



Tissue engineering – a promising tool to obtain artificial skin for burn wounds treatment

Inżynieria tkankowa jako narzędzie do otrzymania sztucznej skóry wykorzystywanej w leczeniu oparzeń

© J ORTHOP TRAUMA SURG REL RES 1 (13) 2009

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: 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	2503/2243
Tables/Tabele	0
Figures/Ryciny	6
References/Piśmiennictwo	30

Received: 05.11.2008

Accepted: 12.01.2009

Published: 01.02.2009

Summary

Skin substitutes are used alone or more recently together with epidermis-substituting structures. Artificial skin do not induce keratinocyte growth and because of that it should be administered parallel with split-thickness skin graft (STSG) procedure or any other type of epidermal covering. In case of such substitute usage, apart from its functionality it is important not to inhibit epidermization process. The substitute structure can faithfully imitate human skin and include epidermal cover and dermis-like structure. Epidermal components are usually composed of epidermal cells – keratinocytes obtained from *in vitro* cultures. Nevertheless, to obtain a suitable number of cultured keratinocytes at least 3 weeks of culture are needed. In this time, the substitute outer surface should be protected with e.g. silicon layer, which temporarily substitutes epidermis. Dermis component can be built of various substances such as: collagen, glycosaminoglycan, polyglycolic acid or hyaluronic acid. Such component works as a matrix, which can be covered with dermis cells – fibroblasts also obtained during *in vitro* cultures.

Key words: inżynieria tkankowa, skóra, allograft, biobrane

Streszczenie

Substytuty skóry są stosowane samodzielnie lub częściej z strukturami zastępującymi naskórek. Ponieważ sztuczna skóra nie indukuje wzrostu keratynocytów, dlatego konieczne jest zastosowanie jej razem z przeszczepem skóry niepełnej grubości (STSG) albo innym rodzajem naskórkowego pokrycia. W przypadku takiego substytutu, poza jego funkcjonalnością ważne jest, aby nie dochodziło do zaburzenia naskórkowania. Budowa substytutu może odzwierciedlać wiernie ludzką skórę i składać się kolejno z: naskórkowego zabezpieczenia, a potem ze skóry właściwej. Komponentami naskórkowymi są najczęściej komórki naskórka – keratynocyty uzyskane w hodowlach prowadzonych w warunkach *in vitro*. Otrzymanie odpowiedniej ilości hodowlanych keratynocytów wymaga jednak minimum 3 tygodni, w czasie których substytut taki jest odpowiednio zabezpieczony od zewnątrz np. warstwą silikonu, która czasowo zastępuje naskórek. Komponent skóry właściwej może być zbudowany z różnorodnych substancji takich jak: kolagen, glikozoaminoglikan, kwas poliglikolowy czy hialuronowy. Komponent taki tworzy matrycę, którą można pokryć komórkami skóry właściwej – fibroblastami również uzyskanymi w hodowlach *in vitro*.

Słowa kluczowe: tissue engineering, skin, allograft, biobrane

Two models of artificial skin are distinguished so far – a model in which both components, skin substitute and keratinocytes, are used simultaneously and a model in which keratinocytes and skin substitute are used at different stages [1].

Artificial skin can consist of the following components:

1. Collagen and glycosaminoglycan (C-GAG) as dermis components and silicon protection as epidermis component. In case of this type of substitute grafting, a silicon layer is removed after a certain time and replaced with keratinocyte culture.
2. Polyglycolic acid on which fibroblasts or both keratinocytes and fibroblasts are seeded.
3. Other materials

1. Collagen-glycosaminoglycan substitute: the first type of graft consisted of *in vitro* cultured keratinocytes planted on a collagen scaffold [1]. The invention of various synthetic matrices containing fibroblasts led to the great progress in research on two-component model of skin substitutes [1]. The example of such substitute is an artificial skin consisting of an outer layer of silicone elastomer and an inner layer built of cross-bound collagen and glycosaminoglycan mesh. Rational explanation for covering of this type of substitute with silicone elastomer is reduction of bacterial infection risk, protection against bodily fluids loss as well as providing mechanical support. The inner layer is built in a way to provide stiff adhesion to the wound. Optimal porousness of such skin analogue ensures its slow biodegradation and induces vascularisation and cells growth. In consequence artificial skin is replaced by the new tissue [1]. A few weeks later, when blood vessels-derived fibroblasts growth is going to occur in the skin analogue, outer layer of silicone must be removed. Next the wound is closed with autologous split-thickness skin graft. There are clinical trials results published in literature which compare treatment effects of artificial skin with autologous split-thickness skin graft as well as with allograft, xenograft or synthetic dressing. It is proven that artificial skin treatment gives better cosmetic result than widely used autologous split-thickness skin graft (STSG). In comparison to allograft, artificial skin is much easier to use. Moreover, it is supposed that it does not bring the risk of viral infections, is not rejected and does not have to be removed. Disadvantages of artificial skin include lower chances for graft acceptance in comparison to autologous graft, as well as possibility of bacterial infection development under the artificial skin layer, which may be detected not until its natural degradation [1]. Some trials describing the artificial skin consisting of outer silicon layer and inner sponge chondroitin sulphate layer are published in the specialist literature [2]. Human keratinocytes were seeded on a membrane made of collagen and chondroitin sulphate, which replaces dermis. In this model of artificial skin a support made of stainless steel is located on the junction of epidermis and dermis [1].

Wyróżnia się dwa modele sztucznej skóry jeden, w którym stosuje się równocześnie obydwie składowe: substytut skóry i keratynocyty oraz model, w którym stosuje się: keratynocyty i substytut skóry właściwej w różnym czasie [1].

Sztuczna skóra może być zbudowana z następujących komponentów:

1. Kolagenu i glikozoaminoglikanu (C-GAG) jako komponenty skóry właściwej oraz silikonowego zabezpieczenia jako naskórek. Po przeszczepie takiego substytutu, usuwa się po pewnym czasie silikonową warstwę i zastępuje się ją hodowlami keratynocytów.
2. Kwasu poliglikolowego wysianego fibroblastami albo keratynocytami wraz z fibroblastami.
3. Innych materiałów.

