

ARTICOL DE SINTEZĂ

## Substituenții biologici ai pielii – între mit și realitate

Octavian Cirimpei<sup>1</sup>, Tatiana Malcova<sup>1,2</sup>,  
Diana Cirimpei<sup>1,3</sup>, Viorel Nacu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>2</sup>Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova;

<sup>3</sup>Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, România.

### Autor corespondent:

Tatiana Malcova, studentă

Facultatea de medicina nr. 1

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: malcovatiana92@mail.ru

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Niciunul din materialele existente, destinate închiderii defectului tegumentar, nu satisface în totalitate cerințele medicilor cliniciști. Cercetările în acest domeniu continuă și în zilele noastre. Ele au drept scop principal obținerea unui substituent de piele universal, care, pe de o parte, va asigura acoperirea mecanică a defectului, iar pe de altă, va stimula procesul de regenerare.

### Ipoteza de cercetare

Expunerea unei sinteze narative a literaturii contemporane, referitoare la substituenții biologici de piele.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Sinteza celor mai recente date despre principalele grupe de substituenți biologici de piele, indicațiile și contraindicațiile lor de utilizare, efectele și posibilele avantaje ale acestei metode de tratament, comparativ cu metodele convenționale (greafa de piele, standardul actual de aur în tratamentul leziunilor extinse), actualizează informația deținută de către personalul medical.

### Rezumat

**Introducere.** Substituenții de piele sunt încă în curs de dezvoltare. Ei sunt aplicați în calitate de tratament adjuvant al arsurilor și, de asemenea, pentru tratamentul plăgilor cronice și al ulcerelor venoase și diabetice. Având în vedere că mortalitatea în caz de arsuri continuă să scadă, există un interes crescut pentru dezvoltarea unor metode noi de tratament, care ar reduce morbiditatea. Această lucrare compară rezultatele clinice obținute la utilizarea diferitor tipuri de substituenți biologici de piele.

**Material și metode.** Din bazele de date PubMed și Springer Link, au fost selectate articolele după cuvintele cheie “wound

REVIEW ARTICLE

## Biological skin substitutes – between myth and reality

Octavian Cirimpei<sup>1</sup>, Tatiana Malcova<sup>1,2</sup>,  
Diana Cirimpei<sup>1,3</sup>, Viorel Nacu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Traumatology and Orthopedics Hospital, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>2</sup>Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>3</sup>University of Medicine and Pharmacy Carol Davila, Bucharest, Romania.

### Corresponding author:

Tatiana Malcova, medical student

Faculty of Medicine no. 1

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Ștefan cel Mare și Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: malcovatiana92@mail.ru

### What is not known yet, about the topic

None of existing material for skin defect closure satisfies completely doctors' requirements. Researches in this field continue. They have the main goal obtaining of a universal skin substitute which ensures mechanical coverage of the skin defect and stimulates the regeneration process.

### Research hypothesis

To provide an overview of current data on the biological skin substitutes.

### Article's added novelty on this scientific topic

A synthesis of the latest worldwide data on the main groups of biological skin substitutes, indications and contraindications of the use, effects and possible advantages of this method of treatment vs. conventional methods (as transplantation of split-thickness skin grafts, which remains the gold standard of care for extensive wounds) facilitates perception of information by the medical professionals.

### Abstract

**Introduction.** Skin tissue substitutes are still developing, being conceived as adjuvant treatment of burns, but also, as treatment of chronic plagues and of the more frequent venous and diabetic ulcers. Since the burn-related mortality continues to decrease, there is an increased interest for the development of new treatment guidelines that would decrease the morbidity. This work compares the clinical usage of different types of biologic skin substitutes.

**Material and methods.** Articles containing the keywords “wound healing”, “wound coverage”, “wound closure”, “wound treatment”, “skin biological substitutes”, were selected from

healing”, “wound coverage”, “wound closure”, “wound treatment”, “skin biological substitutes”. A fost selectată și procesată informația despre grupele principale de substituenți biologici de piele, indicațiile pentru utilizarea acestora, efectele obținute și beneficiile în cazul utilizării acestora în tratament.

**Rezultate.** După procesarea informației din bazele de date *PubMed* și *Springer Link* conform criteriilor de căutare, au fost găsite 586 de articole despre utilizarea clinică a substituenților biologici de piele. Bibliografia finală conține 47 de surse, care au fost suficiente pentru formularea ideilor principale.

**Concluzii.** În viitor, substituenții de piele vor avea un mai mare potențial de a stimula procesul de regenerare a leziunii, decât de a o repara. Pielea artificială va înlocui grefele de piele, astăzi considerate drept standard de aur în tratamentul defectelor tegumentare. În calitate de clinicieni, scopul nostru este – de a-l asigura pe pacientul ars – cu piele de cea mai înaltă calitate și cât mai rapid posibil. Ca oameni de știință, noi deocamdată, nu am realizat scopul final – obținerea pielii artificiale gata pentru utilizare și, cu atât mai mult, în cantități suficiente. Însă, prin sinteza ultimelor date în acest domeniu și aplicarea rațională a cunoștințelor noi în practică, putem să ne asigurăm că folosim materialul potrivit într-o situație corespunzătoare.

**Cuvinte cheie:** vindecarea arsurilor, acoperirea defectului, închiderea leziunilor, substituenți biologici de piele.

## Introducere

Progresul recent, realizat în domeniul biotehnologiei, sugerează ideea că ingineria tisulară ar fi o abordare interesantă în rezolvarea problemei deficitului de organe [1]. Substituenții de piele, obținuți prin ingineria tisulară, reprezintă un mijloc terapeutic inovator în tratamentul arsurilor și ulcerelor cutanate și, de asemenea, un instrument puternic pentru cercetarea fundamentală [2, 3].

Din punct de vedere anatomic și funcțional, pielea e compusă din două straturi: cel superficial, epidermic, care reprezintă o barieră împotriva infecției și pierderilor lichidiene, și cel dermic, profund, care este responsabil de elasticitatea, rezistența și integritatea mecanică.

Vindecarea plăgilor reprezintă un proces complex și dinamic de substituire a structurilor acelulare, devitalizate și a straturilor tisulare [4].

Fazele procesului de vindecare sunt: faza inflamatorie, faza proliferativă și faza de maturizare [5]. Fibroblastele dermale și cheratinocitele epidermale joacă un rol esențial în vindecarea plăgilor cutanate și repararea pielii. Pe parcursul fazelor a doua și a treia a procesului de reparare a leziunilor termice, pe prim plan iese interacțiunea specifică a acestora, care duce, în final, la schimbarea treptată a micromediului de la cel inflamator la cel de sinteză, cu formarea țesutului de granulație. Cheratinocitele stimulează fibroblastele să sintetizeze factorii de creștere; fibroblastele, la rândul lor, stimulează proliferarea keratinocitelor într-o manieră dublă, paracrină [6]. Pe parcursul fazei de proliferare, rana este „reconstruită” cu noul țesut de granulație, compus din collagen și matricea extracelulară, în care se dezvoltă o nouă rețea de vase sanguine (proces cunoscut drept *angiogeneză*). Formarea țesutului de granulație să-

the *PubMed* and *Springer Link* databases. Information on the main groups of biological skin substitutes, indications of the use, effects and benefits of this method of treatment was selected and processed.

**Results.** As a result of information processing in *PubMed* and *Springer Link* databases according to the search criteria, there were found 586 articles on biological skin substituents clinical use. The final bibliography includes 47 sources necessary to formulate the main ideas of this issue.

**Conclusions.** In future, skin substitutes may have more ability to stimulate regeneration than to repair, and artificial skin may be like skin split autografts – the gold standard for skin defects recovery today. As clinicians, our goal is to provide patients with wounds with skin of the highest quality in the shortest time possible. As scientists, we have not reached the final goal yet – to have an artificial skin ready for use, but bringing into question the current views and using them rationally we can at least do our duty as clinicians and ensure that we use the right material in a proper situation.

**Keywords:** wound healing, wound coverage, wound closure, wound treatment, and skin biological substitutes.

## Introduction

Recent biotechnological progress suggests that tissue engineering is an interesting approach to counteract organ deficit [1]. Tissue-engineered skin substitutes represent an innovative therapeutic option for the treatment of burns and skin ulcers as well as a powerful tool for fundamental research [2, 3].

The anatomical and functional structure of the skin is composed of two layers: the superficial epidermis, which acts as a barrier against infection and fluid loss and deep dermis, which is responsible for elasticity and mechanical integrity.

Wound healing is a complex and dynamic process of replacing devitalized and missing cellular structures and tissue layers [4].

The phases of wound healing are: inflammatory, proliferation, and maturation phases [5]. Dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes play a pivotal role in cutaneous wound healing and skin repair. In the mid- and late phase of wound healing, cellular interactions become dominated by the interplay of keratinocytes with fibroblasts, which gradually shift the microenvironment away from an inflammatory to a synthesis-driven granulation tissue. Keratinocytes stimulate fibroblasts to synthesize growth factors, which in turn, will stimulate keratinocyte proliferation in a double paracrine manner [6]. During proliferation, the wound is “rebuilt” with new granulation tissue which is comprised of collagen and extracellular matrix and into which a new network of blood vessels develop, a process known as angiogenesis. Healthy granulation tissue is dependent upon the fibroblast receiving sufficient levels of oxygen and nutrients supplied by the blood vessels. Healthy granulation tissue is granular and uneven in texture; it does not bleed easily and is pink/red in colour. The colour and condition of the granulation tissue is often an indi-

nătos depinde dacă fibroblastele primesc în cantități suficiente oxigen și substanțe nutritive. Țesutul de granulație sănătos este granular și are textură diferită; acesta nu sângrează ușor și are culoarea roză sau roșie. Culoarea și alte proprietăți ale țesutului de granulație sunt considerați drept indicatori ai modului în care rana se vindecă. Țesutul de granulație de culoare întunecată arată un nivel scăzut de perfuzie, o ischemie și/sau o infecție. În final, celulele epiteliale acoperă suprafața plăgii, are loc procesul de epitelizare [5]. Regenerarea epidermei are loc, în mare parte, din celulele epidermice rămase, care se găsesc în adâncimea structurilor dermice. Creșterea de pe marginile plăgii este insuficientă atunci, când defectul tegumentar depășește câțiva centimetri [7].

Scopurile principale în cadrul îngrijirii defectelor cutanate sunt: debridarea și curățarea defectului, aplicarea agenților antimicrobieni, acoperirea cu materiale biologice, acoperirea cu materiale sintetice sau biosintetice, excizie și grafting [8]. Recuperarea cât mai precoce a funcției de barieră a tegumentului este cheia succesului în tratamentul pacienților cu arsuri cu grad diferit de lezare a pielii. Substituenții de piele sunt absolut de neînlocuit în cadrul îngrijirii pacienților arși, precum și a celor care necesită ample reconstrucții post arsură. Aceștia influențează rezultatul obținut în cadrul tratamentului victimelor arse [9]. Pentru închiderea plăgii e nevoie de așa un material, care să restabilească funcția de barieră a epidermei și să se încorporeze în plagă în cursul vindecării. Materialele pentru acoperirea plăgii se potrivesc cel mai bine pentru arsurile superficiale (arsuri de gradul I-II), unde creează un mediu benefic regenerării epidermei, oferind o barieră împotriva infecției și controlând pierderile de apă [7].

