typu Michael z zawierającymi cysteinę sekwencjami peptydowymi. To doprowadza do tworzenia się hybrydowych sieci, z ich uwodnionych prekursorów w obecności żywych komórek. Takie podejście jest szczególnie odpowiednie dla włączenia w te struktury biologicznie aktywnych ligandów [24, 25]. Glikol polietylenowy zachowuje się jak bezwładna strukturalna platforma z powodu jego hydrofilności i odporności na adsorpcję białek [22]. Naśladuje dwie istotne biologiczne funkcje ECM, a mianowicie: komórkową adhezję i degradację przez proteazy. Połączono również poprzez wolne końce sekwencję Arg-Gly-Arg (RGD) peptydy z wrażliwymi na proteazy oligopeptydami, nadając dodatkowo elastyczność sieci łańcuchów makromerów glikolu polietylenowego [22].

HODOWLE KOMÓRKOWE WYKORZYSTYWANE W OTRZYMANIU SUBSTYTUTÓW SKÓRY

Głębokie i rozległe uszkodzenia pełnej grubości skóry nie podlegają samoistnej regeneracji. Aby utworzyć w pełni funkcjonalny substytut skóry, musiałyby występować kompletne fazy ontogenezy, co jest nie możliwe w warunkach *in vitro* [26]. Fenotyp ludzkich komórek skóry otrzymanych w hodowlach, dokładnie odpowiada komórkom z rany ulegającej fizjologicznemu gojeniu się, w których następuje cytogeneza, morfogeneza i histogeneza, ale nie organogeneza. W dostępnym piśmiennictwie opublikowane są badania świadczące o możliwości wykorzystania indywidualnych komponentów skóry otrzymanych w hodowlach a następnie przeszczepianych. Choć nie są one w pełni funkcjonalnymi substytutami zastępującymi skórę, wspomagają proces gojenia po przeszczepie [27,28]. Przeprowadzano badania, w których wykorzystano melanocyty do wypełniania blizn powstałych po oparzeniu i w leczeniu bielactwa [29]. W celu stworzenia substytutu skóry dodawano melanocyty do różnych rodzajów polimerów stanowiących dla nich rusztowanie [30, 31]. Wyzwaniem dla obecnie prowadzonych badań jest stworzenie substytutów skóry składających się z hodowanych komórek znajdujących się w biodegradowalnej matrycy. Namnożenie autologicznych keratynocytów i wykorzystanie porowatej, pozbawionej komórek kalogenowo-glikozoaminowej macierzy (badania na modelu świńskim dla regeneracji skóry właściwej i naskórka *in vivo*), wykazało, że podczas regeneracji błony podstawnej dochodzi do uformowania się połączenia komórek naskórka i skóry właściwej poprzez wytworzony system naczyń [32].

Dla przywrócenia prawidłowej struktury skóry potrzeba bardzo dużo keratynocytów (Rys.1) i fibroblastów (Rys.2), których dostateczna ilość może być pozyskana drogą hodowli w okresie dwóch do trzech tygodni. Ludzkie keratynocyty mogą być hodowane na substytutach skóry *in vitro* i usytuowane w taki sposób, aby znajdowały się w kontakcie z powietrzem, co w efekcie może doprowadzić do tworzenia się uwarstwionego naskórka [33]. W takich warunkach dochodzi do rogow-

By contrast, fibroblasts are cultured on skin substitutes formed from slowly degrading biopolymers that are increasingly deeper embedded within their own ECM (extracellular matrix, extracellular substance). The increase in the number of these cells is accompanied by the rise of the levels of dissolvent factors released into the microenvironment. Keratinocytes and fibroblasts produce a broad spectrum of various cytokines, growth factors, inflammatory reaction mediators as well as catabolic enzymes [34]. The properties concerned enable the cells to launch interaction that results in the production of cell proliferation factors: insulin-like growth factor, platelet-like growth factor (PDGF - platelet-derived growth factor), TGF- α and β transforming growth factors and basic fibroblast growth factor (bFGF). The presence of the said factors is indispensable for the tissue regeneration and ensures normal course of wound healing [7].