1. Kolagenowo-glikozoaminowy substytut: pierwszy typ przeszczepu składał się z hodowanych *in vitro* keratynocytów, osadzonych na kolagenowym rusztowaniu [1]. Opracowywanie różnych syntetycznych matryc z fibroblastami, doprowadziło do uzyskania dużego postępu w poszukiwaniu takich dwuskładowych modeli substytutów skóry [1]. Takim substytutem jest sztuczna skóra składająca się z wierzchniej warstwy silikonowego elastomeru i spodniej warstwy zbudowanej z sieci kolagenu i glikozoaminoglikanu połączonych krzyżowo. Racjonalnym uzasadnieniem dla przykrycia takiego substytutu warstwą silikonowego elastomeru, jest ograniczenie zakażenia bakteryjnego i zabezpieczenie przed utratą płynów ustrojowych oraz zapewnienie dodatkowej mechanicznej podpory. Najniższa warstwa jest tam zaprojektowana w taki sposób, aby zapewnić sztywne przyleganie do rany. Optymalna porowatość takiego analogu skóry zapewnia jego wolną biodegradację i indukuje unaczynienie oraz wzrost komórek tak, aby ostatecznie została zastąpiona przez nową tkankę [1]. Kilka tygodni później, kiedy w takim analogu skóry ma następować wzrost fibroblastów z naczyń, naskórkowa warstwa silikonu musi być usunięta i następnie rana jest zamykana przez cienki autologiczny wolny przeszczep skóry pośredniej grubości. W dostępnym piśmiennictwie opublikowane są badania porównujące efekty leczenia z wykorzystaniem zarówno sztucznej skóry z siateczkowym przeszczepem niepełnej grubości jak również z alloprzeszczepem, ksenoprzeszczepem czy syntetycznym opatrunkiem. Udowodniono, iż sztuczna skóra daje lepszy efekt kosmetyczny rany niż powszechnie stosowany autologiczny przeszczep siateczkowy STSG. W porównaniu do alloprzeszczepu sztuczna skóra jest łatwiejsza w użyciu i zakłada się, iż nie niesie ze sobą ryzyka zakażeń wirusowych, nie ulega odrzuceniu i nie musi być usuwana. Wadami sztucznej skóry są przede wszystkim mniejsze szanse na przyjęcie się przeszczepu w porównaniu do przeszczepu autologicznego, jak również możliwość rozwoju zakażeń bakteryjnych pod sztuczną skórą, które mogą być wykryte dopiero po jej naturalnej degradacji [1]. W dostępnym piśmiennictwie opublikowane są również badania świadczące o zastosowaniu

Other modification used in this model was to use keratinocytes culture seeded on a C-GAG dermis substitute which was previously planted with fibroblasts [1]. Fibroblasts and keratinocytes were isolated and placed onto parallel cell cultures. After 2 weeks of culture fibroblasts were placed on a free side of collagen-glycosaminoglycan membrane. Two days later the graft was turned over and then keratinocytes were placed in layers on the opposite side of the C-GAG membrane. This composed substitute had distinct structure of dermis and epidermis, and built a full-thickness skin which is comparable to autologous skin graft. The artificial skin constructed in a way described above was used in the treatment of patients with full-skin thickness burns. Histological tests revealed anchoring of collagen fibers in the graft. Additional experiments performed in laboratory mice characterized this type of artificial skin model again [3]. In the animal model C-GAG graft containing melanocytes apart from keratinocytes and fibroblasts, showed that application of this material may lead to epidermis regeneration, inhibition of wound constriction as well as re-pigmentation [4].

It was proven, that fibroblasts present in skin grafts survive and subsequently secrete intercellular substance. Moreover, skin graft containing acellular dermis substitutes is gradually planted with host cells [5].

Hyaluronic acid is also used in artificial skin development. It was observed, that use of artificial skin immersed in 0,3 % hyaluronic acid for 3 days before transplantation of the substitute into rat gave better effects of granulation process in comparison to control group [6]. However, in the same year, scientists have proved that hyaluronic acid can exert negative influence on wound epidermization [7].

2. Polyglycolic acid. The significant differences in acceptance of C-GAG skin substitute in animals and humans in burns covering respectively 90% and 50% skin surface area were observed. The difference seems to be dependent on the speed of C-GAG enzymatic degradation. Absorption of matrix materials such as polyglycolic acid, used in resorbable sutures, proves high resistance to enzymatic degradation. However, in such case larger increase in fibro-vascularisation before resorption is possible [8]. One commercially available skin substitute of this type is Dermograft. It consists of polyglycolic acid and contains fibroblasts obtained from newborn foreskins. Dermograft clinical trials showed that Dermograft acceptance was lower than split-thickness skin graft (STSG); however, the difference was not significant. Allogenic fibroblast rejection was not observed. Not relevant inflammatory response as well as additional formation of basement membrane and elastic fibers one year after grafting was observed [9]. The same scientists introduced a new modification for dermoepithelial graft [10]. Polyglycolic acid scaffold was replaced by human fibroblasts and covered with keratinocyte cultures. In murine model