### Material și metode

Articolele au fost selectate din bazele de date *PubMed* și *Springer Link* după cuvintele cheie “wound healing”, “wound coverage”, “wound closure”, “wound treatment”, “skin biological substitutes”.

După examinarea titlurilor articolelor, în bibliografia finală au fost incluse doar acelea, care conțineau informații noi și concepte contemporane despre efectele și indicațiile de utilizare ale substituenților biologici de piele. Pentru selecția avansată a literaturii, am folosit următoarele filtre: lucrări publicate începând cu luna martie 2015 în limbile engleză, română și rusă. De asemenea, a fost studiată bibliografia articolelor selectate, cu scopul de a găsi alte articole relevante scopului nostru. Informația a fost sistematizată, evidențiind principalele aspecte ale viziunii contemporane asupra caracteristicii generale a substituenților de piele, clasificarea acestora, avantajele și dezavantajele fiecărui grup, posibilele indicații și contraindicații de utilizare. Publicațiile, care nu au fost accesibile pentru vizionare, au fost excluse din lista publicațiilor generate de motorul de căutare.

### Rezultate

După procesarea informației, selectate din bazele de date *PubMed* și *Springer Link*, conform criteriilor sus-menționate, au fost găsite 586 de articole relevante temei noastre. Pentru a clarifica unele aspecte, la necesitate, a fost consultată literatură adițională. Bibliografia finală a inclus 47 de publicații.

cator de how the wound is healing. Dark granulation tissue can be indicative of poor perfusion, ischaemia and / or infection. Epithelial cells finally resurface the wound, a process known as epithelialisation [5]. Epidermis regeneration occurs from remaining epidermal cells, which lies in the depth of dermal structures. The cell growth from the wound edges is not sufficient if the defect exceeds several centimeters [7].

The general wound care consists in: clearing and debridement, antimicrobial agents, biological dressing, biosynthetic and synthetic dressing, excision and grafting [8]. The timely restoration of skin protective functions is the key to the successful treatment of burn victims with various severity of damaged skin. Skin substitutes are required in the acutely burned patients as well as in those requiring extensive post burn reconstructions. These have important impact in the care and outcome in the burn victims [9]. An adequate wound closure material should restore the barrier function of the epidermis and incorporate in wound bed during the healing process. Wound coating materials are the best choice for superficial burns (burns I-II degree), because they create a beneficial environment for epidermis regeneration, provide a barrier against infection and control the water loss [7].

### Material and methods

Articles containing the keywords “wound healing”, “wound coverage”, “wound closure” “wound treatment”, “skin biological substitutes”, were selected from the *PubMed* and *Springer Link* databases.

After examining the titles of articles found, only works that could possibly include accounts of current concepts regarding the effects and indications of use of biological skin substitutes were selected. For advanced selection of literature sources, the following filters were applied: works published by March 2015, articles in English, Romanian and Russian. The bibliography of selected articles was analysed too, in order to find other articles, relevant to the intended purpose. Conclusions of existing literature reviews were critically examined. Subsequently, information was systematized, highlighting the main aspects of contemporary vision on: skin substituents general characteristics, classification, advantages and disadvantages of each group, possible indications and contraindications. The publications that were not accessible for viewing were excluded from the list of publications generated by search engine.

### Results

As a result of information processing in *PubMed* and *Springer Link* databases according to the search criteria, there were found 586 articles on biological skin substitute’s clinical use. If necessary (to clarify some aspects) additional literature was consulted. The final reference includes 47 of publications.

Skin substitutes are a heterogeneous class of therapeutic devices that vary in their biology and application. These substances are alternatives to the standard wound coverage in

Substituenții de piele reprezintă o clasă heterogenă de mijloace terapeutice, ce diferă după structură și indicații pentru utilizare. Aceste produse pot fi folosite pentru acoperirea leziunilor cutanate, atunci când aplicarea mijloacelor standard nu este posibilă. Deși nu există un material universal, anumite criterii generale trebuie luate în considerație la evaluarea alternativelor.

#### **Caracteristica generală a substituenților de piele**

- produsul trebuie să fie ușor de pregătit și să se aplice fără a necesita o pregătire specială. Flexibilitatea materialului permite ca acesta să fie adaptat plăgilor de diferite tipuri;
- materialul trebuie să fie rezistent la hipoxie și să aibă un grad înalt de rezistență la infecție, pentru a permite ca și țesuturile relativ ischemizate să fie acoperite;
- substituentul ideal de piele ar trebui să aibă o rezistență bună la forțele de tracțiune și să ofere plăgii stabilitate permanentă;
- acesta ar trebui să includă în structura sa cele două zone ale pielii (epidermul și dermul) și să nu posede proprietăți antigenice, care ar putea compromite rezultatele grefării [10].
- deoarece niciunul din produsele existente nu corespunde tuturor criteriilor sus-menționate, fiecare caz trebuie examinat cu atenție, în scopul alegerii celui mai potrivit material.

#### **Clasificarea substituenților de piele**

În primul rând, substituenții de piele se clasifică în funcție de tipul de țesut folosit pentru grefare. Din acest punct de vedere, deosebim *xenogrefe*, *alogrefe* și *autogrefe*. Pot exista unele suprapuneri între categorii, atunci când un produs individual conține atât componente de origine animalieră, cât și componente sintetice, sau elemente de origine umană și animalieră.

**Xenogrefele** sunt țesuturi transplantate de la o specie pe o altă specie și sunt folosite în calitate de grefă temporară (de ex., piele de broască și piele de șopârlă). Xenogrefele porcine astăzi sunt cel mai frecvent utilizate [11, 12].

**Alogrefele** sunt grefe transplantate între indivizi genetic neidentici, dar care aparțin aceleiași specii. Cele mai multe alogrefe se obțin de la cadavru. Alogrefele se împart în trei categorii: epiteliale/epidermice, dermice și complexe (dermo-epidermice). În cadrul acestor trei categorii, acestea mai pot fi acelulare, celulare/vii sau mixte, celular-acelulare. Exemple – *AlloDerm*, *Graftjacket*, *Neofrom*, *Dermamatrix*, *ICX-SKIN*, *TransCyte*, *Dermagraft*, *Apligraf*, *Orcelare*, *Apiligraf*, *OrCel*.

Alogrefele, sau țesuturile prelevate de la un donator viu sau decedat, și xenogrefele, obținute de la o altă specie, promovează procesul de reepitelizare și pregătesc patul leziunii pentru aplicarea autogrefei; la fel, cresc rata vindecării, comparativ cu pansamentele tradiționale [13]. O meta-analiză recentă a sugerat că dacă alogrefele și xenogrefele au aceeași eficiență, atunci xenogrefele par a fi o alegere superioară, pentru că au o siguranță mai mare și un preț redus [14]. Cu toate acestea, concluziile generale ale acestei meta-analize trebuie acceptate cu precauție, deoarece studiile citate nu sunt standardizate, iar detaliile critice, cum ar fi adâncimea și dimensiunea de arsură, au fost trecute cu vederea. O alogrefă de la cadavru este,

circumstances when standard therapies are not desirable. Although there is no single perfect skin substitute, certain characteristics can be considered when evaluating alternatives.

#### **Skin substitute general characteristics**

- the substitute should be easy to prepare and apply without intensive training. Flexibility of thickness allows the product to be tailored to every type of wound;
- the product should be able to withstand a hypoxic wound bed and have a degree of resistance to infection in order to allow relatively ischemic tissues to be candidates for application;
- the ideal skin substitute should have resistance to tensile forces and provide permanent and long term wound stability;
- it should reproduce both components of the skin (epidermis and dermis) and provide no antigenicity that could compromise the graft or host or present difficulties with future applications [10];
- because no single product meets all these criteria, each patient case requires careful evaluation before choosing the appropriate treatment.

#### **Skin substitute's classification**

Skin substitutes are primarily categorized by the type of tissue used for grafting. Products are broadly classified as *xenografts*, *allografts*, and *autografts*. There can be some overlap among categories when an individual product contains both animal and synthetic components or both human and animal components.

**Xenografts** are tissues transplanted from one species onto another species, used as a temporary graft (e.g., frog skin and lizard skin). Porcine products are the most commonly used xenografts today [11, 12].

**Allografts** are grafts transplanted between genetically non-identical individuals of the same species. Most human skin substitute allografts come from cadaveric sources. Allografts fall into three categories: epithelial/epidermal, dermal, and composite (epidermal and dermal). Within these three categories, they may be acellular, cellular/living, or cellular/non-living. Examples – *AlloDerm*, *Graftjacket*, *Neo-from*, *Dermamatrix*, *ICX-SKIN*, *TransCyte*, *Dermagraft*, *Apligraf*, *Orcelare*, *Apiligraf*, *OrCel*.

Allografts, or tissue taken from a living or deceased human donor, and xenografts, taken from a different species, promote re-epithelialization and prepare the wound bed for autograft, increasing the healing rate when compared with traditional dressings [13]. A recent meta-analysis suggested that since allografts and xenografts appear to be equally effective, xenografts may be a superior choice for their increased safety and reduced price [14]. However, caution should be exercised in drawing broad conclusions from this meta-analysis because the cited studies lack standardization and critical details such as depth and size of burn, and many studies cited were merely anecdotal. A cadaver allograft is thus widely considered the best material for temporary closure of excised wounds in patients with extensive, life-threatening burns and inadequate donor sites.

așadar, considerată cel mai bun material pentru închiderea temporară a rănilor incizate la pacienții cu arsuri extinse, care pun în pericol viața, în lipsa zonelor adecvate donatoare.

**Autogrefele** sunt țesuturi grefate într-o nouă poziție, pe același individ. Ele sunt, de obicei, împărțite în trei categorii principale [15]:

- grefe de grosime parțială, care conțin epidermul și o parte a stratului dermal superior;
- grefe de grosime totală, care conțin atât epidermul, cât și dermul [16]. Aceste tipuri de grefe sunt preferate în zonele, în care cicatricile voluminoase sau contractura grefelor ar altera funcția regiunii și rezultatul cosmetic ar fi inestetic. Ele sunt, de obicei, rezervate pentru reconstruirea rănilor capului, gâtului, mâinilor și organelor genitale;
- substituenții de piele autologică de cultură, la care, mai frecvent, se referă doar autogrefele epidermice de cultură (CEA). Această nomenclatură include grefele epidermice și exclude grefele dermo-epidermice. *Epicel* și *Laserskin* sunt, la moment, două produse disponibile din această categorie [17, 18]. Substituenții de piele de cultură sunt CEA cu adăugarea unui strat dermic autolog de cultură; în rezultat, se obține un substituent de piele cu structură anatomică mai corectă. Acest produs este, deocamdată, în faza studiilor clinice, dar, în prezent, este cel mai avansat substituent autolog de piele din cele disponibile. Produsul este creat prin cultivarea fibroblastelor și keratinocitelor autologice pe o matrice din colagen și glicozaminoglicani [19, 20].

