

KOKULTURY KOMÓRKOWE W REKONSTRUKCJI SKÓRY W ZASTOSOWANIU KLINICZNYM*

CELL COCULTURES IN SKIN RECONSTRUCTION FOR CLINICAL APPLICATIONS

Justyna DRUKAŁA

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Streszczenie: Umiejętność uzyskania masowych hodowli z niewielkich wycinków tkanek ludzkich i modyfikowania ich zachowania się *in vitro* doprowadziła do wzrostu zainteresowania praktycznym wykorzystaniem tych osiągnięć w biologii i medycynie. Konwencjonalne metody leczenia ubytków skórnych nie zawsze są skuteczne i występuje potrzeba konstruowania substytutów skórnych. Mogą one zastępować naskórek, ale także opracowane zostały ekwiwalenty pełnej grubości skóry. Mają one jednak obok licznych zalet i wady, które skłaniają badaczy do poszukiwania nowych rozwiązań. Doświadczenia własne w tym zakresie dotyczą zastosowania hodowanych *in vitro* autologicznych komórek naskórka w leczeniu troficznych owrzodzeń podudzi. Obok zastosowań klinicznych rekonstruowana skóra znajduje również wykorzystanie w badaniach podstawowych, między innymi do analizy toksyczności rozmaitych substancji i inwazyjności nowotworów. Wytwarzane *in vitro* substytuty skóry okazały się środkiem umożliwiającym zamykanie nie gojących się ran, lecz masowe ich stosowanie jest ograniczone z powodu wysokich kosztów produkcji.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; supl. 16: 97–110)

Słowa kluczowe: gojenie ran, keratynocyt, substytut skóry, hodowla *in vitro*

Summary: The ability of carrying out large-scale cultures from small human tissue biopsies and to modificate of their behaviour *in vitro* led to the increase an interest in practical use of these achievements in biology and medicine. Conventional methods of skin wound healing are not sufficiently efficient and there is a need to construct skin equivalents. A full thickness skin equivalent has been constructed and it may substitute epidermis. The last has a lot of advantages but also disadvantages, which stimulate further research. Our experience in this field concerns the use of cultured autologous keratinocytes for healing of trophic leg ulcers. Reconstructed skin is used not only in medicine but also in basic research for example in analysis of toxicity of various substances and to study the tumour invasiveness.

Reconstructed *in vitro* skin equivalents appear to be efficient substitutes enabling wound healing, but their large-scale use is limited because of high costs of their production.

(*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 97–110*)

Key words: wound healing, keratinocyte, skin substitute, *in vitro* culture

WSTĘP

W ostatnim 20-leciu nastąpił gwałtowny rozwój nowych technik hodowli komórek i tkanek ludzkich *in vitro*. Możliwość uzyskania masowych hodowli z niewielkich wycinków tkanek, postęp w poznaniu biologii wielu typów komórek, a także umiejętność modyfikowania ich zachowania się w hodowlach, doprowadziły do wzrostu zainteresowania praktycznym wykorzystaniem tych osiągnięć w biologii i medycynie.

Skóra jest tkanką najbardziej eksponowaną i jednocześnie narażoną na stropy środowiskowe. Budowana jest przez wiele wyspecjalizowanych typów komórek zaangażowanych w funkcje ochronne organizmu. Dzięki swojej wytrzymałości, elastyczności i półprzepuszczalności chroni całe ciało przed uszkodzeniami mechanicznymi, utratą płynów fizjologicznych, inwazją drobnoustrojów i szkodliwym promieniowaniem [3, 6].

Zbudowana jest z wielowarstwowego nabłonka płaskiego – naskórka i skóry właściwej [43]. W skórze właściwej najliczniej reprezentowane są fibroblasty, które produkują i wydzielają składniki macierzy międzykomórkowej, a wśród nich: glikozaminoglikany, takie jak: kwas hialuronowy, siarczan chondroityny, siarczan dermatanu, siarczan heparanu, heparyna, siarczan keratanu oraz białka fibrylarne, kolageny (I, III, IV, V, VI, VII, XII, XIV), elastynę i białka adhezyjne, m.in. fibronektynę, lamininę, tenascynę. Oprócz fibroblastów w skórze właściwej obecne są makrofagi, komórki tłuszczne, komórki dendrytyczne, limfocyty T.

Naskórek jest ciągle odnawiającą się wielowarstwową strukturą. Składa się z warstwy rozrodczej, kolczystej, ziarnistej i zrogowaciałej. Jest tkanką szczególnie dogodną do hodowli, ponieważ w ponad 90% składa się z jednego rodzaju komórek – keratynocytów i zawiera znikomą ilość składników substancji międzykomórkowej. Oprócz keratynocytów w naskórku występują melanocyty, komórki Langerhansa, komórki dendrytyczne i neurowydzielnicze komórki Merkla. W odpowiednich pozycjach keratynocyty nie tracą zdolności do proliferacji i różnicowania *in vitro*.

Skóra – największy pod względem zajmowanego obszaru organ ustroju pod wpływem urazu termicznego traci częściowo swoje funkcje. Ludzie, którzy ulegając tragicznym wypadkom tracą duży procent powierzchni skóry, są ciężko chorzy z powodu infekcji i utraty elektrolitów [18]. Uraz termiczny należy do najcięższych spośród spotykanych w praktyce klinicznej, a spowodowany nim hypermetabolizm jest proporcjonalny do rozległości i stopnia oparzenia. Pacjenci, którzy przeszli tę ciężką chorobę, muszą z kolei radzić sobie z obecnością głębokich, deformujących blizn i ograniczających ruchliwość przykurczów.