sztucznej skóry składającej się z zewnętrznej warstwy silikonowej i wewnętrznej gąbczastej warstwy zbudowanej z kolagenu i siarczanu chondroidyny [2]. Wykorzystując również kolagen i siarczan chondroidyny przygotowano błonę, która zastąpiła skórę właściwą, na którą zaszczepiono ludzkie keratynocyty. Wykorzystano w tej sztucznej skórze również podporę ze stali szlachetnej na styku naskórka ze skórą właściwą [1]. Inną modyfikacja polegała na wykorzystaniu hodowli keratynocytów umieszczonych na C-GAG substytucie skóry właściwej z zaszczepionymi wcześniej hodowlanymi fibroblastami [1]. Fibroblasty i keratynocyty zostały wyizolowane i umieszczone w równoległych hodowlach komórkowych. Po 2 – tygodniach hodowli fibroblasty zostały umieszczone na wolnej stronie błony kolagenowo-glikozaaminoglikanowej. Dwa dni później przeszczep został odwrócony i keratynocyty zostały umieszczone warstwowo na przeciwległej stronie błony C-GAG. Ten złożony substytut skóry miał wyraźną strukturę skóry właściwej i naskórka, tworząc skórę pełnej grubości, porównywalną do autologicznego przeszczepu skóry. Tak zbudowana sztuczna skóra została wykorzystana do leczenia chorých z oparzeniami skóry pełnej grubości, a wyniki histologiczne ukazały kotwiczenie włókien kolagenowych w przeszczepie. Dodatkowo eksperymenty na myszach ponownie scharakteryzowały te preparaty sztucznej skóry [3]. W modelu zwierzęcym przeszczep C-GAG, zawierający oprócz keratynocytów i fibroblastów dodatkowo melanocyty, wykazał możliwość regeneracji naskórka i hamowanie obkurczania się rany, jak również re-pigmentację [4].

Udowodniono, obecność w przeszczepach skóry fibroblastów, które przeżywają i wydzielają własną substancję międzykomórkową, jak również, że przeszczepiona skóra zawierająca bezkomórkowe substytuty skóry właściwej, jest następnie stopniowo zasiedlana przez komórki gospodarza [5].

Kwas hialuronowy również był wykorzystywany w sztucznej skórze. Zaobserwowano, iż użycie sztucznej skóry zanurzonej w 0,3% kwasie hialuronowym trzy dni przed przeszczepieniem tego substytutu na szczura, dało lepsze efekty ziarninowania w porównaniu z kontrolą [6]. Jednak w tym samym roku wykazano również, że kwas ten może mieć negatywny wpływ na ranę pokrywającą się ponownie naskórkiem [7].

2. Kwas poliglikolowy. Zaobserwowano wyraźne różnice w przyjmowaniu się C-GAG substytutu skóry u zwierząt i u ludzi w oparzeniach obejmujących odpowiednio 90% i 50% powierzchni ciała. Różnorodność ta wydaje się być zależna od szybkości enzymatycznej degradacji C-GAG. Wchłanianie się materiałów macierzy takich jak np. kwas poliglikolowy, używanego w resorbowalnych szwach, świadczy o dużej oporności na enzymatyczną degradację. Możliwy jest jednak w takim przypadku większy wzrost fibro-unaczynienia jeszcze przed wchłonięciem [8]. Jednym z substytutów skóry komercyjnie dostępnym na rynku jest Dermograft. Składa się on

only half of such grafts succeeded, but the reduction of wound constriction was observed.

3. Other materials. Group of other materials tested in artificial skin development included: poly-L-lactid acid (PLLA), poly(ethylene oxide)/poly(butylene terephthalate) (PEO/PBT) biodegradable co-polymer [11]. In models using substitutes containing acid mentioned above faster epithelialization was observed. Nonetheless, more research confirming these results is needed. The research applying bioengineering in new artificial skin models development is promising, however no clear advantage of one substitute over another was observed. Despite advanced technique, wound infections after grafting are still the major limitation in clinical graft usage [1].

ACELLULAR MATRICES AS AN ALLOGENIC SKIN SUBSTITUTE

Skin allograft, taken from a living or a cadaver donor, gives the opportunity to cover damaged skin surface. If an allograft is deprived of allogenic epidermal cells the dermis of such graft is comparably low immunogenic and does not bring risk of rapid graft rejection [1]. However, if rejection occurs, it is usually a result of immunological reaction against endothelial cells. Endothelial cells express high level of HLA class I and II molecules that are a potential source of antigens for induction of immunological reaction. In literature there are many reports of using such skin substitutes in the treatment of burn wounds covered with split-thickness or full-thickness skin allografts. Epidermis is removed using dermabrasion technique, leaving only dermis components. There are a few methods of obtaining skin substitutes deprived of living cells, which works as a kind of acellular bioprostheses. The easiest way of acellularisation is cyclic freezing and defrosting of the tissue. However, in this method a part of cells remain not isolated and collagen structure is changed during the process. The use of such tissue as a matrix for keratinocyte culture seeding is associated with low efficiency [12, 13].

z kwasu poliglikolowego i zawiera fibroblasty uzyskane z napletków noworodków. Podlega on próbom klinicznym, które wykazały, że przyjęcie Dermograftu było wprawdzie mniejsze niż przy zastosowaniu przeszczepu siateczkowego STSG, ale różnica ta była nieznaczna. Nie zaobserwowano odrzucenia allogenicznych fibroblastów, zaobserwowano małą odpowiedź zapalną, oraz dodatkowo formowanie się błony podstawnej oraz włókien sprężystych po około roku [9]. Ta sama grupa badaczy wprowadziła nową modyfikację skórno-naskórkowego przeszczepu [10]. Rusztowanie z kwasu poliglikolowego zostało zaszczerpione ludzkimi fibroblastami i przykryte hodowlami keratynocytów. Tylko połowa takich przeszczepów zakończyła się sukcesem na modelu mysim, ale zaobserwowano redukcję obkurczania się rany.

3. Inne materiały. Spośród innych materiałów testowano: kwas poli-L-mleczanowy (PLLA), polietylenooksydo-polibutylenotetrapentylo-ftaleina (PEO/PBT) ulegający biodegradacji kopolimer [11]. Zaobserwowano przy wykorzystaniu substytutów zawierających w/w kwas szybkie pokrycie się ich naskórkiem. Potrzebne jest jednak przeprowadzenie dalszych badań, potwierdzających te wyniki. Doświadczenia wykorzystujące bioinżynierię w otrzymaniu innych substytutów sztucznej skóry są obiecujące, ale nie zaobserwowano wyraźnej przewagi jednego typu substytutu nad pozostałymi. Nadal infekcje ran po przeszczepie stanowią poważne ograniczenie w ich wykorzystaniu [1].