**Substituenții de piele sintetici** sunt compuși din materiale non-biologice. Avantajele sunt că acestea pot fi sintetizate la cerere fără a fi nevoie de țesut biologic și permit un control mai mare asupra componentelor sale. În plus, produsele pot fi modificate prin adăugarea diferitor factori de creștere și nu prezintă risc de transmitere a bolilor [21].

**Substituenții de piele** mai pot fi clasificați, în funcție de componența celulară, în trei grupe mari: *epidermali*, care conțin predominant keratocite epidermale; *dermali*, care conțin predominant fibroblaste; și de *tip mixt* [22].

**Substituenții biologici de piele** sunt clasificați, în funcție de scopul utilizării, în două grupe mari: materiale pentru acoperirea plăgii și pentru închiderea acesteia [7].

- **închiderea temporară a plăgii** poate fi realizată cu ajutorul alogrefelor cadaverice. Imunosupresia patologică, observată în stadiile precoce după o arsură gravă, protejează alogrefele de desprindere în timpul acestei perioade. Materialul cadaveric este asigurat de băncile de piele, unde se păstrează la temperaturi joase. Examinarea atentă a donatorilor potențiali are drept scop reducerea riscului de transmitere a agenților infecțioși, însă, din păcate, acest risc nu poate fi redus la zero. Toate materialele biologice posedă un potențial de transmitere a maladiilor, iar producerea și proveniența materiilor prime sunt esențiale pentru calitatea structurilor bioingineresti obținute și se află sub un control strict în Europa și America de Nord [23, 24].
- **închiderea permanentă a plăgii** se bazează pe grefa epi-

**Autografts** are tissues grafted to a new position on the same individual. They are commonly divided into three main categories [15]:

- *split-thickness skin grafts* (STSGs) which contain the epidermis and a variable thickness of the upper layers of dermis;
- *full-thickness skin grafts* (FTSGs) which contain the epidermis and the entire dermis [16]. These types of grafts are preferred in areas where significant scarring or contracture of the grafts would provide harmful esthetic or functional consequences. They are usually reserved for reconstructing wounds of the head, neck, hands, and genitals;
- *cultured autologous skin substitutes* which are frequently referred to as cultured epidermal autografts (CEAs). This nomenclature includes epidermal grafts and excludes dermal/epidermal grafts. *Epicel* and *Laserskin* are among the currently available products [17, 18]. Cultured skin substitute (CASS) is a CEA with the addition of a cultured autologous dermal layer, making it a more anatomically correct skin substitute. This product is still in clinical trials but in present it represents the most advanced autologous skin substitute available. The product is created by culturing autologous fibroblast and keratinocytes with collagen and glycosaminoglycan substrates [19, 20].

**Synthetic skin substitutes** are comprised of non-biologic materials. Advantages are that they can be synthesized on demand without need for biologic tissue and there is greater control over scaffold components. Additionally, the products can be modified for specific use by adding different growth factors and do not carry a risk for disease transmission [21].

**Cellular skin substitutes** may be categorized according to whether they consist of epidermis constructed mainly from epidermal keratinocytes, dermis constructed mainly of fibroblasts, or both [22].

**Biological skin substitutes** can be classified in two groups: covering material and material for wound closure [7].

- **temporary wound closure** can be achieved by cadaveric allograft use. Pathologically immunosuppression observed during the early stages after a severe burn prevents allograft detachment. Cadaveric material is provided by skin banks where it is kept at low temperatures. Examination of potential donors is necessary for reducing the risk of infectious agents transmitting, but, unfortunately, this risk can't be reduced to zero. The potential of transmission of a disease is an important factor which influences the development of skin substitutes. All the biological materials possess a potential transmission of diseases. The manufacturing process and the origin of raw materials are under strict control in Europe and North America because they influence essentially the quality of obtained structures [23, 24].
- **permanent wound closure** is based on use of an epidermal graft applied over the integrated allodermis. It can be a skin autologous graft or a skin substitute which

dermică, aplicată peste aloderma integrată. Aceasta poate fi o grefă de piele proprie, sau să provină dintr-un substituent de piele, bazat pe includerea în componența sa a celulelor epidermice. Substituenții de piele conțin un amestec de componente de proveniență biologică și substanțe non-biologice – polimeri sintetici. Pansamentele disponibile, totalmente non-biologice: *Opsite (Smith & Nephew Inc.)*, *Duoderm (ConvaTech Inc.)* sunt ocluzive, produc un mediu umed și contribuie la o vindecare mai rapidă, deși pot contribui și la proliferarea microorganismelor sub suprafețele lor [25, 26].

#### **Substituenții de piele pentru acoperirea plăgii**

Membranele biologice pentru acoperirea plăgii reprezintă atât materiale sintetice cât și produse neprelucrate, provenite din piele, cum ar fi homogrefele sau alogrefele cadaverice. Substituenții temporari de piele trebuie să asigure închiderea temporară a plăgii, să ajute în controlul durerii, să absoarbă exudatul din plagă, să prevină uscarea (deshidratarea plăgii). Substituenții temporari sunt utilizați în calitate de pansament al zonei; ei asigură închiderea temporară (fiziologică) a plăgilor profunde (arsuri parțial profunde sau totale) după excizie, protejează mecanic plaga, asigură protecția antimicrobiană, mențin un mediu umed în plagă, cu o densitate redusă a germinilor.

**BioBran** (*Bertek Pharmaceuticals, SUA*) reprezintă o membrană bilamelară ce constă dintr-o rețea de nailon aderentă de un strat subțire de silicon semipermeabil. Rețeaua de nailon este acoperită cu peptide derivate din colagenul de tip I, pentru a favoriza aderarea la patul plăgii și integrarea fibrovasculară. *BioBran* asigură o barieră față de evaporare și invazia microbiană, permite controlul durerii pe toată perioada vindecării plăgii [27]. Odată ce plaga se vindecă, *BioBran* se detașează și poate fi cojit cu ușurință de pe suprafață. Este recomandat pentru a fi utilizat în zonele donatoare și în arsurile superficiale cu afectarea parțială a pielii, în primele 6 ore de la traumatism, întrucât are un efect mai bun pe plăgile „curate”. *BioBran* mai este utilizat și ca acoperire temporară pentru plăgile proaspete, după excizia pielii în toată grosimea [28].

**TransCyte** (*Advanced Tissue Sciences Inc., SUA*) este constituit dintr-o rețea de nailon, învelită cu fibroblaste neonatale, care îmbunătățesc semnificativ proprietățile ei curative. Întrucât nailonul nu este biodegradabil, acest material nu poate fi folosit ca un substituent dermic. Fibroblastele neonatale din interiorul stratului biologic sunt lăsate să prolifereze o perioadă de 17 zile, timp în care ele produc fibronectină, colagen de tip I, proteoglicani și factori de creștere. Ulterior, materialul se congelează la  $-70^{\circ}\text{C}$ ; în rezultat, se stopează activitatea metabolică a fibroblastelor. Materialul se păstrează la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  în cartușe speciale.

**TranCyte** este indicat pentru acoperirea temporară a defectelor tegumentare la pacienți după debridare chirurgicală de piele integră, sau la pacienți cu arsuri de adâncime parțială, care necesită o astfel de acoperire, înainte de aplicarea autogrefelor. *TranCyte*, la fel, este indicat pentru tratamentul arsurilor intermediare sau cu afectarea parțială a dermului, care, de obicei, necesită debridare și care au potențialul de a se vindeca fără autogrefare. *TranCyte* este contraindicat pacienților

contain epidermal cells. The skin substituents contain a mixture of components of biological and non-biological origin (synthetic polymers). Available completely non-biological materials like *Opsite (Smith & Nephew Inc.)*, *Duoderm (ConvaTech Inc.)* are occlusive, produce a moist environment and ensure faster wound healing, although they may contribute to the microorganisms proliferation under their surfaces [25, 26].

#### **Skin substitutes used for wound coverage**

Biological membranes used for wound coverage have different origin: synthetic materials or unprocessed skin products as autografts or cadaveric allografts. The temporary skin substituents should ensure the temporary wound closure, help in pain control, absorb exudate from the wound, and prevent drying (desiccation injury). They are used as dressing material, ensure the temporary (physiological) closure of thickness wounds (partially burns or totally deep) after excision, protect the wound mechanically, provide antimicrobial protection, maintain a moist environment with a low germs' density.

**BioBran** (*Bertek Pharmaceuticals, USA*) is a by-layer membrane which consists of a nylon network adhered to a thin layer of semipermeable silicon. The nylon network is coated with peptides derived from collagen type I. It promotes membranes' adherence to the wound bed and fibrovascular integration. *BioBran* ensures a barrier for evaporation and microbial invasion, allows pain control for the whole period of wound healing [27]. Once the wound heals, *BioBran* detaches and can be peeled easily from the skin surface. It is recommended for donor sites coverage and in superficial burns with partial skin damage during the first 6 hours after injury, because it has a better effect on “clean” wound. *BioBran* is also used as a temporary coverage of fresh wounds after full thickness skin excision [28].

**TransCyte** (*Advanced Tissue Sciences Inc., USA*) is a nylon network wrapped with neonatal fibroblasts which improve its curative properties. Because nylon is not biodegradable, this material cannot be used as a dermal substitute. Neonatal fibroblasts within the biological layer proliferate during 17 days and produce fibronectin, collagen type I, proteoglycans and growth factors. Then the material is frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ , it stops the metabolic activity of fibroblasts. The material is stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in special cartridges.

**TranCyte** is indicated for use as a temporary wound covering for surgically excised full-thickness and deep partial-thickness thermal burn wounds in patients who require such a covering prior to autograft placement. *TranCyte* is also indicated for the treatment of mid-dermal to intermediate depth burn wounds that typically require debridement and that may be expected to heal without autografting. *TranCyte* is contraindicated in those patients with known hypersensitivity to porcine dermal collagen or bovine serum albumin. *TranCyte* advantages are: bilayer analogy, excellent adherence to a superficial to mid-dermal burn, decreases pain, provides bioactive dermal components, maintains flexibility, good outer

cu hipersensibilitate la colagenul dermal porcine sau la albumina din serul bovin. Avantajele *TransCyte* sunt: analog bistratificat, aderență excelentă în cazul arsurilor de diferite profunzime, scade intensitatea durerii (efect analgezic), furnizează componente dermale bioactive, posedă flexibilitate și funcție de barieră mecanică bună. Dezavantajele sunt: trebuie păstrat congelat până la utilizare, prețul relativ înalt [27]. Falanga V. *et al.* (1998), au realizat un studiu clinic, unde au comparat utilizarea alogrefei de piele crioprezervate cu *TransCyte* în calitate de analog dermic temporar. Rezultatele au dovedit că aderența și priza au fost, cel puțin, la fel de bune la utilizarea *TransCyte*, în comparație cu alogrefa. Studiul histologic comparativ dintre *TransCyte* și alogrefă în plăgile postcombustionale, a demonstrat doar o singură diferență semnificativă – o dezvoltare mai amplă a țesutului de granulație în plăgile tratate cu alogrefe. Rolul principal al *TransCyte* este tratamentul arsurilor parțiale – acesta aderă rapid la suprafața viabilă a plăgii, stimulând epitelizarea. Dat fiind faptul că *TransCyte* costă de 16 ori mai scump decât *BioBrane* și necesită păstrare la temperaturi joase, ar fi binevenit un studiu clinic care ar compara *TransCyte* cu *BioBrane* [29].