No skin substitute has been developed heretofore that would meet all the requirements put forth in the case of patients with severe burns. However, the study on the application of tissue elements obtained by means of *in vitro* cultures and the employment of tissue engineering techniques provides ground for the prospective formation of a multilayered autologous skin substitute. Such a breakthrough would imply major headway and furnish means to save more patients with severe burns.

cenia komórek i ich migracji do powierzchni stykającej się z powietrzem, co odpowiada warunkom wzrostu *in vivo*. Natomiast fibroblasty hodowane są głównie na skórnym substytutach utworzonych z powoli degradujących się biopolimerów, zasiedlając coraz głębiej własne ECM (extracellular matrix, substancja pozakomórkowa). Zwiększeniu liczby tych komórek, towarzyszy również wzrost rozpuszczalnych czynników uwalnianych do mikrośrodowiska. Keratynocyty i fibroblasty produkują szeroki panel różnorodnych cytokin, czynników wzrostu, mediatorów reakcji zapalnej, jak również enzymów katabolicznych [34]. Właściwości te pozwalają komórkom na zainicjowanie interakcji prowadzących do produkcji czynników proliferacji komórek: insulino-podobnego czynnika wzrostu, płytkowo-podobnego czynnika wzrostu (PDGF - platelet-derived growth factor), TGF- α i β (transforming growth factor) transformującego czynnika wzrostu i podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF- basic fibroblast growth factor). Obecność wszystkich tych czynników jest niezbędna do wzrostu komórek i regeneracji tkanki, co wpływa na prawidłowy proces gojenia się rany [7].

Jak dotąd nie udało się stworzyć substytutu skóry, który spełniał by wszystkie wymagania w przypadku leczenia chorych ciężko oparzanych. Badania nad zastosowaniem elementów tkankowych uzyskanych w hodowlach *in vitro* oraz wykorzystanie inżynierii tkankowej dają nadzieję na stworzenie wielowarstwowego, autologicznego substytutu skóry. Stanowiłoby to znaczny postęp prowadzący do możliwości uratowania większej liczby chorych ciężko oparzonych.

References/Piśmiennictwo:

1. Onions D., Cooper DKC., Alexander TJL i wsp. An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2000;7:143-155.
2. Fishman JA., Patience C. Xenotransplantation: infectious risk revisited. *Am. J. Transplant.* 2004; 4: 1383-1390.
3. Boyce, S. T. 2001 Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes. *Burns* 27, 523-533.
4. Harlan, D. M., Karp, C. L., Matzinger, P., Munn, D. H., Ransohoff, R. M. & Metzger, D. W. 2002 Immunological concerns with bioengineering approaches. *Ann. NY Acad. Sci.* 961, 323-330.
5. Ahsan, T. & Nerem, R. M. 2005 Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. *Orthod. Craniofac. Res.* 8, 134-140.
6. Yoshimitsu Kuroyanagi, Kentaro Kubo, Hiromich Matsui, Hyun Jung Kim, Shinichiro Numari, Yho Mabuchi, Shizuko Kagawa 2004 Establishment of Banking System for Allogeneic Cultured Dermal Substitute. *Artif Organs*, Vol. 28, No. 1, 13-21
7. Anthony D. Metcalfe and Mark W. J. Ferguson. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J. R. Soc. Interface* (2007) 4, 413-437.
8. Vuorio E., de Crombrughe B.: The family of collagen genes. *Ann. Rev. Biochem.* 1990, 59: 837-872.
9. Butler, C. E. & Orgill, D. P. 2005 Simultaneous in vivo regeneration of neodermis, epidermis, and basement membrane. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 94, 23-41.
10. Kuroyanagi Y, Kubo K, Matsui H, Kagawa S, Mori S, Kim H-J, Mabuchi Y. Manufacturing and banking system for allogeneic cultured dermal substitute. *Jpn J Burn Injuries* 2003;29:28-38.
11. Wójtowicz M. Fibronectin and Its Fragments in Health and Disease. *Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 6, 1139-1147.
12. Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, Armulik A, Lohikangas L: Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci* 1997, 2, 126-146.
13. Vogel, V. & Baneyx, G. 2003 The tissue engineering puzzle: a molecular perspective. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 5, 441-463.
14. Currie, L. J., Sharpe, J. R. & Martin, R. 2001 The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast. Reconstr. Surg.* 108, 1713-1726.
15. Wójtowicz A. Możliwości wykorzystania autologicznego fibrynowego kleju tkankowego do sterowanej regeneracji tkanek w chirurgii i implantologii stomatologicznej. *Implantoprotetyka* 2006 Tom VII nr 4, 43-46.
16. Meijer H.J. i wsp. Radiographic evaluation of mandibular augmentation with prefabricated hydroxylapatite/fibrin glue implant. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 1997, 55, 138.
17. Morikawa T.: Tissue sealing. *Am. J. Surg.*, 2001, 182, 29S.
18. Saltz R. i wsp. Experimental and clinical applications of fibrin glue. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1991, 88, 1005.
19. Tayapongsak P. i wsp. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 1994, 52, 161.
20. Tholpady S.S. i wsp. Repair of an osseous facial critical-size defect using augmented fibrin sealants. *Laryngoscope*, 1999, 109, 1585.
21. Joch C. i wsp. Clinical safety of fibrin sealants. Poster presentation at IX World Congress of Cardiothoracic Surgeons, Lisbon, Portugal, November 14-17, 1999.
22. Raebber, G. P., Lutolf, M. P. & Hubbell, J. A. 2005 Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration. *Biophys. J.* 89, 1374-1388.
23. Kuntz, R. M. & Saltzman, W. M. 1997 Neutrophil motility in extracellular matrix gels: mesh size and adhesion affect speed of migration. *Biophys. J.* 72, 1472-1480.
24. Seliktar, D., Zisch, A. H., Lutof, M. P., Wrana, J. L. & Hubbell, J. A. 2004 MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing. *J. Biomed. Mater. Res. A* 68, 704-716.
25. Van de Wetering, P., Metters, A. T., Schoenmakers, R. G. & Hubbell, J. A. 2005 Poly(ethylene glycol) hydrogels formed by conjugate addition with controllable swelling, degradation, and release of pharmaceutically active proteins. *J. Control. Release* 102, 619-627.
26. Boyce, S. T. & Warden, G. D. 2002 Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. *Am. J. Surg.* 183, 445-456.
27. Hansbrough, J. F., Dore, C. & Hansbrough, W. B. 1992. Clinical trials of a living dermal tissue replacement placed beneath meshed, split thickness skin grafts on excised wounds. *J. Burn Care Rehab.* 13, 519-529.
28. Parenteau, N. L., Bilbo, P., Nolte, C. J., Mason, V. S. & Rosenberg, M. 1992. The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology* 9, 163-171.
29. Lerner, A. B., Halaban, R., Klaus, S. N. & Moellmann, G. E. 1997. Transplantation of human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 89, 219-224.
30. Boyce, S. T., Medrano, E. E. & Abdel-Malek, Z. A. 1993. Pigmentation and inhibition of wound contraction by cultured skin substitutes with adult melanocytes after transplantation to athymic mice. *J. Invest. Dermatol.* 100, 360-365.
31. Swope, V. B., Supp, A. P., Cornelius, J. R., Babcock, G. F. & Boyce, S. T. 1997. Regulation of pigmentation in cultured skin substitutes by cytometric sorting of melanocytes and keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 109, 289-295.
32. Butler, C. E. & Orgill, D. P. 2005. Simultaneous in vivo regeneration of neodermis, epidermis, and basement membrane. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 94, 23-41.
33. Kivinen, P. K., Hyttinen, M., Harvima, R. J., Naukkarinen, A., Horsmanheimo, M. & Harvima, I. T. 1999. Quantitative digital image analysis applied to demonstrate the stratified distribution of involucrin in organ cultured human skin. *Arch. Dermatol. Res.* 291, 217-223.
34. Boyce, S. T., Supp, A. P., Harriger, M. D., Pickens, W. L., Wickett, R. R. & Hoath, S. B. 1996 Surface electrical capacitance as a noninvasive index of epidermal barrier in cultured skin substitutes in athymic mice. *J. Invest. Dermatol.* 107, 82-87.