MATRYCE ACELLULARNE JAKO SUBSTYTUT ALLOGENICZNY SKÓRY

Alloprzeszczep skóry pobrany za życia albo od dawcy zmarłego, daje inną możliwość zastąpienia ubytków skóry. W przypadku, gdy pozbawiony jest on allogenicznych komórek naskórka, skóra właściwa takiego alloprzeszczepu jest pozbawiona zagrożenia szybkiego odrzucenia z powodu stosunkowo niskiej immunogenności tych komponentów [1]. Jeżeli dochodzi do odrzucenia, to jest to wyniki reakcji immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom endotelialnym. Komórki te wykazują wysoką ekspresję antygenów HLA zarówno klasy I jak i II, co może stanowić potencjalne źródło indukcji reakcji immunologicznej. Istnieje wiele doniesień literaturowych opisujących wykorzystanie tych substytutów skóry w przypadku leczenia ran oparzeniowych, pokrywanych niepełnej albo pełnej grubości alloprzeszczepami skóry. Naskórek usuwa się metodą dermabrazji, pozostawiając jedynie komponenty skóry właściwej. Istnieje kilka metod uzyskania takich substytutów skóry pozbawionych żywych komórek, stanowiących wówczas pewnego rodzaju acellularne bioprotezy. Najprostszą metodą acellularyzacji jest cykliczne zamrażanie i rozmrażanie, część komórek pozostaje jednak nie wyizolowana, jak również dochodzi do zmiany struktury kolagenu. Wykorzystanie takiej tkanki jako matrycy do obsiania hodowlanymi keratynocytami, jest mało skuteczne [12,13].

It is also possible to remove cells from the tissue by incubating it in NaCl solution and next in a detergent suchlike SDS [12, 14]. However, the most often used method of cells removal is to incubate the tissue in trypsin/EDTA solution, because it does not induce any visible changes in the structure of extracellular matrix [15, 16, 17]. To acellularize tissue also other detergents are used including Triton-X 100, which presumably retains native matrix proteins structure and at the same time efficiently removes cells from the tissue [18]. Allogenic skin deprived of living cells prepared in one of methods described above retains structure and biochemical properties similar to native tissue; however, some of those matrices can have poor mechanical properties [19, 20, 21]. Use of allogenic skin was tested in animal models on full-thickness skin burn in pig and mouse [22, 23]. In burnt patients use of autologous graft of cultured keratinocytes (CEA) alone was compared with autologous keratinocytes graft placed on dermis allograft [24]. Allograft covered with autologous keratinocytes appeared to be significantly more frequently accepted (95%) and was characterized by higher durability in comparison to keratinocytes graft alone. In both cases, however, lack of elastic fibers was observed with only slight difference between both types of graft. There are reports on long-term clinical results of acellular dermis allograft use describing good clinical effectiveness of such type of skin graft [25].

COMMERCIALY AVAILABLE SKIN SUBSTITUTES

In case of burn wound which needs to be quickly dressed it is possible to use registered biotechnological products. They include acellular matrices or bi-layer structures consisting of allogenic cells associated with matrix. These products are stored in tissue and cell banks and are used mainly as dressings accelerating wound healing. Application of such dressing gives 2-3 weeks for autologous graft preparation using patient's epithelial cells cultured *in vitro*. Short characteristic of commercially available skin substitutes is given below.

Allograft – obtained from cadaver skin and stored as a frozen skin in a skin bank (Fig. 1). It is used to prepare burn wound for autologous graft. On account of immunodeficiency of graft recipient it is possible to leave the allograft in the wound for even up to a few weeks. However, it brings the risk of infectious diseases transmission, which can be reduced by performing appropriate tests in donor.

Również inkubacja tkanki w roztworze NaCl, a następnie w detergencie, takim jak SDS, prowadzi do usuwania z niej komórek [12,14]. Najczęściej jednak stosuje się inkubację w roztworze trypsyny/EDTA w celu usunięcia komórek, co pozwala na całkowite usunięcie komórek bez widocznych zmian w macierzy zewnątrzkomórkowej [15,16,17]. W celu acellularyzacji stosowane są również detergenty, takie jak, Triton-X 100, który prawdopodobnie pozwala zachować natywną strukturę białek macierzy, a jednocześnie skutecznie usuwa komórki [18]. Allogeniczna pozbawiona żywych komórek skóra, przygotowana w jednym z opisany powyżej sposobów, zachowuje strukturalną budowę i właściwości biochemiczne zbliżone do tkanki natywnej, choć część z tych matryc może wykazywać słabe właściwości mechaniczne [19,20,21]. Wykorzystanie skóry allogenicznej przetestowano na modelu zwierzęcym przy oparzeniu pełnej grubości u świni i myszy [22,23]. U pacjentów oparzonych badano porównawczo sam autoprzeszczep hodowlanych keratynocytów (CEA), z przeszczepem autologicznych keratynocytów umieszczonych na alloprzeszczepie skóry właściwej [24]. W przypadku alloprzeszczepu pokrytego autologicznymi keratynocytami wykazano znacznie wyższy procent przyjęcia się tego przeszczepu (95%) i lepszą wytrzymałość w porównaniu do przeszczepienia samych hodowlanych keratynocytów. W obu jednak przypadkach obserwowano niedostatek włókien sprężystych, wykrywając tylko nieznaczne różnice w obecności tych włókien pomiędzy tymi dwoma rodzajami przeszczepu. Istnieją również doniesienia literaturowe długoterminowych klinicznych rezultatów wykorzystania, pozbawionych komórek alloprzeszczepów skóry właściwej, opisujące dobre wyniki kliniczne zastosowania takiego rodzaju przeszczepu [25].

KOMERCYJNIE DOSTĘPNE SUBSTYTUTY SKÓRY

W przypadku, gdy rana oparzeniowa wymaga szybkiego zaopatrzenia, można zastosować zarejestrowane produkty biotechnologiczne, które są matrycami bezkomórkowymi lub elementami dwuwarstwowymi, składających się z komórek allogenicznych połączonych z matrycą. Produkty te przechowuje się w bankach tkanek i komórek i wykorzystuje, jako opatrunki przyspieszające gojenie ran. Ich zastosowanie pozwala na to, aby w ciągu 2-3 tygodni przygotować przeszczep, autologiczny z hodowlanych komórek naskórka chorego. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę, dostępnych substytutów skóry.