**Apligraf**, echivalent al pielii umane (*Organogenesis Inc., Novartis Pharmaceuticals Corporation, SUA*), este produs prin combinarea unui strat de gel de colagen bovin de tip I, ce conține fibroblaste alogene neonatale vii, acoperite cu un strat epidemic cornificat din keratinocite alogene neonatale. Din cauza că include două tipuri de celule diferite, acesta e cel mai sofisticat produs tisular artificial cunoscut și este disponibil pe piață în formă gata pentru întrebuințare, are o perioadă de valabilitate de 5 zile [30]. *Apligraf* promovează procesul de vindecare prin furnizarea a mai mult de 40 de citokine și factori de creștere. La aplicarea lui, închiderea defectului are loc de 2-3 ori mai rapid decât în cazul recurgerii la metode convenționale. Răspunsul imun la aplicarea *Apligraf* nu se dezvoltă, deoarece acesta nu conține celule prezentatoare de antigen. *Apligraf* este unicul produs bistratificat, comercial disponibil, ce conține celule cultivate prin bioinginerie, aprobat de FDA (în 1998) [31]. Este indicat, de rând cu compresele terapeutice standard, pentru tratamentul ulcerelor venoase non-infectate, la pacienții cu insuficiență venoasă cu durata mai mare de o lună, care nu răspund la tratamentul convențional. *Apligraf* este, la fel, indicat pacienților cu picior diabetic pentru tratamentul ulcerelor neuropatice, care persistă mai mult de 3 săptămâni, atunci când sunt prezente leziuni ale dermei, dar care nu implică tendonul, mușchii, capsula articulară sau osul, și nu răspund la mijloacele convenționale de îngrijire. *Apligraf* este contraindicat în cazul ulcerelor infectate, la pacienții alergici la colagenul bovin, sau la cei hipersensibilizați la agaroză, care intră în componența mediului de transport [23].

Într-un studiu prospectiv, randomizat, s-a dovedit că, la un număr semnificativ mai mare de pacienți, s-a reușit închiderea completă a plăgii în grupul tratat cu *Apligraf*, decât în grupul de control, în care nu s-a utilizat *Apligraf*. Nu au fost observate semne clinice de detașare, deși s-au observat semne de vindecare *per secundam intentionem* la o jumătate din grupul de studiu. Aceste date au fost confirmate de Sabolinski *et al.* și Eaglestein *et al.* Nu există, deocamdată, rapoarte care să com-

barrier function; as disadvantages, could be noted the need to store frozen till use, and relatively expensive [27]. Falanga V. *et al.* (1998) performed a clinical trial by which they compared the use of cryopreserved skin allograft with *TransCyte* as temporary dermal analog. The results showed that the adhesion and outlet were good in both cases. Histological examination demonstrated just one significant difference when *TranCyte* and skin allograft were used for burn wounds treatment – a broader development of granulation tissue in the second case. The main role of *TranCyte* is the treatment of partial wounds – it rapidly adheres to the viable surface of the wound and in this way stimulates epithelialization. Because *TransCyte* costs 16 times more expensive than *BioBran*, and requires storage at low temperature, it's necessary to perform a clinical trial to compare *TransCyte vs. BioBran* [29].

**Apligraf**, human skin equivalent (*Organogenesis Inc., Novartis Pharmaceuticals Corporation, USA*), is produced by combination of a gel of bovine collagen type I which contain allogeneic neonatal fibroblasts with a cornified epidemic layer of allogeneic neonatal keratinocytes. Because it consist of two different cell types, this is the most sophisticated artificial tissue product and it is available in a ready to use form with a shelf life for five days [30]. *Apligraf* promotes healing by supplying over 40 cytokines and growth factors. It closes chronic wounds 2 to 3 times faster than conventional wound care. There is no immune response to *Apligraf* because it does not contain any antigen-presenting cells. *Apligraf* is the only commercially available bi-layered bio-engineered cell therapy approved by the FDA in 1998 [31], indicated for use with standard therapeutic compression for the treatment of non-infected partial and full-thickness skin ulcers, due to venous insufficiency of greater than 1 month duration, and which have not adequately responded to conventional ulcer therapy. *Apligraf* is also indicated for use with standard diabetic foot ulcer care for the treatment of full-thickness neuropathic diabetic foot ulcers of greater than three weeks duration which have not adequately responded to conventional ulcer therapy and which extend through the dermis but without tendon, muscle, and capsule or bone exposure. *Apligraf* is contraindicated for use on clinically infected wounds, in patients with known allergy to bovine collagen, in patients with a known hypersensitivity to the components of the *Apligraf* agarose shipping medium [32].

A prospective randomized study proved that in a significantly higher number of patients treated with *Apligraf* complete wound closure obtained was better than in the control group (non-treated with *Apligraf*). Detachment signs were not observed, although some signs of healing by secondary intend were determined in the half of the group. These data were confirmed by Sabolinski *et al.* and Eaglestein *et al.* As there are no any reports for clinical comparison of *Apligraf* with epidermal cell culture and *Dermagraft* yet. *Apligraf* has a great potential to bring cosmetic and functional amelioration after apply it on fenestrated medium-thickness allografts, but pigmentation, elasticity and skin graft vascularization are significantly

pare clinic *Apligraf*-ul cu *Dermagraft*-ul sau culturile de celule epidermale. Potențialul *Apligraf*-ului de a aduce ameliorări cosmetice și funcționale după aplicarea pe alogrefe fenestrate de grosime medie este evident, însă pigmentarea, elasticitatea și vascularizarea grefei de piele, tratată cu *Apligraf*, este semnificativ mai mare decât în cazurile tratate obișnuit [30].

***Dermagraft*** (*Advanced Tissue Sciences Inc.*, SUA) reprezintă o structură dermică vie, crioprezervată, obținută prin cultivarea fibroblastelor alogene neonatale pe o structură de polimer: acid poliglicolic sau Poliglactin-910, cu denumire comercială de *Dexon* sau *Vicryl*. Fibroblastele devin confluențe în interiorul rețelei de polimer, secretând factori de creștere și proteine matriciale dermice – colagen, tenascină, vitronectină și glicozaminglicani, creând, astfel, o structură dermică vie. Ea rămâne viabilă și metabolic activă după aplicarea pe plagă, în pofida crioprezervării [33]. În SUA, *Dermagraft*-ul este aprobat pentru tratamentul ulcerelor venoase cronice ale membrelor inferioare, precum și utilizat într-o varietate de alte cazuri, pentru a facilita vindecarea defectelor tegumentare [34]. *Dermagraft*-ul îmbunătățește procesul vindecării prin stimularea creșterii țesutului fibrovascular și reepitelizării de la marginile plăgii. Deși *Dermagraft* nu a fost utilizat pe larg în tratamentul arsurilor, el a fost utilizat sub grefele fenestrate de piele despicată, pe plăgi cauzate de arsuri profunde. Acesta poate reprezenta o soluție utilă pentru substituirea țesutului dermic pierdut, însă studiile clinice au semnalat reacții imunologice împotriva fibroblaștilor [27].

#### **Substituenți de piele pentru închiderea plăgii**

***AlloDerm*** (*LifeCell*, SUA) este pe larg utilizat în clinică din 1995 [35]. Acesta reprezintă pielea umană de cadavru, prelucrată, de pe care s-a înlăturat epiderma și s-au extras componentele celulare ale dermei înainte de crioprezervare, pentru a evita riscul dezvoltării răspunsului imun specific sau inflamației [36]. Tot ceea ce rămâne este o rețea de colagen. Corpul recunoaște matrixul intact drept un material biologic inert, care oferă pielii un grad mai înalt de rezistență. *AlloDerm* este considerat un material cu grad minim de prelucrare, iar după structură, acesta nu diferă mult de pielea naturală și, conform clasificării FDA, este inclus în categoria "banked human tissue" (țesuturi umane, ce pot fi stocate în bancă) [37]. După ce se aplică pe patul vascular, acesta devine repopulat de celulele gazdei, revascularizat și incorporat în țesut. Inițial, *AlloDerm* a fost folosit în calitate de substituent tegumentar la pacienții cu arsuri. În scurt timp, avantajele acestui produs în înlocuirea sau repararea țesutului dermic lezat sau inadecvat, au fost pe larg apreciate și *AlloDerm* se aplică, deja, în mai multe domenii medicale: chirurgie plastică și reconstructivă, dermatochirurgie, urologie, ortopedie, stomatologie. Din 1992, *AlloDerm* a fost aplicat la mai mult de 30.000 de pacienți. Avantajele *AlloDerm*-ului sunt: (1) este singurul substituent biologic de piele, care poate să stimuleze regenerarea țesutului normal; (2) fiind un țesut uman, nu poate conduce la declanșarea răspunsului inflamator sau al unei reacții alergice; (3) este moale și pliant; (4) nu este necesar de a preleva țesut de pe o altă zonă a corpului; (5) este nevoie de un strat foarte subțire, atunci când este utilizat în calitate de grefă de suprafață [35, 38]. Există publicații, care comunică rate bune de integrare și

higher than in ordinary cases [30].

***Dermagraft*** (*Advanced Tissue Sciences Inc.*, USA) represents a living cryopreserved dermal structure, obtained by allogeneic neonatal fibroblasts cultivation on a polymeric structure: polyglycolic acid or Polyglactin-910 (the trade name – *Dexon* or *Vicryl*). Fibroblasts become confluent inside the polymer network and secrete growth factors and dermal matrix proteins – collagen, tenascin, vitronectin and glycosaminoglycan. In this way, a living dermal structure is obtained. Despite cryopreservation, it remains viable and metabolically active after application to the wound [33]. *Dermagraft* has been approved for marketing in the United States for treatment of venous leg ulcers (VLUs) and has been clinically used in a variety of other indications to stimulate wound healing [34]. *Dermagraft* facilitates wound healing by stimulating the growth of fibrovascular tissue from the wound bed and reepithelization from the wound margins. Although *Dermagraft* was not widely used in burns' treatment, it was used as fenestrated split graft in wounds caused by deep burns. It can be a useful solution for replacing lost dermal tissue, but clinical trials determined immunological reactions against fibroblasts [27].