Gojenie ran jest procesem złożonym i wiąże się z wysoce złożoną odpowiedzią organizmu na uszkodzenie tkanki skórnej i utratę jej integralności. Obejmuje ona współdziałanie układu odpornościowego, tkanki łącznej, komórek epitelialnych i systemu naczyniowego. Procesy związane z gojeniem ran regulowane przez cytokiny i czynniki wzrostu przebiegają w obrębie substancji międzykomórkowej.

Wiele czynników ma wpływ na przebieg gojenia, ale najistotniejszym z nich jest zamknięcie rany. Czyste pod względem bakteriologicznym rany cięte goją się szybko, natomiast rany, w których stwierdza się florę bakteryjną i rany z ubytkiem tkanki nie zamykają się łatwo. Rany chroniczne (owrzodzenia) zwykle nie są zamknięte i stale narażone są na wpływ czynników zewnętrznych. Możliwość hodowli in vitro komórek skóry sprawiła, że w ostatnich latach opracowano metody wytwarzania substytutów skóry ludzkiej [33, 4]. Wykorzystywane są one do przeszczepów w przypadku rozległych ran oparzeniowych, gdy obszar uszkodzonej powierzchni jest zbyt duży, aby doszło do spontanicznego zagojenia się rany lub zastosowanie autoprzeszczepów z nieuszkodzonych powierzchni ciała. Również, gdy rana jest głęboka i zniszczony jest nie tylko naskórek, ale także mieszki włosowe i gruczoły łojowe z keratynocytami zdolnymi do odtwarzania naskórka, konieczne jest dostarczenie do rany nowych komórek. Zanim jednak pojawiły się takie możliwości stosowano metody konwencjonalne, które do dziś są najczęściej stosowaną metodą leczenia ubytków skórnych.

METODY LECZENIA UBYTKÓW SKÓRNYCH

Historia leczenia oparzeń i zamykania ran z wykorzystaniem skóry jako opatrunku sięga początków XIX wieku. Pierwsze próby miały charakter eksperymentów i kończyły się niepowodzeniami, dały jednak początek poszukiwaniom skutecznych metod zamykania ran oparzeniowych i troficznyc (tab. 1).

TABELA 1. Pierwsze próby przeszczepiania skóry

Rok	Autor	
1803	Baronio	jako pierwszy stwierdził, że skóra może być przeszczepiona z jednej części ciała na inną (badania na owcy)
1869	Reverdin	dokonał pierwszego autoprzeszczepu naskórka u człowieka
1871	Pollock	wykonał pierwszy alloprzeszczep kawałków swojej skóry zmieszanych z kawałkami skóry oparzonego pacjenta
1881	Girdner	dużą ranę oparzeniową opatrzył skórą pobraną ze zwłok; opisał odrzucenie tego przeszczepu

W XX wieku zaczęto wykonywać przeszczepy allograftów, tj. tkanek innych osobników tego samego gatunku (nazywanych także homograftami lub izograftami). Opisywano początkowe przyjmowanie się przeszczepu, a później jego stopniowe odrzucanie przez organizm biorcy. Allografty zostały wprowadzone jako rutynowe postępowanie w leczeniu oparzeń w latach pięćdziesiątych jako czasowe opatrunki. Były także używane do pokrywania siatkowych autoprzeszczepów. W Chinach z powodzeniem stosowano metodę pokrywania ran oparzeniowych płatami allograftów, pod którymi umieszczano małe kawałki autoprzeszczepów, których rozrost wypierał z czasem odrzucany allograft. Poważnym ograniczeniem stosowania allograftów było i jest nie tylko odrzucanie przeszczepu, ale i możliwość przenoszenia chorób wirusowych od dawcy.

Pośredniej grubości autoprzeszczepy siatkowe są wciąż najczęściej stosowaną, konwencjonalną metodą gojenia ran. Istnieje jednak wiele ograniczeń jej stosowania. Najczęściej wynikają one z braku miejsc, z których można pobrać skórę do przeszczepu (tzw. miejsc donorowych). Niewątpliwą wadą tej metody, mniej istotną wprawdzie z punktu widzenia ratowania życia oparzonego pacjenta, są blizny pozostające w miejscach donorowych (tab. 2). W przypadku oparzeń głębokich obejmujących ponad 60% całkowitej powierzchni ciała brakuje zdrowej skóry, aby wykonać autoprzeszczep. Dodatkowo potrzebna jest skóra do zrekonstruowania ubytków, przykurczów i częstych zniekształceń powierzchni ciała.

W leczeniu chronicznych ran, troficznych owrzodzeń, które najczęściej wynikają z braku prawidłowego ukrwienia kończyn, można stosować autoprzeszczepy. Dostępność miejsc donorowych nie jest w tych przypadkach czynnikiem ograniczającym wykorzystanie autoprzeszczepów. Bardzo istotny jest natomiast ogólny stan pacjenta, ponieważ istnieje duże ryzyko, że nie zagoją się miejsca pobrania skóry do przeszczepu.

Odkąd Green i in. w 1975 r. odnieśli sukces w hodowli keratynocytów i otrzymali wielowarstwowy płat naskórka przeszczepiając go po raz pierwszy w 1979 r., a O'Conner i Gallico w latach 1981 i 1984 jako pierwsi przeszczepili wyhodowany naskórek pacjentom, rozpoczęto intensywne badania nad udoskonaleniem metod hodowli naskórka i skóry *in vitro* [37, 30, 29]. Obecnie hodowany naskórek jest dostępny komercyjnie w USA [38]. Przeszczepy naskórków hodowanych *in vitro* dawały i dają dobre rezultaty w leczeniu oparzeń sięgających 60% powierzchni ciała.