Allograft – otrzymany jest ze skóry pobranej ze zwłok ludzkich i przechowywany w postaci skóry mrożonej w bankach skóry (Rys.1). Jego zastosowanie ma na celu przygotowanie rany oparzeniowej do wykonania przeszczepu autologicznego. Ze względu na znacznie obniżoną odporność biorcy możliwe jest pozostawienie allograftu w ranie nawet kilka tygodni, niesie to jednak ze sobą niebezpieczeństwo przeniesienia chorób zakaźnych, które można zminimalizować przez wykonanie odpowiednich badań u dawcy.

Biobrane – nylon mesh imbedded into the thin silicone film that works as a barrier to microorganisms. The nylon mesh is coated with porcine collagen type I (Fig. 2). The dressing can be applied directly onto the wound or used as a living graft – Biobrane and keratinocyte allograft on the outer layer of the dressing [26].

Epicell – consists of an epithelial component in which autologous epithelial cells obtained during patient's skin biopsy are cultured. Use of Epicell gives the opportunity to cover extensive body surface with considerably low risk of rejection. However, this kind of graft need at least three weeks to culture the cells obtained from the patient, it is also very delicate and weakly binds to the wound [26].

Laserskin – in this type of dressing autologous keratinocytes obtained from the patient and cultured on hyaluronic acid-based perforated film work as an epithelial component. Use of hyaluronic acid allowed to improve mechanical properties of this skin substitute and led to formation of more stable and durable system for autologous keratinocytes delivery to the patient [27]. Similarly in this case at least 3 weeks are needed to culture suitable number of keratinocytes taken from the patient [26].

EpiDex – in this case autologous keratinocytes cultures are obtained from hair follicles. Hair follicles are a good source of epithelial stem cells. Hair follicle stem cells are isolated from outer hair sheath and cultured. The cultured cells are applied on a layer of allogenic keratinocytes which produce growth factors stimulating differentiation of stem cells into epithelial basal cells. At this stage the cells exert high proliferation rate and can be stored frozen. However, the culture of 1 cm² of epithelium from 20 hair follicles lasts approximately one month [27].

Biobrane – jest siatką nylonową połączoną z cienką membraną silikonową, która stanowi barierę dla drobnoustrojów. Nylonowa siatka pokryta jest świńskim kolagenem typu I (Rys.2). Opatrunek ten może być nakładany bezpośrednio na ranę, jak również od wierzchniej strony Biobrane można zabezpieczyć przeszczepem autologicznych keratynocytów [26].

Epicell – składa się z komponentu naskórkowego, którym są hodowlane autologiczne komórki naskórka otrzymane w drodze biopsji skóry pacjenta. Pozwala to na pokrycie dużej powierzchni ciała przy małym ryzyku odrzucenia. Wymaga on jednak przynajmniej trzech tygodni dla wyhodowania komórek pobranych od pacjenta, przeszczep taki jest również bardzo delikatny i słabo łączy się z raną [26].

Laserskin - komponentem naskórkowym są tutaj autologiczne keratynocyty, otrzymane od pacjenta, hodowane na perforowanej błonie kwasu hialuronowego. Zastosowanie tego kwasu pozwoliło na ulepszenia właściwości mechanicznych takiego substytutu, tworząc bardziej stabilny i wytrzymały system dostarczenia autologicznych keratynocytów pacjentowi [27]. Również i w tym przypadku wymagane jest przynajmniej 3 tygodnie dla wyhodowania odpowiedniej liczby keratynocytów pobranych od pacjenta [26].

EpiDex – hodowle autologicznych keratynocytów uzyskane są w tym przypadku, z mieszków włosowych. Mieszki włosowe są dobrym źródłem epitelialnych komórek macierzystych dla naskórka. Komórki macierzyste mieszka włosowego izoluje się z zewnętrznej pochewki włosa i hoduje. Wyhodowane komórki umieszcza się na warstwie allogenicznych keratynocytów, które wydzielają czynniki wzrostowe, stymulujące przekształcanie się komórek macierzystych w komórki warstwy podstawnej naskórka. Komórki takie mają zwiększoną zdolność proliferacji i mogą być przechowywane w stanie mrożenia. Wyhodowanie 1 cm² naskórka z 20 mieszków włosowych trwa jednak około miesiąc [27].

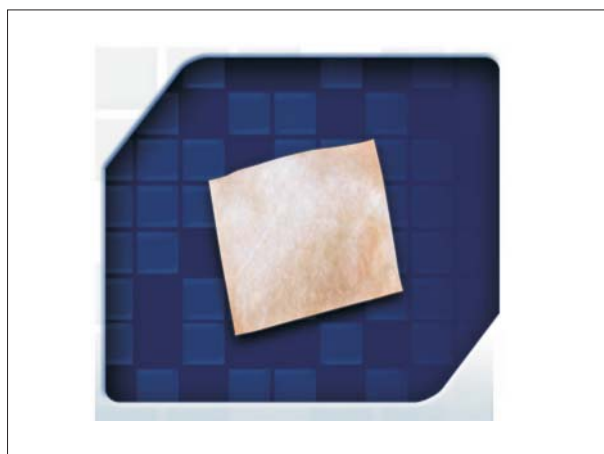


Fig. 1. Allograft – microscope image (internet source [1])

Rys. 1. Allograft – zdjęcie makroskopowe (źródło internetowe [1])