#### ***Skin substitutes used for wound closure***

***AlloDerm*** (*LifeCell*, USA) is used in various applications since 1995 [35]. It is processed human cadaveric skin, in which epidermis is removed, the cellular dermis components are removed too prior to cryopreservation in order to prevent specific immune response or inflammation [36]. All that remains is a collagen framework. Body recognizes the intact matrix as a biologically inert material which provides strength to the skin. *AlloDerm* is regarded as minimally processed, is not significantly changed in structure from the natural tissue so the FDA has classified it as banked human tissue [37]. Once it is applied to the wound bed, it is repopulated by host cells, revascularised and incorporated into the tissue. Initially, *AlloDerm* was used as a skin replacement for burn patients. Quickly, plastic surgeons, urologists, orthopedic surgeons, dentists worldwide recognized the benefits provided by this natural soft tissue replacement when used as an implant to repair or replace damaged or inadequate dermal tissue. Since 1992, *AlloDerm* has been used in more than 30,000 patients. *AlloDerm* advantages are: (1) it is the only skin substituent capable for normal tissue regenerating; (2) since it is human tissue, it cannot provoke any inflammatory response or allergic reaction; (3) it is a soft, pliable implant with a natural feel; (4) there is no need to harvest tissue from another site on your body; and (5) it requires a very thin layer when used as a surface graft [35, 38]. Published data show good rates of integration and reduction of the following cicatrization in total deep wounds, allowing covering with free skin ultra-thin split grafts during a single intervention. In a multicentric study on 67 patients with total or partial deep burns, the wounds were excised and closed either with *AlloDerm* and split skin graft or with split skin graft only. In the last case *AlloDerm* was just perforated and wasn't stretched, in this way the cellular elements were



de reducere a cicatrizării ulterioare ale plăgilor profunde totale, permițând acoperirea cu grefă de piele liberă, despicată ultra-subțire, în timpul unei singure intervenții. Într-un studiu multicentric, efectuat pe 67 de pacienți cu arsuri profunde totale sau profunde parțiale, plăgile se excizau și se închideau fie cu *AlloDerm* și grefă de piele despicată, fie doar cu grefă de piele despicată. În ultimul caz, *AlloDerm* se fenestra, dar nu se întindea; în așa mod, elementele celulare pot fi alimentate cu serul care pătrunde prin orificii. Evaluarea plăgii la distanță a demonstrat că autogrefele cu *AlloDerm* erau echivalente autogrefelor de piele integrală. Lattari *et al.*, au raportat trei cazuri de utilizare a *AlloDerm*, în asociere cu grefe de piele despicată ultra-subțire, fenestrată (0,15-0,20 mm, fenestrate 1,5:1), care au fost aplicate pe suprafața dorsală a trei mâini și a unei glezne. Autorii au raportat despre o recuperare rapidă, fără deficit rezidual. Această abordare este similară celei care se referă la utilizarea *Dermagraft*-ului [36].

**Integra** (*Integra Life Science Corporation, SUA*) este cel mai utilizat substituent de piele în arsuri și a fost descris pentru prima dată de Yannas *et al.* (1981). *Integra* are o structură bilamelară, care constă din colagen bovin și glicozaminglican, acoperite, de o parte, cu o membrană de silicon, care asigură funcția epidermei. Dimensiunea porilor a fost concepută între 70 și 200  $\mu\text{m}$ , pentru a permite migrarea propriilor celule endoteliale și fibroblastelor. Porii mai mici întârzie sau chiar previn biointegrarea, în timp ce porii mai mari conferă o suprafață de atașare insuficientă pentru celulele migrante ale gazdei. După aplicarea pe o plagă proaspăt excizată, stratul de colagen se biointegrează cu plaga pentru a forma un „neoderm” vascular – proces, care durează aproximativ 3-6 săptămâni. Odată ce acest stadiu a fost depășit, stratul de silicon poate fi înlăturat și se poate aplica o grefă de piele despicată ultra-subțire [39, 40]. Până în prezent, probleme imunologice semnificative (de respingere) ale produsului nu au fost semnalate. Indicația de elecție o reprezintă tratamentul plăgilor postexcizionale ale arsurilor de gradul III și IV. Avantajele *Integra* sunt: (1) este superior substituenților tegumentari monostratificați; (2) rezultatul estetic în timp este mult mai bun; (3) este disponibil imediat și în orice cantități; (4) permite amânarea autogrefării până în momentul, în care se pot obține autogrefele; (5) *Integra* poate rămâne la nivelul plăgii până la aproximativ 2 luni, fără a forța, astfel, aplicarea imediată a autogrefelor; (6) funcționează ca un suport biorezorbabil, potențând creșterea neodermului (asemănător cu cel normal); (7) ridicarea stratului siliconic (extern) este atraumatică, neimplicând excizia chirurgicală; și (8) permite aplicarea de grefe foarte subțiri, ușurând, astfel, vindecarea zonei donatoare și permițând eventual o nouă recoltare din aceeași zonă [8]. Există și unele dezavantaje în utilizarea acestui produs – este relativ scump în comparație cu alogrefele de piele cadaverică din băncile de țesuturi [39, 40]. Utilizarea *Integra* impune o intervenție în două etape, cu un interval minimal de 3 săptămâni între aplicare și grefarea cu piele despicată, pentru a forma neodermă. În anumite cazuri, acest fapt poate crește perioada de timp necesară vindecării plăgii. Dacă *Integra* ar putea fi utilizată în combinație cu culturi de celule epidermale autologice, atunci o întârziere de 3 săptămâni ar putea fi avantajoasă.

supplied with serum that penetrated through the holes. The assessment demonstrates that autografts with *AlloDerm* are equivalent to natural skin autografts. Lattari *et al.*, reported three cases of use of *AlloDerm* in association with split skin ultra-thin graft (0.20 to 0.15 mm, perforated 1.5:1). They were applied to the dorsal surface of the three hands and one ankle. The authors reported a rapid recovery without residual deficit. This approach is similar to that which refers to the use of *Dermagraft* [36].

**Integra** (*Integra Life Science Corporation, USA*) is a widely used as a skin substitute in burn patients. For the first time it was described by Yannas *et al.* (1981). *Integra* is a by-layer structure which consists of bovine collagen and glycosaminoglycan coated with a silicone membrane on the side, which execute the epidermis function. The pore size is between 70 and 200  $\mu\text{m}$ . They enable fibroblasts and endothelial cells migration. Smaller pores delay or even prevent biointegration, while the larger pores determine insufficient attachment surface for the migrated host cell. After applying on a fresh excised wound the collagen layer integrates in the wound and form a vascular “neoderm”. This process takes about 3-6 weeks. Once this stage is passed, the silicone layer can be removed and a skin split ultra-thin graft can be applied [39, 40]. Significant immunological problems (rejection) of the product are reported. The indication for *Integra* use is treatment of post-excised wounds of third and fourth degree burns. *Integra* advantages are: (1) is better than monolayer skin substituents; (2) gives better aesthetic result in time; (3) is immediately available and in any quantity; (4) allows autografting delay until autografts can be obtained; (5) *Integra* remains in the wound approximately for 2 months and don't force immediate autograft application; (6) acts as a bio-resorbable support and stimulates the neoderm growth (like that normal); (7) silicone layer (the external one) elevation is atraumatic and doesn't involve surgical excision; and, (8) allows very thin grafts application, facilitating the healing of the donor site and allowing a new harvest from the same area if it is necessary [8]. There are some disadvantages of using this product – it's relatively expensive in comparison to cadaverous skin allograft from tissue banks [39, 40]. Using *Integra* is required intervention in two stages, with a minim interval of 3 weeks between application and split skin grafting necessary for neoderm formation. In some cases this may increase the time necessary for wound healing. If *Integra* could be used in combination with autologous epidermal cells, a three weeks delay can be advantageous.

A recent study, made on a porcine model, shows successful integration of autologous epithelial cells on the material type *Integra* already applied on the wound. Subsequent histological examination showed a nearly complete confluence of epidermal autologous cells in the seventh day, while in the control group, the autologous epidermal cells applied on the fresh excised wounds did not integrate. Current research are focused on collagen-glycosaminoglycan matrix modification by additional incorporation in structure of peptides and antibiotics.

Într-un studiu recent, pe un model porcin, s-a demonstrat integrarea reușită a culturilor de celule epiteliale autologice pe material de tip *Integra*, deja aplicat pe plagă. Examinările histologice ulterioare au demonstrat o confluență aproape completă a culturilor de celule epidermale autologice la 7 zile, în timp ce, în grupul martor, când culturile de celule epidermale autologice au fost aplicate pe plăgi proaspăt excizate pe toată grosimea pielii, acestea nu s-au integrat. Cercetările curente se concentrează pe modificarea matricei de colagen-glicozaminoglicani prin incorporarea suplimentară în structură a peptidelor și antibioticilor. *Integra* poate fi folosită drept suport pentru cultivarea keratinocitelor autologice. Culturile de keratinocite autologice au demonstrat că au capacitatea de a forma un strat epitelial după ce se plasează pe *Integra*, cu grefare ulterioară. Materialul de însămânțare a dovedit o aderență bună pe plagă, vindecare completă, cu contracție minoră a plăgii, având potențialul de a restabili pielea umană elastică, funcțională și cu rezultate durabile.

#### **Substituenți epidermali**

Substituenții epidermali autologici sau alojeni constau, în cea mai mare parte, din keratinocite epidermale. Descoperirea lor se datorează cercetărilor efectuate de Rheinwald și Green (1975), care au obținut, pentru prima dată, culturi epiteliale monostrat matrice sintetice de susținere. Însă celulele obținute după metoda propusă de Rheinwald și Green se diferențiau rapid în cadrul cultivării, făcând imposibilă obținerea numărului suficient de celule. Pricipiul acestei metode constă în co-cultivarea keratinocitelor umane cu fibroblastele murine 3T3, subletal iradiate. Celulele 3T3 servesc în calitate de strat de suport (sau, *feeder*) pentru keratinocite, rămânând viabile, dar incapabile de a se multiplica după iradiere. Aplicarea mitomicinei C poate servi drept alternativă iradierii pentru stoparea multiplicării celulelor 3T3. În orice caz, fibroblastele murine rămân metabolic active și produc factori esențiali pentru multiplicarea și creșterea keratinocitelor, însămânțate pe suprafața lor. Acest proces, de la începerea cultivării și până la aplicarea stratului de keratinocite la pacient, durează aproximativ 3-4 săptămâni [41].

Avantajele substituenților epidermali sunt: funcționează ca acoperire permanentă și nu dezvoltă reacție de respingere. Dezavantajele substituenților epidermali sunt: (1) prezintă instabilitate mecanică (fragilitate) prin structura monostrat (lipsită de suportul dermic), manevrare dificilă; (2) prezintă dificultăți în utilizare, în cazul leziunilor tegumentare profunde, cu distrugerea completă a stratului dermal; (3) necesită mult timp pentru obținerea numărului suficient de celule; (4) flictenizează cu ușurință; (5) retracții importante; (6) rezultat estetic precar; (7) au un cost ridicat; (8) aplicarea lor pe analogi dermali sintetici nu și-a demonstrat eficiența [8, 42].