Dr Carolyn Campton z Bostonu, w swoich 5-letnich badaniach histologicznych przeszczepionego hodowanego naskórka wykazała, że hodowany naskórek ostatecznie różnicuje i w wyniku *remodelingu* staje się normalnym naskórkiem z błoną podstawną. Ponadto stymuluje prawidłową rekonstrukcję skóry właściwej. Jednakże bardzo mała grubość hodowanego naskórka powoduje ściągnięcie rany nim pokrytej i co się z tym wiąże, niezadowolający efekt kosmetyczny [7, 17, 48].

DOŚWIADCZENIA WŁASNE Z HODOWANYMI KERATYNOCYTAMI

Badania własne prowadzone we współpracy z dr Cieślikiem, ordynatorem Oddziału Leczenia Oparzeń i Chirurgii Plastycznej WSS im. L. Rydygiera wykorzystujące metodę leczenia troficznych owrzodzeń podudzi z użyciem hodowanych *in vitro* autologicznych keratynocytów wykazały, że znacznie szybciej goją się rany pokrywane zawiesiną komórek w fibrynowym kleju fizjologicznym niż płatem naskórka. Wyniki badań własnych potwierdzają korzyści wynikające z zastosowania metody autoprzyszczepu keratynocytów hodowanych *in vitro* [10].

Metoda ta pozwala uzyskać natychmiast po pokryciu rany hodowanymi keratynocytami zniesienie bólu i zmniejszenie się wydzieliny z rany. Po przypadkowym uszkodzeniu powierzchni z powstałym *de novo* naskórkiem w czasie zmiany opatrunku następowała szybka odnowa naskóra od brzegów i dna rany. Zaobserwowano lepsze wyniki terapeutyczne przy zastosowaniu mieszaniny hodowanych keratynocytów i kleju fibrynowego w porównaniu z przeszczepami uwarstwionymi. Klej zapewnia bardzo dobrą przyczepność komórek do podłoża, co pozwala uniknąć uszkodzeń autoprzyszczepu w trakcie kolejnych zmian opatrunku.

ZALETY I WADY STOSOWANYCH AUTO- I ALLOGRAFTÓW

Zaletą hodowanych do przeszczepu własnych komórek pacjenta jest zdolność do szybkiego wzrostu, trwałe zabezpieczenie rany, bezpieczeństwo oraz udokumentowana, długotrwała skuteczność ich stosowania [14, 23]. Jednakże poważną wadą jest długi okres (ok. 3–4 tyg.) oczekiwania na przygotowanie hodowli do przeszczepu (tab. 2).

Autologiczne keratynocyty są bardzo delikatne, podatne na infekcje bakteryjne i uszkodzenia mechaniczne. Regeneracja tkanki łącznej pod nałożonym autoprzyszczepem naskórka trwa miesiące, a nawet lata. Hodowane do przeszczepu komórki od innego osobnika tzw. allografty (pierwszy raz użyte w 1983 r.) mają liczne zalety [9, 16, 24, 25]. Nie ma konieczności oczekiwania na przeszczep, nie stwierdzono odrzucania alloprzeszczepu. Pierwotnie uważano, że allogeniczne keratynocyty stanowią przeszczep permanentny (wiadomo, że komórki Langerhansa, uważane za krytyczne w odrzucaniu przeszczepu są eliminowane po 7 dniach trwania hodowli). Postulowano, że usunięcie tych komórek może prowadzić do trwałej tolerancji immunologicznej. Obecnie wiadomo, że hodowane komórki innego osobnika nie stanowią trwałego przeszczepu. Wiele badań z użyciem technik genetycznych wykazało, że allogeniczne keratynocyty zastępowane są z czasem własnymi. Alloprzeszczepy keratynocytów są zatem czasowym opatrunkiem, stymulującym gojenie

TABELA 2. Zalety i wady biologicznych substytutów skóry

Rodzaj substytutu	Zalety	Wady	Litera tura
Pośredniej grubości przeszczep autologiczny	natychniastowa dostępność trwałe pokrycie rany	bolesne miejsce pobrania przeszczepu ograniczona dostępność	
Allograft ze zwłok	natychniastowa dostępność	odrzućcie przeszczepu możliwość przeniesienia zakażenia	[51, 52]
Hodowane autologiczne keratynocyty	pokrycie dużego obszaru z małej biopsji trwałe pokrycie rany akceptowalne efekty kosmetyczne	3-tygod. okres oczekiwania na wyhodowany przeszczep przeszczep b. delikatny, podatny na zakażenia bakteryjne i mechaniczne uszkodzenie długotrwały proces odtworzenia skóry właściwej	[41]
Hodowane allogeniczne keratynocyty	natychniastowa dostępność przyspieszenie gojenia ran pośredniej głębokości	odrzućcie przeszczepu możliwe przeniesienie zakażenia brak skuteczności w leczeniu ran głębokich	[37, 44, 46]
GRAFTSKIN – żel kolagenowy z fibroblastami i keratynocytami	łatwy w użyciu dobre czasowe zabezpieczenie rany	podatność na trawienie enzymatyczne	[47, 12, 21]
GAG + kolagen zasiedlony fibroblastami	łatwy w użyciu	podatność na trawienie enzymatyczne i liżę bakteryjną ograniczona powierzchnia	[15]
INTEGRA – kolagen bydłocy + starczan chondroityny + zlamina wana błona siłikonowa	łatwy w użyciu natychniastowa dostępność zadawalające efekty kosmetyczne	konieczny przeszczep skóry pośredniej grubości	[56, 57]
DERMAGRAFT - fibroblasty w bioresorbowalnej siatce (produkt bezkomórkowy)	łatwy w użyciu natychniastowa dostępność dostępny komercyjnie	konieczny przeszczep naskórka	
TRANSCYTE (ekwiwalent skóry właściwej z żywymi fibroblastami)	łatwy w użyciu skuteczny opatrunek dostarczający cytoki do rany dostępny komercyjnie	konieczny przeszczep naskórka	
APLIGRAF (GRAFTSKIN)	łatwy w użyciu – całkowicie odtworzona skóra pełnej grubości z żywymi składnikami komórkowymi – dostępny komercyjnie	mała powierzchnia jednostkowych substytutów	[34, 54]