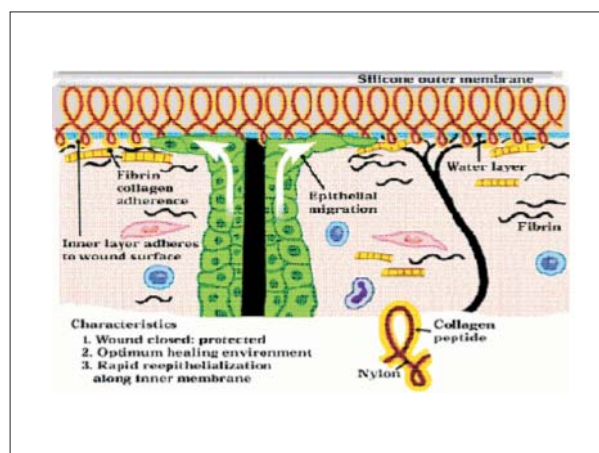


Fig. 2. Cross section through the skin substitute – Biobrane

Rys. 2. Przekrój poprzeczny przez substytut skóry - Biobrane

Myskin – autologous keratinocytes are cultured on vinyl polychloride (PVC) polymer coated with blood plasma (Fig. 3). In this type of dressing dermis is composed of murine fibroblasts, which growth was inhibited. The cells are excellent, reach in receptors, surface for keratinocyte growth. Vinyl polychloride (PVC) is a good membrane for keratinocyte planting and their delivery onto the wound. Keratinocytes can be frozen for later use. However, appropriate time is needed to culture the autologous keratinocytes. Moreover, repeat administration of this type of skin substitute is required to achieve good clinical results [27].

Alloderm – is a processed and preserved cadaver skin allograft, which works as acellular matrix without epithelium. The processing of this substitute reduces its immunogenicity; however, the risk of infectious diseases transmission from donor. Alloderm is applied on previously prepared wound together with autologous graft [28].

Dermagraft – is a skin substitute containing fibroblasts obtained from the newborn foreskins, fixed on polyglycolic acid mesh (Fig. 4.). Use of this biodegradable scaffold leads to absorption of the graft and makes the possibility to leave it permanently in the wound. Newborn-derived fibroblasts proliferate quickly producing collagen and growth factors what improve burn wound healing. Nevertheless, use of this substitute brings a potential risk of rejection and infectious diseases transmission from newborn-derived fibroblasts [29].

Integra – it consists of double layer of bovine collagen and silicone membrane, which temporarily replaces epithelium. Collagen type I is cross-linked with chondroitin and glycosaminoglycan (GAG) (Fig. 4). The outer silicone layer is removed after 2 to 3 weeks. It prepares the wound for transplanting *in vitro* cultured autologous cells or for autologous epithelium graft [28]. This substitute stimulates fibroblasts growth, which in consequence promote epithelial cells growth.

Myskin – hodowle autologicznych keratynocytów prowadzone są na polimerze polichlorku winylu (PCV), pokrytym osoczem krwi (Rys.3). Komponentem skóry właściwej są tutaj mysie fibroblasty, których wzrost zostaje zahamowany. Komórki te stanowią doskonałą bogatą w receptory powierzchnię wzrostu dla keratynocytów. Polichlorek winylu (PCV), stanowi dobrą membranę dla osadzenia się na niej keratynocytów i ich dostarczenia na ranę. Keratynocyty mogą być zamrożone w celu ich powtórnego wykorzystania. Wyhodowanie jednak autologicznych keratynocytów, wymaga odpowiedniego czasu, jak również wymagane jest powtórne podanie tego substytutu w celu uzyskania dobrych rezultatów klinicznych [27].

Alloderm –to odpowiednio przetworzony i konserwowany alloprzeszczep skóry pobranej ze zwłok, stanowiący bezkomórkową macierz pozbawioną naskórka. Odpowiednie przygotowanie tego substytutu zmniejsza jego immunogenność, jednak i w tym przypadku istnieje ryzyko przeniesienia chorób zakaźnych od dawcy. Alloderm nakłada się na przygotowaną uprzednio ranę oparzeniową łącznie z przeszczepem autologicznym [28].

Dermagraft – to substytut skóry zawierający fibroblasty otrzymane z napletków noworodków, ufiksowane na siatce z kwasu poliglikolowego (Rys.4). Zastosowanie tego, biodegradowalnego rusztowania, powoduje wchłanianie wszczepu i możliwość pozostawienia go na stałe. Noworodkowe fibroblasty mają zdolność szybkiej proliferacji, produkując przy tym kolagen i czynniki wzrostowe, co pomaga w leczeniu rany oparzeniowej. Istnieje jednak przy zastosowaniu tego substytutu potencjalne ryzyko odrzucenia i chorób zakaźnych, których źródłem mogą być fibroblasty pochodzące od noworodków [29].

Integra – składa się z podwójnej blaszki kolagenu wołowego oraz warstwy silikonu, który czasowo zastępuje naskórek. Kolagen typu I jest usieciowany chondroidyńą i glikozoaminoglikanem (GAG) (Rys. 4). Zewnętrzną warstwę silikonową usuwa się po 2 do 3 tygodniach. W ten sposób rana jest przygotowana do przeszczepienia wyhodowanych *in vitro* komórek autologicznych bądź przeszczepienia naskórka autologicznego [28]. Substytut



Fig. 3. Myskin – microscope image (internet source [2])

Rys. 3. Myskin – zdjęcie makroskopowe (źródło internetowe [2])



Fig. 4. Dermagraft – microscope image (internet source [3])

Rys. 4. Dermagraft – zdjęcie makroskopowe (źródło internetowe [3])

Apligraf – is a bi-layer skin equivalent. Epithelial component consist of allogenic keratinocytes, while dermis component is made up of allogenic fibroblasts. The cells are derived from newborn foreskins. Apligraf is prepared in two stages. Firstly, fibroblasts are cultured in layers on bovine collagen mesh. Secondly, they are covered with keratinocyte layer, which imitates epithelium. The outcome of this procedure is similar to autologous graft, and gives good cosmetic results. In this case, similarly to the described above, there is a risk of infectious disease transmission from allogenic fibroblasts and keratinocytes. Furthermore, to obtain good clinical results, repeated application of this substitute is required [30].

Transcyte – is a compound skin substitute, consisting of a thin silicon layer (Biobrane) which works as an epithelial component. Nylon mesh coated with collagen with newborn-derived allogenic fibroblast layer builds dermis equivalent. This type skin substitute was effective in the treatment of II and III grade burn wounds. Fibroblasts are the excellent source of collagen and growth factors and in consequence accelerate burn wound healing. Nylon mesh used in this substitute is not biodegradable, what is a major disadvantage of the product. Moreover, it also brings the risk of infectious diseases transmission [26].