#### **Culturi de keratinocite autogene**

Tehnologia creșterii keratinocitelor a fost pusă la punct acum 30 de ani. Foițele confluențe de keratinocite pot fi crescute *in vitro* și aplicate, apoi, pe defecte tegumentare generate de arsuri, ulcere cronice ale gambei, înlăturarea nevrozilor gigantice, epidermoliză buloasă, necroza scalpului la nou-născuți etc. Ca și în cazul grefelor de piele despicate, atașarea culturilor celulare epiteliale autogene depinde de patul recipient al plăgii, care trebuie să fie, de preferință, țesut granular tânăr

*Integra* can be used as a support for autologous keratinocytes cultivation. The autologous keratinocytes have the capacity to form an epithelial layer after placing on *Integra* with subsequent grafting. The material demonstrates a good adherence to the wound, complete wound healing with a minor contraction and has the potential to restore elastic, functional human skin with sustainable results.

#### **Epidermal substitutes**

Autologous and allogeneic cultured epidermis consist mainly of epidermal keratinocytes. Their discovery is due to research conducted by Rheinwald and Green (1975), who obtained for the first time an epithelial monolayer cultures on synthetic support. Prior to Rheinwald and Green's report, however, human epidermal keratinocytes had easily keratinized (undergone final differentiation) during culture, making it impossible to obtain sufficient cell proliferation. The principle of this method is based on co-cultivation of human keratinocytes with sublethally irradiated murine 3T3 fibroblasts. The 3T3 cells serve as a supporting (feeding) layer for the keratinocytes, remaining viable but unable to divide themselves post-irradiation (an alternative method involves stopping 3T3 cells dividing using mitomycin C). However, the metabolic activity of these mouse fibroblasts remains functional, yielding growth factors which are essential for the division and growth of keratinocytes seeded on top of them. This process takes approximately 3-4 weeks from the start of cultivation to the application of keratinocyte sheets to the patient [41].

Advantages of epidermal substitutes: act as a permanent coverage, and don't give rejection response. Disadvantages of epidermal substitutes are: (1) fragility and mechanical instability because they don't have a dermal support (monolayer structure) difficult handling; (2) problematical use in cases of deep skin damage for patients in whom the dermis has been completely destroyed; (3) time lag to obtain the needed amount; (4) easily formation of fluid-filled vesicles; (5) significant retractions; (6) uncertain aesthetic outcome; (7) high cost; (8) application on derma synthetic analogues is not an effective one [8, 42].

#### **Autologous keratinocytes cultures**

The keratinocyte cultivation is possible for 30 years. Confluent keratinocyte layer may be grown *in vitro* and then applied to the skin defects caused by burns, chronic leg ulcers, giant nevus removing, epidermolysis bullosa, scalp necrosis in new-borns etc. As in the case of split skin grafts, autologous epithelial cells attachment depends on the wound bed quality, which preferably should be fresh granulation tissue or muscle fascia and should not be chronic granulation tissue. Wound pre-grafting with an allograft will encourage the incorporation and ensure the presence of non-granular dermis bed consisting of autologous or allogenic dermis.

The films of keratinocytes are offered under the name *Epicel* (*Genzyme Tissue Repair Corporation, USA*) and can be obtained in well-equipped hospital and university laboratories.

sau fascie musculară, însă nu țesut granular cronic. Pregrefarea plăgii cu alogrefă va încuraja incorporarea și va asigura prezența unui pat dermic nongranular, format din dermă autogenă sau alogenă.

Peliculele constituite din keratinocite sunt oferite sub denumirea de *Epicel* (*Genzyme Tissue Repair Corporation, SUA*) și pot fi realizate în laboratoarele spitalelor și universităților bine echipate. Totuși, sunt scumpe, întrucât necesită multă muncă calificată și un bun control al calității; în plus, sunt necesare 3-5 săptămâni pentru a produce 1,8 cm<sup>2</sup> de pelicule confluențe de celule dintr-o biopsie de 2 cm<sup>2</sup>. Pentru a utiliza optimal foițele de autogrefă epitelială, este necesar un grad înalt de coordonare între sala de operații și laborator. Pentru a rezolva aceste probleme, s-a recurs la congelarea culturilor de keratinocite, atât în formă de suspensie, cât și de culturi de autogrefe epiteliale, ele rămânând viabile, deși eficiența de generare a coloniilor scade, după aceasta, cu circa 50%.

#### ***Keratinocite alogene cultivate***

În încercarea de a rezolva problema impusă de întârzierea creșterii keratinocitelor autologice confluențe pentru închiderea plăgii, a fost studiată utilizarea keratinocitelor alogene cultivate. După cultivare, keratinocitele nu exprimă antigeni MHC de clasa II. Ele nu stimulează limfocitele alogene. Expresia antigenilor MCH de clasa I este și ea atenuată de pasajul multiplu al celulelor și crioconservare. La aplicarea keratinocitelor non-diferențiate, straturile granulos și cornos nu sunt prezente. La a șasea zi după aplicare, celulele se diferențiază în straturi normale, însă joncțiunea dermo-epidermică nu este una stabilă. La a treia săptămână după grefare, apare membrana bazală cu hemidesmozomi. Pe parcursul săptămânilor 6-12, fibrele de ancoră (colagen de tip VII) sunt puține la număr și imature, deși papilele sunt prezente deja și sistemul de vascularizare este format.

În experiența clinică, nu se observă reacția de detașare acută, ce urmează în urma aplicării foiței de keratinocite. Totuși, probele cu cromosomul Y și ADN, au demonstrat că celulele alogene își păstrează viabilitatea mai puțin de 1 săptămână după aplicarea lor pe plăgile rezultate în urma exciziei tatuajelor sau a ulcerelor. Termenul crește până la 6 săptămâni, când se aplică pe zonele donatoare de grefă de piele despicată. Vindecarea mai bună după aplicarea keratinocitelor alogene este atribuită secreției factorilor de creștere și a citokinelor de către celule. Culturile de keratinocite alogene sunt privite, prin urmare, ca un material pentru acoperirea plăgii, întrucât singure nu pot să asigure închiderea plăgii. Utilizarea keratinocitelor alogene se consideră primordială în acoperirea plăgilor cronice deschise, precum ulcerul de gambă, sau pentru a accelera vindecarea zonelor donatoare.

Culturile de alogrefe epiteliale reprezintă niște foițe fragile. Ele trebuiesc separate de la vasul de cultură celulară cu ajutorul unei enzime proteolitice, înainte de aplicarea pe patul plăgii. Procedul induce contracție și proliferare ulterioară redusă. Epiteliul format este instabil, fapt ce conduce la apariția spontană a bulelor la mai multe luni după grefare, crescând, astfel, susceptibilitatea pentru infecții și contracturi. Histologic, fragilitatea foilor culturilor de alogrefe epiteliale poate fi produsă de imaturitatea joncțiunii dermo-epidermice, care

However, they are expensive because of the fact that their production requires skilled labour and good quality control; 3-5 weeks are required to produce 1.8 cm<sup>2</sup> of confluent cell film from a 2 cm<sup>2</sup> biopsy. A high degree of coordination between the operation theatre and laboratory is necessary for optimal epithelial autograft use. For solving this problem, the keratinocyte cultures are congealed, both in suspension and in culture of epithelial autografts. The cells remain viable, but the efficiency of colonies generation is reduced by about 50%.

#### ***Cultured allogeneic keratinocytes***

To obtain the confluent culture of autologous keratinocytes for wound closure is a long process that is why allogeneic cultured keratinocytes use is studied too. After cultivation keratinocytes do not express Ag (antigens) of MHC class II and do not stimulate allogeneic lymphocytes. Expression Ag of MHC class I is also attenuated by multiple passage and cells cryopreservation. When transplanted, keratinocytes are non-differentiated, the cornified and granular layers are not present. On the 6th day after grafting they differentiate into normal layers, but crosslinking increases are missing; 3 weeks after fragging the basal lamina with hemi-desmosomes is already present. During the first 6-12 weeks anchoring fibrils (collagen VII) are few in number and immature, although at this stage the ridges are present and the vascular organization is normal.

In clinical experience acute detachment reaction after keratinocytes' pellicle application is not observed. However, samples with chromosome Y and DNA demonstrated that allogeneic cells retain their viability less than 1 week after application to the wound resulting from tattoos or ulcers excision. The term increases to 6 weeks when keratinocytes are applied to the skin split graft donor sites. Progressively wound healing after allogeneic keratinocytes application is determined by secretion of growth factors and cytokines of these cells. Allogeneic keratinocyte cultures are seen as a material for wound coverage because they cannot provide wound closure alone. The use of allogeneic keratinocytes is essentially in chronic open wounds covering (as leg ulcers), or for accelerating donor sites healing.

Epithelial allografts represent some fragile films. Before application to the wound bed they should be detached from the cell culture dish with a proteolytic enzyme. This process produces shrinkage and low subsequent proliferation. Epithelium formed in this way is unstable and leads to spontaneous bubbles appearance several months after grafting, increases susceptibility to infections and contractures. Histologically, the fragility of epithelial allograft can be produced by dermo-epidermal junction immaturity, which lead to an inadequate anchorage. There is an abnormal wound healing area around the graft edges firmly seated and there is a healing type "brick wall" [43].

Several groups work in the direction of development of transportation systems for cultured keratinocytes which will reduce costs, will improve incorporation and the quality of the formed epidermis. Many of these transporting systems are not

duce la un ancoraj inadecvat. Apare o zonă de vindecare anormală, fermă, în jurul zonei de grefă [43].

Mai multe grupuri lucrează în sensul dezvoltării unor sisteme pentru transportarea culturilor de keratinocite autogene, în speranța că aceasta va reduce costurile și va ameliora incorporarea și calitatea epidermei rezultate. Multe dintre aceste soluții nu au fost utilizate pe larg pe subiecți umani. Transportul celulelor cultivate spre zona defectului se face prin aplicare directă sau cu utilizarea sistemelor de transport [44].

#### **Aplicare directă**

S-au realizat anumite succese, aplicând celulele împreună cu fibrină, în suspensie sau sub formă de membrană.

**Suspensia de fibrină.** Este o tehnică simplă, care permite grefarea la etape mai precoce, când celulele se află în stare proliferativă activă. După ce keratinocitele se fixează de plagă cu fibrină, vindecarea completă se produce în 14-21 de zile. Pe model animal (șobolani), prin utilizarea unei suspensii de clei de fibrină pe un pat dermic pregătit, s-au obținut un atașament și o regenerare bună și, în final, piele stabilă, cu calități mecanice bune.

**Foița de fibrină.** Culturi subconfluente de keratinocite pot fi crescute pe un strat de fibrină și, apoi, transferate în formă de plăcuțe pe plăgi. Așa metodă a fost folosită la trei pacienți cu plăgi profunde după excizie. S-a constatat că fibrina oferă o barieră satisfăcătoare în raport cu mediul înconjurător timp de 10 zile, astfel asigurând timpul necesar pentru proliferarea keratinocitelor până la confluență. Culturi de keratinocite autogene au fost aplicate și sub formă de spray de fibrină autogenă pe suprafața plăgii.