się ran od brzegów i resztek przydatków skórnych, szczególnie gdy obecna jest skóra właściwa. Keratynocyty produkują wiele czynników wzrostu w tym II-1,3,6,8, TNF- α , bFGF, PDGF, TGF α i TGF β , a także składniki substancji zewnątrzkomórkowej (m.in. kwas hialuronowy). Wszystkie te czynniki stymulują gojenie się ran, pobudzając śródbłonek naczyń i reepitelializację [30, 35].

Wykazano również, że zliofilizowane keratynocyty podane na ranę działają mitogenicznie, a nałożenie ich na ranę stymuluje jej gojenie [11]. Zanim wyjaśnione zostały podstawy immunologii transplantacyjnej, wszelkie próby wykorzystania alloprzeszczepów i ksenoprzeszczepów kończyły się niepowodzeniem. Allografty są odrzucane po 2–3 tygodniach od wykonania przeszczepu z powodu braku immunokompatybilności. W roku 1944 Medewar jako pierwszy zaobserwował, że allogeniczna skóra właściwa pozbawiona naskórka była mniej immunoreaktywna niż składnik epidermalny. Wykorzystano ten fakt w rekonstrukcji skóry z allogenicznej skóry właściwej i autologicznych komórek naskórka [27]. W trakcie namnażania allogenicznych komórek naskórka w kolejnych pasażach usuwa się komórki Langerhansa, których obecność wiąże się z silną immunogennością przeszczepu. Liczne próby kliniczne wykazały, że hodowane allogeniczne komórki naskórka użyte jako przeszczep nie były odrzucane przez organizm biorcy [1, 2, 16]. Trudno jest w sposób przekonujący udowodnić trwałość i skuteczność takich przeszczepów, ponieważ rany ulegają autoepitelializacji od brzegów lub z pozostałych szczątków skóry własnej w obrębie rany. Badania wykazały, że naskórek allogeniczny ostatecznie jest zastępowany własnym. Nie ulega jednak wątpliwości, że allogenne komórki naskórka i ich ekstrakty stymulują epitelializację ran dzięki produkowanym przez nie czynnikom wzrostowym [31, 40].

ZŁOŻONE SUBSTYTUTY SKÓRNE

Wady hodowanych naskórków doprowadziły do skonstruowania bardziej złożonych substytutów skórnych składających się z warstwy będącej odpowiednikiem skóry właściwej oraz warstwy naskórka [22, 36]. Stało się to możliwe dzięki doświadczeniom i obserwacjom przeprowadzonym wcześniej przez Eugenea Bella, który w latach sześćdziesiątych stwierdził, że fibroblasty mogą migrować do żelu kolagenowego, a w 1981 r. wykazał, że na warstwie fibroblastów da się hodować keratynocyty oraz badaniom Hawarda Greena, którego dziełem jest opracowanie metody hodowania fragmentów naskórka na potrzeby ofiar oparzeń. Podjęto zatem badania nad stworzeniem ekwiwalentu skóry przez połączenie hodowanego naskórka z substytutem skóry właściwej, w celu poprawienia „wgajania” naskórka, stabilności naskórka we wczesnych etapach leczenia, funkcjonalności i ostatecznego efektu kosmetycznego.

W wielu pracowniach na świecie wprowadza się do leczenia ekwiwalent skóry właściwej. Początkowo izolowano skórę właściwą ze skóry pobranej ze zwłok

i pokrywano nią ranę. Na taki alloprzeszczep nakładano hodowany autogenny naskórek.

Metoda była bardzo zadowalająca do czasu, kiedy z powodu użycia alloprzeszczepu doszło do zakażenia wirusowego. Obecnie pracuje się nad uzyskaniem optymalnego biopolimeru zastępującego skórę właściwą [53].

Johan Burke i Ioannis Yannas [5, 54, 55] z *Massachusetts Institute of Technology* skonstruowali prowizoryczne substytuty skóry składające się z porowatego, fibrylarnego rusztowania kolagenowego i siarczanu chondroityny, pokryte elastycznym, silikonowym płatem. Macierz zasiedlona była fibroblastami autologicznymi, a kilka tygodni po przeszczepieniu ekwiwalentu zewnętrzna warstwa silikonowa była usuwana i zastępowana autologicznym przeszczepem siatkowym pośredniej grubości. Substytuty te stosowane u ciężko oparzonych wstrzymywały utratę wody i pobudzały regenerację skóry.

Matsuda [26] zmodyfikował technikę Yannasa wprowadzając pod syntetyczny naskórek mikrosfery (kapsułki z kwasu poli L- mlekowego) zawierające antybiotyki.