OrCel – also consists of human allogenic keratinocytes and fibroblasts derived from newborn foreskins. Fibroblasts are seeded onto bovine collagen sponge. This substitute brings a good environment for patient's cells migration and is a good source of growth factors and cytokines. Nonetheless, it is not a substitute which replaces skin permanently, but works as a biological dressing only. Unfortunately, using OrCel it is possible to transmit infectious diseases from human allogenic cells as well as zoonosis from bovine collagen [26].

ten pobudza do wzrostu fibroblasty, które z kolej ułatwiają wzrost komórką naskórka.

Apligraf – jest dwuwarstwowym ekwiwalentem skóry. Komponent naskórkowy stanowią allogeniczne keratynocyty, natomiast komponent skóry właściwej allogeniczne fibroblasty. Komórki te pochodzą z napletków noworodków. Apligraf przygotowuje się dwuetapowo, najpierw hoduje się fibroblasty, układając je w warstwach na siatce z kolagenu wołowego. W drugim etapie przykrywa się je warstwą keratynocytów, które imitują naskórek. Przeszczep taki przyjmuje się porównywalnie z przeszczepem autologicznym, dając dobre kosmetyczne skutki. Istnieje jednak również i w tym przypadku ryzyko przeniesienia chorób zakaźnych pochodzących od fibroblastów i keratynocytów allogenicznych. Wymagane jest w celu uzyskania dobrych rezultatów klinicznych, powtarzalne położenie tego substytutu na pacjenta [30].

Transcyte – jest złożonym substytutem skóry, składającym się z cienkiej warstwy silikonu (Biobrane) stanowiąca komponent naskórkowy. Rolę ekwiwalentu skóry właściwej pełni natomiast pokryta kolagenem, siatka nylonowa z warstwą otrzymanych od noworodków allogenicznych fibroblastów. Wykorzystanie tego substytutu skóry, dało pozytywne rezultaty w leczeniu oparzeń drugiego i trzeciego stopnia. Fibroblasty stanowią doskonałe źródło kolagenu i czynników wzrostowych przyspieszając w ten sposób gojenie się ran oparzeniowych. Wadą tego substytutu jest jednak to, że zastosowana siatka nylonowa nie ulega biodegradacji, jak również istnieje ryzyko przeniesienia chorób zakaźnych [26].

OrCel – zbudowany jest również z ludzkich allogenicznych keratynocytów i fibroblastów otrzymanych z napletków noworodków. Fibroblasty wysiewane są na gąbkę kolagenu bydlęcego. Substytut ten dostarcza dobre środowisko dla migracji komórek pacjenta, stanowiąc przy tym źródło czynników wzrostowych czy cytokin. Nie jest on jednak substytutem, trwale zastępującym skórę, a jedynie opatrunek biologiczny. Niesie on także ze sobą ryzyko przeniesienia chorób zakaźnych, których

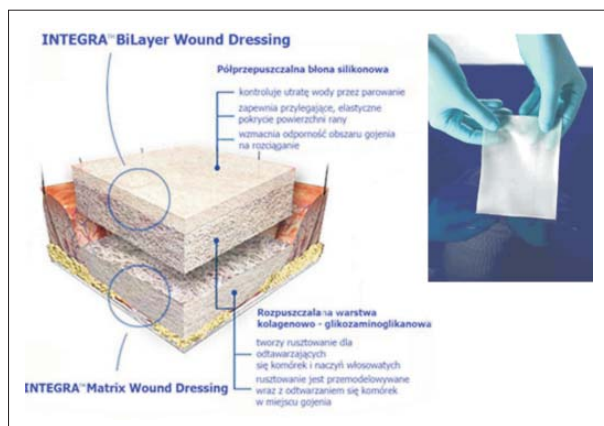


Fig. 5. Cross-section and microscope image of Integra skin substitute (internet source [4])

Rys. 5. Przekrój poprzeczny oraz zdjęcie makroskopowe przez substytut skóry – Integra (źródło internetowe [4]).



Fig. 6. OrCel – microscope image (internet source [3])

Rys. 6. OrCel – zdjęcie makroskopowe (źródło internetowe [3])

Permacol – is a skin substitute consisting of acellular matrix obtained from bovine skin. Acellular matrix is not immunogenic due to removal of living cells and collagen. The matrix may sometimes inhibit vascularisation of wound [27].

SUMMARY

Despite many experiences, the skin substitute which meets all the expectations of extensive burn wounds treatment is still not invented. Tissue engineering with the use of *in vitro* cultured cells raises hopes for development of such skin substitute in the future. If it finally happens, the substitute will for sure improve treatment quality of severely burnt patients'.

źródłem mogą być ludzkie komórki allogeniczne, jak również przeniesienia chorób od zwierzęcych, poprzez wykorzystanie kolagenu bydłęcego [26].

Permacol – to substytut skóry stanowiący bezkomórkową macierz uzyskaną ze skóry świńskiej. Macierz taka nie jest immunogenna ze względu na usunięcie z niej żywych komórek i kolagenu. Niejednokrotnie ta bezkomórkowa macierz powstrzymuje jednak unaczynienie rany [27].

POSUMOWANIE

Pomimo wielu doświadczeń, jak dotąd nie udało się stworzyć substytutu skóry, który spełniałby wszystkie wymagania, jakie stawia przed nim leczenie rozległych ran oparzeniowych. Wykorzystanie inżynierii tkankowej z zastosowaniem komórek uzyskanych w hodowlach *in vitro* stwarza realne nadzieje na zbudowanie takiego substytutu skóry. Zwiększy to skuteczność ratowania chorych ciężko oparzonych.