**Suspensii de celule pentru pulverizare.** Culturi de keratinocite au fost aplicate pe plăgi acoperite cu autogrefe de piele despicată, fenestrată 3:1. În aceste cazuri, keratinocitele au fost suspendate în mediu de creștere și au fost pulverizate direct pe plagă, fără a folosi fibrină. Se raportează că plăgile se vindecă mai rapid și au o calitate mai bună, acolo unde s-au pulverizat celule.

#### **Sistem de transport**

Au fost utilizate mai multe membrane în calitate de suport pentru keratinocite. Unul dintre cele mai moderne este *Laser-skin* (*Fidia Advanced Biopolymers*, Italia), un derivat esterificat al acidului hialuronic, perforat cu ajutorul laserului. Acidul hialuronic stimulează migrarea celulelor, proliferarea lor și procesul de angiogeneză. Același material a apărut pe piață cu denumirea de *Vivoderm* (*ER Squibb and Sons Inc.*, SUA). Keratinocitele sunt însămânțate *in vitro* pe membrană și, proliferând, populează porii creați de laser. Coloniile celulare cresc, apoi, de asupra și sub membrană, care poate fi dezlipită de pe ceașca Petri fără digestie enzimatică. Metoda a fost utilizată în clinică în tratamentul *vitiligo*, precum și pentru a acoperi *Integra* [45].

#### **Substituenți combinați de piele pentru închiderea plăgii**

Rezultatele elaborării și utilizării sistemelor alternative de transport pentru celule (trame, suporturi) sunt încurajatoare, deoarece acolo, unde keratinocitele au fost utilizate separat, calitatea vindecării a fost de calitate proastă. Combinarea keratinocitelor cu anumite forme de matrice cutanată, crește

used widely in humans. The delivery of cells to the wound can be at any stage in the expansion process by direct application or by use of a carrier [44].

#### **Direct application**

There are some successes in keratinocyte application with fibrin, in suspension or in the form of a membrane.

**The fibrin suspension.** The fibrin suspension is a simple technique that allows grafting at early stages, when cells proliferate actively. Once keratinocytes are attached to the wound, complete healing occurs in 14-21 days. In the animal model (rat) a good attachment and regeneration and formation of stable skin with good mechanical properties were obtained by use of a fibrin glue suspension on the dermal pre-grafted bed.

**Fibrin pellicle.** Keratinocyte subconfluent cultures can be grown on a layer of fibrin and then transferred to the wound bed. Such method was used to three patients with deep wounds after excision. It was found that fibrin provided a satisfactory barrier against the environment for 10 days, ensuring the time required for the keratinocytes proliferation until confluence. Autogenous keratinocytes can be applied in spray form on the wound surface.

**Cell suspension for pulverization.** Keratinocyte suspension were applied to wounds covered with split skin fenestrated 3:1 autografts. In these cases the keratinocytes are suspended in growth medium and sprayed directly on the wound surface without the use of fibrin. It is reported that wounds heal faster and have a better quality where cells were sprayed.

#### **Carrier system**

Different membranes were used as a support for keratinocytes. One of the latest is *Laser-skin* (*Fidia Advanced Biopolymers*, Italy), an esterified derivative of hyaluronic acid perforated by laser. The hyaluronic acid can promote cell migration, proliferation and angiogenesis. The same material appeared on the market under the name *Vivoderm* (*ER Squibb and Sons Inc.*, USA). Keratinocytes seeded *in vitro* on the membrane and proliferate. In this way they inhabit the pores created by laser. Then the cell colonies grow above and below the membrane. It can be peeled from the cup surface without enzymatic digestion. It has been used clinically in the treatment of vitiligo and for *Integra* covering [45].

#### **Complex skin substitutes for wound closure**

The results of development and use of alternative carrier systems for cells (Trame, supports) are encouraging because when keratinocytes are used separately the healing quality is poor. Combination of keratinocytes with some forms of cutaneous matrix increases the efficiency of their utilization. Matrix films with subconfluent cell cultures need time to restore the dermal basal membrane. The dermal basal membrane is the key-structure which ensures a robust and adherent epidermal barrier. The best solution is the formation by epidermis of the basal membrane during the cultivation process with its maintenance during the autograft transportation. The objective can be achieved by keratinocyte cultivation on a certain

eficacitatea utilizării acestora. Totodată, plăcuțele de matrice cu celule subconfluente, au nevoie de timp pentru a restabili membrana dermică bazală, care este structura-cheie, ce asigură o barieră epidermică robustă și aderentă. Soluția cea mai favorabilă ar fi formarea de către epiteliiu a unei membrane bazale în decursul procesului de cultivare, cu menținerea acesteia în timpul transportării autogrefei celulare epidermice. Obiectivul poate fi atins prin cultivarea celulelor pe un anumit tip de biomaterial. Dacă stratul epidermic poate fi fixat în plagă, atunci bariera epidermică vitală poate fi substituită. Acest mod de abordare este denumit adesea tehnologie „complexă” de substituire a pielii. Sinteza unui compus cutanat, care are două componente, dermic și epidermic, poate nu doar să îmbunătățească tehnicile de transfer al keratinocitelor, dar și să influențeze aderarea, creșterea și diferențierea epidermică. Cultivarea concomitentă a keratinocitelor și fibroblastelor stimulează sinteza collagenului de tip VII, proteina structurală majoră a fibrilelor de ancoraj.

Compușii, dezvoltăți actualmente, conțin geluri simple de collagen, similare după formă cu *Apligraf*, dermă prelucrată și compuși pe bază de collagen-glicozaminoglicani.

#### **Compuși pe bază de alogrefe și xenogrefe**

Ghosh *et al.* (2009), au comparat metodologiile folosite pentru prepararea substituenților de piele, combinați pe bază de dermă alogenă. Ei au cercetat etapele de sterilizare, de de-epitelizare și introducere a fibroblastelor și keratinocitelor în compus, necesare pentru producerea unei derme sterile și aceluare, cu membrană bazală intactă, necesară pentru o bună aderare a stratului epidermal.

Tehnica de glicerolizare standardizată oferă rezultate optime de sterilizare, menținând, în același timp, o dermă elastică ce păstrează cu fidelitate structura histologică normală. Iradierea face pielea rigidă și histologic anormală, iar tratamentul cu oxid de etilenă are rezultate imprevizibile. Dacă oxidul de etilenă ar da rezultate consistente, ar fi preferată din cauză că reprezintă o procedură de sterilizare standard și rapidă.

De-epidermizarea cu clorură de natriu păstrează membrana bazală mai bine și a fost mai rapidă decât la utilizarea soluției de fosfat tampon. Penetrarea fibroblastelor în dermă se produce doar în derma reticulară, în cazul în care nu a fost în-sămânțată împreună cu keratinocitele. Autorii acestui studiu recomandă un compus format din alogrefă glicerolizată sau tratată cu oxid de etilenă, în-sămânțat, în prealabil, cu fibroblaste și, ulterior, cu keratinocite [46].

#### **Compuși derivați din matrice collagen-glicozaminoglican**

Studiile *in vitro*, în care keratinocitele umane subconfluente sunt aplicate pe suprafața unei matrice de collagen-glicozaminoglicani, similară celei utilizate în *Integra*, au dovedit aderență și creștere până la confluență. Modificările ulterioare ale membranei din collagen-glicozaminoglicani pentru implantarea fibroblastelor autogene, au permis creșterea unor straturi distincte de cultură de keratinocite autogene pe suprafața modificată. Utilizarea clinică a acestui tip de material în plăgile profunde, excizate ale pielii, au dovedit rate de incorporare acceptabile, cu formarea membranei bazale timp de 9 zile. Lucrările ulterioare ale acestui grup, utilizând keratinocitele împreună cu fibroblastele, au demonstrat că includerea

type of biomaterial. When the epidemic layer is attached on the wound surface, the vital epidermic barrier function is substituted. This method is called “complex” technology of skin substitution. Formation of a skin substitutes which consists of two components – the dermis and epidermis components – can improve the keratinocytes carrier methods and influence the epidermic adherence, growth and differentiation. Keratinocytes and fibroblasts simultaneous cultivation stimulates the synthesis of collagen type VII, the major structural protein of anchorage fibrils.

Currently developed products contain simple collagen gels, similar with *Apligraf*, processed dermis and components based on collagen-glycosaminoglycans.

#### **Compounds based on allografts and xenografts**

Ghosh *et al.* (2009) compared the methods used for the preparation of “complex” skin substitutes based on allogeneic dermis. They studied the steps of sterilization, de-epithelialization and fibroblast and keratinocyte introduction in the compound necessary for production of a sterile and acellular dermis with intact basal membrane which ensure a proper epidermal layer adherence. Glycosylation standardized technology leads to obtain optimal sterilization results and allows to maintain elastic dermis which keep normal histological structure. The radiation makes the skin stiff and histologically abnormal. The treatment with ethylene oxide has unpredictable results. If ethylene oxide gives consistent results it will be preferred because it is a quick standard sterilization procedure.

De-epidermisation with sodium chloride maintains the basal membrane better and is a faster method than phosphate buffer solution use. The penetration of fibroblasts into the dermis has place only in the reticular layer (if keratinocytes are not seeded simultaneously). The authors of this study recommend a compound which consist of glycerolized or treated with ethylene oxide allograft, previously seeded with fibroblast and subsequently with keratinocyte [46].

#### **Compounds derived from collagen-glycosaminoglycan matrix**

*In vitro* studies in which subconfluent human keratinocytes are applied to a collagen-glycosaminoglycan matrix show adherence and growth until confluence. Subsequent modification of the collagen-glycosaminoglycan membrane for autologous fibroblast implantation allows growth of distinct layers of autologous keratinocytes. The clinical use of this material in excised full-thickness wounds demonstrates acceptable rates of incorporation with basal membrane formation in 9 days. Subsequent studies of this group with simultaneously use of keratinocytes and fibroblasts show that the inclusion of these two cell types *in vitro* ensure formation of a better basal membrane, increase production of laminin, collagen type IV and thicker epithelial layers. Recently, cell cultures in composition of skin substitutes were successfully applied to patients with burns for deep excised wound closure.

Approximate price of the most frequently used skin substitutes is given in Table 1.

acestor două tipuri de celule au drept rezultat formarea unei membrane bazale mai bune, producere crescută de laminină, colagen de tip IV și straturi epiteliale mai groase, *in vitro*. Mai de curând, culturile de celule în componența substituenților de piele, au fost aplicate cu succes la pacienți cu arsuri pentru închiderea plăgilor profunde excizate.

Prețul aproximativ al celor mai frecvent utilizați substituenți de piele este redat în Tabelul 1.