Nieco później pojawiła się nowa propozycja przygotowania przeszczepu skóry tzw. *skin culture sandwich* – opracowana w 1989 r. (Hansborough), w którym składnik epidermalny (hodowane keratynocyty) i składnik dermalny (kolagen-glikozaminoglikan z autologicznymi fibroblastami) przygotowano *in vitro* i przeniesiono jako jednostkę na ranę. Te złożone przeszczepy łatwiej wgajały się do rany niż płaty naskórka i przyjmowały się w 50–100% [8]. Żel kolagenowy z fibroblastami pokryty komórkami epitelialnymi wydawał się być bardzo obiecujący we wstępnych badaniach, ale wyniki kliniczne były wysoce niezadowalające [20] (tab. 2).

Dalszy postęp zawdzięczamy Hansbrough i Boyce [15], którzy zrekonstruowali złożony ekwiwalent skóry. Wyhodowali autologiczne keratynocyty na podłożu kolagenowo-glikozaminoglikanowym, na które wcześniej wysiano autologiczne fibroblasty.

Inne wytworzone i testowane w klinice ekwiwalenty skóry właściwej to: kolagen – GAG z chitosanem jako rusztowanie dla naskórka [46], gąbki z hialuronianu [19], gąbki z poliuretanu [41], tlenku polietylenu, poliglikolu, kwasu mlekowego, a na nich naskórek.

Biodegradowalne ekwiwalenty skóry właściwej działają czasowo i są zastępowane przez formującą się *de novo* skórę właściwą (*neodermis*). Kiedy ekwiwalent skóry właściwej ulegnie waskularyzacji i dostępna jest już skóra do przeszczepu, usuwa się syntetyczną warstwę naskórka i na ukrwiony substytut nakłada się autologiczny przeszczep.

Ostatnie lata przyniosły dostępne już na rynku pierwsze produkty inżynierii tkankowej stosowane w klinice. W 1997 został zatwierdzony przez FDA „TRANSCYTE” [(Advanced Tissue Sciences, La Jolla, California), bezkomórkowy materiał osłaniający rany oparzeniowe 2 i 3 stopnia. Powstaje on w zamkniętych sterylnych układach z polimerami stanowiącymi rusztowanie dla rosnących komórek. Warunki

hodowli przypominają naturalne otoczenie komórek w organizmie – komórki dzielą się i wytwarzają czynniki wzrostu, kolagen i inne białka – powstaje funkcjonalna warstwa skóry właściwej. Później zamraża się cały substytut i do użycia podawany jest produkt bezkomórkowy. W 1998 zatwierdzono „DERMAGRAFT” (*Advanced Tissue Sciences*, La Jolla, California) jako środek do leczenia troficznych owrzodzeń.

Różni się on od TRANSCYTE tym, że pozostaje żywą tkanką po rozmrożeniu – może być zatem użyty w leczeniu troficznych owrzodzeń, ran powstałych na tle cukrzycy (przedwcześnie starzejące się komórki nie są zdolne do wytwarzania odpowiednich ilości białek substancji międzykomórkowej), odleżyn. Rany takie wymagają czynników wzrostu i innych białek wytwarzanych przez żywą tkankę w procesie gojenia. Aby ułatwić transport i magazynowanie, dermagraft jest również zamrażany w taki sposób, że po odmrożeniu ponad 50% komórek jest żywych (kriokonserwacja).

ŻYWY SUBSTYTUT SKÓRY

Wszystkie wyżej opisane doświadczenia i próby wytworzenia ekwiwalentu skóry (tab. 2) doprowadziły ostatecznie do konstrukcji żywego substytutu pełnej grubości skóry (LSE – ang. *living skin equivalent*). W 1998 został zatwierdzony „APLIGRAF” (Organogenesis, Inc., Canton, Massachusetts). Jest to pierwsza ludzka sztuczna skóra, świeży produkt o okresie trwałości 5 dni w temp. pokojowej. W przeciwieństwie do hodowli komórkowych, gdzie celem jest osiągnięcie szybkiej proliferacji komórek, w hodowlach organotypowych kluczem do osiągnięcia sukcesu jest ograniczanie proliferacji i zachowanie żywotności komórek. LSE jest produkowany jako jednostkowy produkt w odpowiednich naczyniach hodowlanych z wkładkami [52]. Kształt i rozmiar jednostki jest określony przez rozmiar i kształt wkładki (200 cm² – prostokąt, 44 i 2 cm² – kółka). Wytwarzanie LSE przebiega w kilku etapach. Najpierw wykonuje się odlew bydłowego kolagenu I z 10-krotnie stężonym koncentratem pożywki hodowlanej w naczyniu ze studzienką z błoną polikarbonylową z 3 μm porami. Po żelifikacji tej warstwy nakłada się na nią podobną mieszaninę zawierającą 30 tysięcy ludzkich fibroblastów na cm³ w objętości trzykrotnie większej niż pierwsza warstwa. Warstwy łączą się ze sobą po żelifikacji. Cały proces przebiega w medium hodowlanym, w temperaturze 37°C i w obecności 5% CO₂. Fibroblasty powodują obkurczanie i kondensację kolagenu, w wyniku czego w ciągu 6 dni tworzy się fibrylarna, symulująca tkankę łączną dermalna sieć. Po tym czasie medium hodowlane jest usuwane w celu ekspozycji powierzchni substytutu skóry właściwej, na którą nakłada się zawiesinę hodowanych, seryjnie pasażowanych keratynocytów w początkowej gęstości 100 tysięcy komórek /cm². Cała konstrukcja jest następnie zanurzana w medium, aby komórki mogły się rozpląszczyć i pokryć powierzchnię dermis w ciągu ok. 4 dni inkubacji. Po tym czasie zmienia się stężenie jonów wapnia w pożywce z 0,08 mM do 1,8 mM i usuwa się epidermalny czynnik wzrostu.