Internet source / Źródła Internetowe:

1. www.ahmedvalve.com/.../tissue/pericardium.html
2. www.celltran.com/products.php
3. <http://www.fda.gov/cdrh/annual/fy2001/ode/annualreport2001.html>
4. <http://www.fda.gov/cdrh/mda/docs/p900033s008>

References/Piśmiennictwo:

1. B. Pomahac, T. Svensio, F. Yao, H. Brown, E. Eriksson. *Tissue engineering of skin. Crit Rev Oral Biol Med* 9(3):333-344 (1998).
2. Suzuki S, Matsuda K, Isshiki N, Tamada Y, Yoshioka K, Ikada Y (1990). *Clinical evaluation of a new bilayer „artificial skin” composed of collagen sponge and silicone layer. Br J Plast Surg* 43:47-54.
3. Cooper ML, Hansbrough IF, Spielvogel RL, Cohen R, Bartel RL, Naughton G (1991). *In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. Biomaterials* 12:243-248.
4. Harriger MD, Warden GD, Greenhalgh DG, Kagan RJ, Boyce ST (1995). *Pigmentation and microanatomy of skin regenerated from composite grafts of cultured cells and biopolymers applied to full-thickness burn wounds. Transplantation* 59:702-707.
5. Demarchez M, Hartmann DJ, Regnier M, Asselineau D (1992). *The role of fibroblasts in dermal vascularization and remodeling of reconstructed human skin after transplantation onto the nude mouse. Transplantation* 54:317-326.
6. Murashita T, Nakayama Y, Hirano T, Ohashi S (1996). *Acceleration of granulation tissue ingrowth by hyaluronic acid in artificial skin. Br J Plast Surg* 49:58-63.
7. Bettinger DA, Mast B, Gore D (1996). *Hyaluronic acid impedes reepithelialization of skin graft donor sites. J Burn Care Rehabil* 17:302-304.
8. Cooper ML, Hansbrough JF (1991). *Use of a composite skin graft composed of cultured human keratinocytes and fibroblasts and a collagen-GAG matrix to cover full-thickness wounds on athymic mice. Surgery* 109:198-207.
9. Hansbrough JF, Dore C, Hansbrough WB (1992). *Clinical trials of a living dermal tissue replacement placed beneath meshed split-thickness skin grafts on excised burn wounds. J Burn Care Rehabil* 13:519-529.
10. Hansbrough JF, Morgan IL, Greenleaf GE, Bartel R (1993). *Composite grafts of human keratinocytes grown on a polyglactin mesh-cultured fibroblast dermal substitute function as a bilayer skin replacement in fullthickness wounds on athymic mice. J Burn Care Rehabil* 14:485-494.
11. Beumer GI, van Blitterswijk CA, Bakker D, Ponc M (1993). *Cell-seeding and in vitro biocompatibility evaluation of polymeric matrices of PEO/PBT copolymers and PLLA. Biomaterials* 14:598-604.
12. Kim WG, Park JK, Lee WY. *Tissue engineered heart valve leaflets: an effective method of obtaining acellularized valve xenografts. Int J Artif Organs* 2002; 25: 791-797.
13. Fang CH, Robb EC, Yu GS, Alexander JW, Wadden GD. *Observation on stability and contraction of composite skin grafts: xenodermis or allodermis with an isograft onlay. J Burn Care Rehabil* 1990; 11: 538-542.
14. Walter RJ, Matsuda T, Reyes HM, Walter JM, Hanumadass M. *Characterization of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. Burns* 1998; 24: 104-113.
15. Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. *Tissue engineering of vascular grafts: Human cell seeding of decellularized porcine matrix. Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000, 19: 381-386.
16. Steinhoff G, Stock U, Karim N, et al. *Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits. Circulation* 2000, 102 (S III): 50-55.
17. Bader A, Steinhoff G, Strobl K. *Engineering of human vascular aortic tissue based on xenogenic starter matrix. Transplantation* 2000, 70: 4-14.
18. Kasimir M-T, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Simon P. *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. Int J Artif Organs* 2003; 26: 421-427.

19. Park SN, Park JC, Kim HO, Song MJ, Suh H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* 2002; 23: 1205-1212.
20. Feng Z, Yamato M, Akutsu T, Nakamura T, Okano T, Umezumi M. Investigation on mechanical properties of contracted collagen gels as scaffold for tissue engineering. *Artif Organs* 2003; 27: 84-91.
21. Pei M, Solchaga LA, Seidel J, Zeng L, Vunjak-Novakovic G, Caplan AI, Freed LE. Bioreactors mediated the effectiveness of tissue engineering scaffolds. *FASEB J* 2002; 16: 1691-1694.
22. Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A (1995). Transplanted acellular allograft dermal matrix. *Transplantation* 60:1-9.
23. Medalie DA, Eming SA, Tompkins RG, Yarmush ML, Krueger GG, Morgan JR (1996). Evaluation of human skin reconstituted from composite grafts of cultured keratinocytes and human acellular dermis transplanted to athymic mice. *Invest Dermatol* 107:121-127.
24. Cooper ML, Andree C, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent LR, Spielvogel RL (1993). Direct comparison of a cultured composite skin substitute containing human keratinocytes and fibroblasts to an epidermal sheet graft containing human keratinocytes on athymic mice. *J. Invest Dermatol* 101:811-819.
25. Wainwright D, Madden M, Luterman A, Hunt J, Monafó W, Heimbach D, et al. (1996). Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns. *J Burn Care Rehabil* 17:124-136.
26. Raymund E, Horch, Jürgen Kopp, Ulrich Kneser, Justus Beier, Alexander D. Bach. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 9, No 3, 2005 pp. 592-608.
27. 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.
28. Wai-Sun Ho. Skin substitutes: An overview. *Ann. Coll. Surg. H.K.* (2002) 6, 102-108.
29. S. Gibbs, H.M. van den Hoogenband, G. Kirtschig, C.D. Richters, S.W. Spiekstra, M. Breetveld, R.J. Scheper, E.M. de Boer. Autologous full-thickness skin substitute for healing chronic wounds. *British Journal of Dermatology* 2006 155, pp267-274.
30. Shasa Hu; Robert S. Kirsner, Vincent Falanga, Tania Phillips, William H. Eaglstein. Evaluation of Apligraf's persistence and basement membrane restoration in donor site wounds: a pilot study. *Wound Rep Reg* (2006), 14: 427-433.