**Tabel 1.** Prețul aproximativ al celor mai frecvent utilizați substituenți de piele [47].

Denumire	Structură	Preț per cm <sup>2</sup> , €
EZ-Derm	Xenogrefă porcină, procesată prin liofilizare	2,5
Biobrane	Silicon, rețea de nailon, colagen	0,7
Transcyte	Silicon, rețea de nailon, colagen înșămânțat cu fibroblaști neonatali	10,7
Apligraf	Keratinocite neonatale, colagen înșămânțat cu fibroblaști neonatali	19,3
Dermagraft	Acid poliglicolic, înșămânțat cu fibroblaști neonatali	9,7
AlloDerm	Derm cadaveric deepitelizat acelular	8,1
Integra	Silicon, colagen și glicozaminglican	4,5
Laserskin	Cultură de keratinocite autogene, acid hialuronic cu perforări laser	21,9
Epicel	Cultură de keratinocite autogene	15,8
Allograft	Tegument uman, procesat prin glicerolizare	1,5
Allograft	Tegument uman, procesat prin crioprezervare	0,8

### Concluzii

În viitor, substituenții de piele vor avea un mai mare potențial de a stimula procesul de regenerare a leziunii, decât de a o repara. Pielea artificială va înlocui grefele de piele, astăzi considerate drept standard de aur în tratamentul defectelor tegumentare. În calitate de clinicieni, scopul nostru este – de a-l asigura pe pacientul ars – cu piele de cea mai înaltă calitate și cât mai rapid posibil. Ca oameni de știință, noi, deocamdată, nu am realizat scopul final – obținerea pielii artificiale gata pentru utilizare și, cu atât mai mult, în cantități suficiente. Însă, prin sinteza ultimelor date în acest domeniu și aplicarea rațională a cunoștințelor noi în practică, putem să ne asigurăm că folosim materialul potrivit într-o situație corespunzătoare.

### Contribuția autorilor

Autorii au contribuit în mod egal la elaborarea și scrierea articolului.

### Declarația de conflic de interese

Nimic de declarat.

### Referințe/references

- Bernard G., Auger M., Soucy J., Pouliot R. Physical characterization of the stratum corneum of an *in vitro* psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1770: 1317-1323.
- Horch R., Kopp J., Kneser U., Beier J., Bach A. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J. Cell Mol.*, 2005; 9: 592-608.

**Table 1.** Approximate price of the most frequently used skin substitutes [47].

Name	Composite layers	Price per cm <sup>2</sup> , €
EZ-Derm	Porcine xenograft processed by lyophilisation	2.5
Biobrane	Silicon, nylon network, collagen	0.7
Transcyte	Silicon, nylon network, collagen seeded with neonatal fibroblasts	10.7
Apligraf	Neonatal keratinocytes, collagen seeded with neonatal fibroblasts	19.3
Dermagraft	Polyglycolic acid seeded with neonatal fibroblasts	9.7
AlloDerm	Deepithelised cadaveric acellular derma	8.1
Integra	Silicon, collagen and glycosaminoglycan	4.5
Laserskin	Autologous keratinocyte culture, hyaluronic acid with laser perforation	21.9
Epicel	Autologous keratinocyte culture	15.8
Allograft	Human skin processed by glycerolisation	1.5
Allograft	Human skin processed by cryopreservation	0.8

### Conclusions

Products which consist of cultured allogeneic cells in combination with biomaterial are available on the market for wound coverage and wound closure stimulation. Material with autologous cellular component, which can provide immediate wound closure, are developing and are not available. In future skin substitutes may have more ability to stimulate regeneration than to repair, and artificial skin may be like skin split autografts – the gold standard for skin defects recovery today. As clinicians, our goal is to provide patients with wounds with skin of the highest quality in the shortest time possible. As scientists, we have not reached the final goal yet – the goal to have an artificial skin ready for use, but bringing into question the current views and using them rationally we can at least do our duty as clinics and ensure that we use the right material in a proper situation.

### Authors' contribution

All of the authors contributed equally to the writing of this manuscript.

### Declaration of conflicting interests

Nothing to declare.

- Auger F., Berthod F., Moulin V., Pouliot P., Germain L. Tissue-engineered skin substitutes: from *in vitro* constructs to *in vivo* applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2004; 39: 263-275.
- Mercandetti M. Wound Healing and Repair. Mar, 12, 2015.
- Hutchinson J. The Wound Programme. Centre for Medical Education: Dundee, 2012.

6. Werner S., Krieg T., Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Invest. Dermatol.*, 2007; 127 (5): 998-1008.
7. Bradley M., Cullum N., Nelson E.A. *et al.* Systematic reviews of wound care management: dressings and topical agents used in the healing of chronic wounds. *Health Tech. Assess.*, 1999; 17: (2): 1-35.
8. Marinescu B. Aplicațiile clinice ale culturilor de cheratinocite în acoperirea marilor defecte tegumentare. Teze\_doctorat\_2007.
9. Halim A., Khoo T., Yussof S. Biologic and synthetic skin substitutes: an overview. *Indian J. Plast. Surg.*, 2010; 43 (Suppl.): S23-S28.
10. Shores J., Gabriel A., Gupta S. Skin substitutes and alternatives: a review. *Adv. Skin Wound Care*, 2007; 20: 493-508.
11. Piccolo N., Piccolo-Lobo M., Piccolo-Daher M. Use of frog skin as a temporary biological dressing. *Proc. Am. Burn Assoc.*, 1992; 24: [abstract #39].
12. Chiu T., Burd A. "Xenograft" dressing in the treatment of burns. *Clin. Dermatol.*, 2005; 23: 419-23.
13. Hermans M. Preservation methods of allografts and their (lack of) influence on clinical results in partial thickness burns. *Burns*, 2011; 37: 873-81.
14. Hermans M. Porcine xenografts vs. (cryopreserved) allografts in the management of partial thickness burns: is there a clinical difference? *Burns*, 2014; 40: 408-15.
15. Shores J., Gabriel A., Gupta S. Skin substitutes and alternatives: a review. *Adv. Skin Wound Care*, 2007; 20 (9): 493-508.
16. Wright K., Nadire K., Busto P., Tubo R., McPherson J., Wentworth B. Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury. *Burns*, 1998; 24: 7-17.
17. Carsin H., Ainaud P., Le Bever H. *et al.* Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single- centre experience with 30 patients. *Burns*, 2000; 26: 379-87.
18. Lobmann R., Pittasch D., Muhlen I., Lehnert H. Autologous human keratinocytes culture of membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid for grafting in nonhealing diabetic foot lesions: a pilot study. *J. Diabetes Complications*, 2003; 17: 199-204.
19. Harriger M., Warden G., Greenhalgh D., Kagan R., Boyce S. Pigmentation and microanatomy of skin regenerated from composite grafts of cultured cells and biopolymers applied to full-thickness burn wounds. *Transplantation*, 1995; 59: 702-7.
20. Boyce S., Goretsky M., Greenhalgh D., Kagan R., Rieman M., Warden G. Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. *Ann. Surg.*, 1995; 222: 743-52.
21. Halim A., Khoo T., Yussof S. Biologic and synthetic skin substitutes: an overview. *Indian J. Plast. Surg.*, 2010; 43 (Suppl): S23-8.
22. Kenichiro H. Current issues regarding skin substitutes using living cells as industrial materials. November, 2006: 10.
23. Chaby G., Senet P., Vaneau M. *et al.* Dressings for acute and chronic wounds: a systematic review. *Arch. Dermatol.*, 2007; 143 (10): 1297-1304.
24. Greer N., Foman N., MacDonald R. *et al.* Advanced wound care therapies for nonhealing diabetic, venous, and arterial ulcers: a systematic review. *Ann. Intern. Med.*, 2013; 159 (8): 532-42.
25. Singer A., Clark R. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 1999; 341: 738-746.
26. Harding K. G., Morris H. L., Patel G. Healing chronic wounds. *BMJ*, 2002; 324: 160-163.
27. <http://www.slideshare.net/gueste2ea26/trans-cyte>
28. Cassidy C., St Peter S., Lacey S. *et al.* Biobrane vs. duoderm for the treatment of intermediate thickness burns in children: a prospective, randomized trial. *Burns*, 2005; 31 (7): 890-893.
29. Pham C., Greenwood J., Cleland H., Woodruff P., Maddern G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. *Burns*, 2007; 33 (8): 946-957.
30. Shealy F., DeLoach E. Experience with the use of apligraf to heal complicated surgical and nonsurgical wounds in a private practice setting. *Adv. Skin Wound Care*, 2006; 19 (6): 310-322.
31. [http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108\\_2007\\_Groups/group11/future.html](http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group11/future.html)
32. Organogenesis Inc. Living technology. Apligraf. Prescribing information. 300-111-8 Apligraf R12-10 12/6/10.
33. Marston W. A., Hanft J., Norwood P. *et al.* The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care*, 2003; 26 (6): 1701-1705.
34. Hart C., Loewen-Rodriguez A., Lessem J. Dermagraft: use in the treatment of chronic wounds. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, 2012; 1 (3): 138-141.
35. Reganato A. Private practice periodontist West suburbs Chicago, IL. AllodermR is Allodynamite. "The Reganato Lecture Series", Sponsored by Woodlake Family Dental of Naperville, IL.
36. Gore D. Utility of acellular allograft dermis in the care of elderly burn patients. *J. Surg. Res.* 2005; 125 (1): 37-41.
37. <http://www.pittsburghdentalimplants.com/cosmetic-procedures/surgical-procedures/alloderm-grafts/>.
38. <http://www.hughessurgical.com/procedures/non-surgical/injectables/alloderm>
39. Lee L., Porch J., Spenler W. *et al.* Integra in lower extremity reconstruction after burn injury. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2008; 121 (4): 1256-1262.
40. Lagus H., Sarlomo-Rikala M., Böhling T. *et al.* Prospective study on burns treated with Integra, a cellulose sponge and split thickness skin graft: comparative clinical and histological study randomized controlled trial. *Burns*, 2013; 39 (8): 1577-1587.
41. Rheinwald J., Green H. Serial cultivation of human epidermal keratinocytes: the cell formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 1975; 6: 331-344.
42. Desai M., Mlakar J., McCauley R., Abdullah K., Rutan R., Waymack J., Robson M., Herndon D. Lack of long-term durability of cultured keratinocyte burn-wound coverage: a case report. *J Burn Care Rehabil.*, 1991; 12(6): 540-5.
43. Carsin H., Ainaud P., Le Bever H. *et al.* Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. *Burns*, 2000; 26 (4): 379-387.
44. Poumay Y., Pittelkow M. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J. Invest. Dermatol.*, 1995; 104: 271-6.
45. Rousou J. Use of fibrin sealants in cardiovascular surgery: a systematic review. *J. Card. Surg.* 2013; 28 (3): 238-247.
46. Yao M., Attalla K., Ren Y. *et al.* Ease of use, safety, and efficacy of Integra bilayer wound matrix in the treatment of diabetic foot ulcers in an outpatient clinical setting: a prospective pilot study. *J. Am. Pediatr. Med. Assoc.*, 2013; 103 (4): 274-280.
47. Ho C., Tran K., Hux M. *et al.* Artificial skin grafts in chronic wound care: a meta-analysis of clinical efficacy and a review of cost-effectiveness. Technology Report No 52. Ottawa, ON: Canadian Coordinating Office for Health Technology Assessment (CCOHTA); 2012.