Rozwijający się dwuwarstwowy LSE jest następnie inkubowany na granicy faz i medium jest zmieniane na pożywkę MSBM (ang. *Minimally Supplemented Basal Medium*) z 2% bydlęcej surowicy płodowej, przeznaczoną do różnicowania i stratyfikacji warstwy epidermalnej i umożliwiającą długoterminowe utrzymanie fibroblastów. Po 7–10 dniach inkubacji na granicy faz (17–20 dni *in vitro*) LSE jest przygotowany do użycia klinicznego.

Hodowane komórki wykorzystywane w praktyce klinicznej muszą być poddane dokładnemu badaniu na obecność patogenów i tumorogenność. Ponieważ jest to kosztowny, czasochłonny proces, hodowla komórek z jednego, znanego źródła jest bezpieczna i stanowi najbardziej efektywną drogę produkcji dużej ilości materiału do użytku klinicznego. Dermalne fibroblasty i naskórkowe keratynocyty pochodzą zwykle z napletków noworodkowych.

Skóra z napletka jest wielokrotnie przepłukiwana w soli fizjologicznej w obecności 50 µg/mL gentamycyny i 250 µg/mL amfoterycyny B. Tkanka jest następnie powierzchniowo odkażana przez 1-minutowe przepłukiwanie w 95% etanolu i przeniesiona do PBS. Oczyszcza się następnie skórę z tkanki podskórnej, a 1/4 napletka traktuje się mieszaniną trypsyny (1,2 mg/mL) i kolagenazy (5 mg/mL). Otrzymaną zawiesinę komórek umieszcza się w naczyniach hodowlanych z pożywką DMEM10 NBCS w celu uzyskania pierwotnej hodowli fibroblastów. Pozostałe 3/4 tkanki rozdrabnia się mechanicznie na 1–2 mm² kawałki i nakłada się do naczyń wielodołkowych pokrytych kolagenem w celu uzyskania pierwotnej hodowli keratynocytów. Kiedy uzyska się w hodowli pierwotnej keratynocyty i fibroblasty, pasażuje się je i hoduje w odpowiednio zdefiniowanych pożywkach hodowlanych.

Z kolei namnożone komórki bankuje się – fibroblasty zwykle po 5–6 pasażu, keratynocyty po 3 pasażu.

Reaktywność immunologiczna

Żywy ekwiwalent skóry ma dwie główne komponenty, które potencjalnie mogą wywoływać reakcję immunologiczną: komórki i kolagen. Jednakże komórki układu immunologicznego naskórka (komórki Langerhansa) są eliminowane podczas serii pasażów keratynocytów w mediach zdefiniowanych tylko dla keratynocytów. Komórki są wcześniej testowane *in vitro* na zdolność wywoływania odpowiedzi komórkowej. Oba typy komórek traktowane interferonem gamma w celu ekspresji antygenów zgodności tkankowej II nie wykazują odpowiedzi immunologicznej w reakcji mieszanych limfocytów (ang. *mixed lymphocyte reaction*). Kolagen testowano na małej grupie wolontariuszy, którym wstrzykiwano 1 mg dawki kolagenu. Nie stwierdzono wczesnej i późnej reakcji immunologicznej, a także reakcji komórkowej na kolagen.

Tworzenie żywego ekwiwalentu skóry (LSE) to złożony proces, w którym można kontrolować rozmiar przygotowanego substytutu, utrzymywana jest polarność

warstw, a materiał, z którego powstaje LSE, jest łatwo dostępny i produkt może być dostarczony do klinik bez uszkodzeń.

PODSUMOWANIE

Wytwarzane *in vitro* żywe substytuty skóry są stosowane w nielicznych ośrodkach klinicznych na świecie, mimo że w toku wieloletnich udoskonaleń okazały się skutecznym środkiem leczniczym w gojeniu ran, nierzadko ratującym życie. Niewątpliwym utrudnieniem w ich stosowaniu są koszty produkcji. Obok zastosowań klinicznych rekonstruowana skóra znajduje również wykorzystanie w badaniach podstawowych np. do badania procesów reepitelializacji, czynników wpływających na efektywność wgajania się przeszczepów, toksyczności rozmaitych substancji, a także reakcji immunologicznych po przeszczepie tkanki [13, 21, 28, 32, 51].

PIŚMIENNICTWO

- [1] ARÁMBULA H, SIERRA-MARTÍNEZ E, GONZÁLEZ-AGUIRRE NE, RODRÍGUEZ-PÉREZ A, JUAREZ-AGUILAR E, MARSCH-MORENO M, KURI-HARCUCH W. Frozen human epidermal allogeneic cultures promote rapid healing of facial dermabrasion wounds. *Dermatol Surg* 1999; **25**: 708–712.
- [2] BEELE H, NAEYAERT JM, GOETEYN M, De MIL M, KINT A. Repeated cultured epidermal allografts in the treatment of chronic leg ulcers of various origins. *Dermatologica* 1991; **183**: 31–35.
- [3] BERTHOD F, ROUABHIA M. Exhaustive review of clinical alternatives for damaged skin replacement. [w] Rouabhia M [red.] Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin: Landes Bioscience 1997: 23–45.
- [4] BOYCE ST. Cultured skin for wound closure. [w] Rouabhia M [red.] Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin: Landes Bioscience 1997: 75–102.
- [5] BURKE JF. Observations on the development and clinical use of artificial skin – an attempt to employ regeneration rather than scar formation in wound healing. *Jpn J Surg* 1987; **17**: 431–438.
- [6] CHOUINARD N, LEBLANC R, ROUABHIA M. *In vitro* engineered human skin substitutes for UVB harmful effect assessment. [w] Rouabhia M [red.] Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin: Landes Bioscience 1997: 153–175.
- [7] COMPTON CC. Cultured epithelial autografts for burn wound resurfacing: review of observations from an 11-year biopsy study. *Wounds* 1996; **8**: 125–133.
- [8] COMPTON CC, HICKERSON W, NADIRE K, PRESS W. Acceleration of skin regeneration from cultured epithelial autografts by transplantation to homograft dermis. *J Burn Care Rehabil* 1993; **14**: 653–662.
- [9] CONY M, DONATIEN PH, BEYLOT C, GÉNIAUX M, MALEVILLE J, BÉZIAN JH, TAĐEB A. Treatment of leg ulcers with an allogeneic cultured-keratinocyte-collagen dressing. *Clinic Exp Dermatol* 1990; **15**: 410–414.
- [10] CIEŚLIK K, DRUKAŁA J, ŻABIŃSKA E, KOROHODA W. Zastosowanie hodowanych *in vitro* keratynocytów w leczeniu trudno gojących się ran podudzia. *Przegląd Dermatologiczny* 1998; **5**: 353–359.

- [11] DUINSLAEGER L, VERBECEN G, REPER P, DELAEY B, VANHALLE S, VANDERKELLEN A. Lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft-covered burn wounds with efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures. *Plast Reconstr Surg* 1996; **98**: 110–117.
- [12] EAGLSTEIN WH, IRIONDO M, LASZLO K. A composite skin substitute (Graftskin) for surgical wounds. *Dermatol Surg* 1995; **21**: 839–843.
- [13] GARLICK JA, TAICHMAN LB. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Invest* 1994; **70**: 916–924.
- [14] GOBET R, RAGHUNATH M, ALTERMATT S, MEULI-SIMMEN C, BENATHAN M, DIETL A, MEULI M. Efficacy of cultured epithelial autografts in pediatric burns and reconstructive surgery. *Surgery* 1997; **121**: 654–661.
- [15] HANSBROUGH JF, MORGAN J, GREENLEAF G, PARIKH M, NOLTE C, WILKINS L. Evaluation of Graftskin* composite grafts on full-thickness wounds on athymic mice. *J Burn Care Rehabil* 1994; **15**: 346–353.
- [16] HARVIMA IT, VIRNES S, KAUPPINEN L, HUTTUNEN M, KIVINEN P, NISKANEN L, HORSMANHEIMO M. Cultured allogeneic skin cells are effective in the treatment of chronic diabetic leg and foot ulcers. *Acta Derm Venerol (Stockh)* 1999; **79**: 217–220.
- [17] HICKERSON WL, COMPTON C, FLETCHALL S, SMITH LR. Cultured epidermal autografts and allodermis combination for permanent burn wound coverage. *Burns* 1994; **20**: S52–S56.
- [18] HUNT TK, HOPF HW. Wound healing and wound infection. *Wound Healing* 1997; **77**: 587–606.
- [19] KAGEYAMA H, KUROYANAGI Y. Pre-clinical experiment of hyaluronic acid spongy sheet: the effect of a synthetic antithrombin agent. *Wounds* 1995; **7**: 220–227.
- [20] KUROYANAGI Y, KENMOCHI M, ISHIHARA S, TAKEDA A, SHIRAIISHI A, OOTAKE N, UHINUMA E, TORIKAI K, SHIOYA N. A cultured skin substitute composed of fibroblasts and keratinocytes with a collagen matrix: preliminary results of clinical trials. *Ann Plast Surg* 1993; **31**: 340–351.
- [21] KUROYANAGI Y, SHIRAIISHI A, TANAKA M, KAGEYAMA H, OOTAKE N, SHIOYA N. Cytotoxicity tests for antimicrobial agents using cultured skin substitutes fixed at interface of air and culture medium. *J Biomater Sci Polymer Edn* 1996; **7**: 1005–1015.
- [22] LANGDON RC, CUONO CB, BIRCHALL N, MADRIJA, KUKLINSKA E, McGUIRE J, MOELLMANN GE. Reconstruction of structure and cell function in human skin grafts derived from cryopreserved allogeneic dermis and autologous cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1988; **91**: 478–485.
- [23] LIMAT A, MAURI D, HUNZIKER T. Successful treatment of chronic ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer sheath cells. *J Invest Dermatol* 1996; **107**: 128–135.
- [24] LINDGREN C, MARCUSSEN JA, TOFTGLRD R. Treatment of venous leg ulcers with cryopreserved cultured allogeneic keratinocytes: a prospective open controlled study. *Br J Surg* 1998; **139**: 271–275.
- [25] ŁAWNICZEK T, BOGDANOWSKI T, BIAŁAS B, WYGŁĘDOWSKA-KANIA M, PALEŃ P, TUSTANOWSKI J. Allogeniczne keratynocyty z hodowli – próba zastosowania w owrzodzeniach żyłakowych podudzi. *Przegląd Dermatologiczny* 1995; **4**: 298–302.
- [26] MATSUDA K, SUZUKI S, ISSHIKI N, YOSHIOKA K, WADA R, HYON SH, IKADA Y. Evaluation of a bilayer artificial skin capable of sustained release of an antibiotic. *Biomaterials* 1992; **13**: 119–122.
- [27] McKAY I, WOODWARD B, WOOD K, NAVSARIA HA, HOEKSTRA H, GREEN C. Reconstruction of human skin from glycerol-preserved allodermis and cultured keratinocyte sheets. *Burns* 1994; **20**: S19–S22.

- [28] MONTEIRO-RIVIERE NA, INMAN AO, SNIDER TH, BLANK JA, HOBSON DW. Comparison of an *in vitro* skin model to normal human skin for dermatological research. *Microsc Res Tech* 1997; **37**: 172–179.
- [29] MYERS S, NAVSARIA H, SANDERS R, GREEN C, LEIGH I. Transplantation of keratinocytes in the treatment of wounds. *Am J Surg* 1995; **170**: 75–83.
- [30] NAVSARIA HA, MYERS SR, LEIGH IM, McKAY IA. Culturing skin *in vitro* for wound therapy. *Trends in Biotechnology* 1995; **13**: 91–100.
- [31] NUÑEZ-GUTIÉRREZ H, CASTRO-MUÑOZLEDO F, KURI-HARCUCH W. Combined use of allograft and autograft epidermal cultures in therapy of burns. *Plast Reconstr Surg* 1996; **98**: 929–939.
- [32] PARENTEAU N, SABOLINSKI M, PROSKY S, NOLTE C, OLESON M, KRIWET K, BILBO P. Biological and physical factors influencing the successful engraftment of a cultured human skin substitute. *Biotechnol Bioeng* 1996; **52**: 3–14.
- [33] PARENTEAU NL, BILBO P, NOLTE CJM, VALERIE S, ROSENBERG M, ROSENBERG M. The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology* 1992; **9**: 163–171.
- [34] PELLEGRINI G, BONDANZA S, GUERRA L, De LUCA M. Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comput* 1998; **36**: 778–790.
- [35] PHILLIPS TJ. Cultured epidermal allografts – a temporary or permanent solution? *Transplantation* 1991; **51**: 937–941.
- [36] PHILLIPS TJ. Biologic Skin Substitutes. *J Dermatol Surg Oncol* 1993; **19**: 794–800.
- [37] PHILLIPS TJ. Keratinocyte Grafts for Wound Healing. *Clin Dermatol* 1994; **12**: 171–181.
- [38] PHILLIPS TJ. New Skin for Old. Developments in Biological Skin Substitutes. *Arch Dermatol* 1998; **134**: 344–349.
- [39] PHILLIPS TJ, GILCHREST BA. Clinical Applications of Cultured Epithelium. *Epith Cell Biol* 1992; **1**: 39–46.
- [40] REGAUER S, COMPTON CC. Cultured keratinocyte sheets enhance spontaneous re-epithelialization in a dermal explant model of partial-thickness wound healing. *J Invest Dermatol* 1990; **95**: 341–346.
- [41] RENNEKAMPFF HO, HANSBROUGH JF, KIESSING V, ABIEZZI S, WOODS VJ. Wound closure with human keratinocytes cultured on a polyurethane dressing overlaid on a cultured human dermal replacement. *Surgery* 1996; **120**: 16–22.
- [42] ROUABHIA M. *In vitro* production and transplantation of immunologically active skin equivalents. *Lab Invest* 1996; **75**: 503–517.
- [43] ROUABHIA M. Structural and functional complexity of the skin. [w] Rouabhia M [red.]. Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin: Landes Bioscience 1997: 3–22.
- [44] ROUABHIA M, GERMAIN L, AUGER FA. Cultured epithelium for skin trauma treatment: clinical and experimental studies. *Transplant P* 1993; **25**: 2348–2349.
- [45] SABOLINSKI ML, ALVAREZ O, AULETTA M, MULDER G, PARENTEAU NL. Cultured skin as a smart material for venous ulcers. *Biomaterials* 1996; **17**: 311–320.
- [46] SAINTIGNY G, BONNARD M, DAMOUR O, COLLOMBEL C. Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effects of fibroblasts. *Acta Derm-Venerol* 1993; **73**: 175–180.
- [47] SEAH CS. Skin graft and skin equivalent in burns. *Ann Acad Med* 1992; **21**: 685–688.
- [48] SIWY BK, COMPTON CC. Cultured epidermis: Indiana University Medical Centers experience. *J Burn Care Rehabil* 1992; **13**: 130–137.
- [49] SPENCERJ, WONG L. The enhancement of wound healing with human skin allograft. *Wound Healing* 1997; **77**: 731–745.

- [50] STARK GB, KAISER HW. Cologne Burn Centre experience with glycerol-preserved allogeneic skin: Part II: Combination with autologous cultured keratinocytes. *Burns* 1994; **20**: S34–S38.
- [51] STRANDE LF, FOLEY ST, DOOLIN EJ, HEWITT CW. *In vitro* bioartificial skin culture model of tissue rejection and inflammatory/immune mechanism. *Transplant P* 1997; **29**: 2118–2119.
- [52] WILKINS LM, WATSON SR, PROSKY SJ, MEUNIER SF, PARENTEAU NL. Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnol Bioeng* 1994; **43**: 747–756.
- [53] WOLLINA U, KNÖLL B, PRÜK, BARTH A, MÜLLER D, HUSCHENBECK J. Synthetic wound dressings – evaluation of interactions with epithelial and dermal cells *in vitro*. *Skin Pharmacol* 1996; **9**: 35–42.
- [54] YANNAS IV, BURKE JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* 1980; **14**: 65–81.
- [55] YANNAS IV, BURKE JF, GORDON PL, RUBENSTEIN RH. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res* 1980; **14**: 107–131.

31-120 Kraków, al. Mickiewicza 3
e-mail: Justyna@mol.uj.edu.pl