

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**  
**DOTTORATO DI RICERCA IN TRAUMATOLOGIA**  
**XXIII CICLO**

---

Dott. Antonio Brancati

**L'INTERESSE DEI SOSTITUTI DERMICI NELLA**  
**TRAUMATOLOGIA DEGLI ARTI**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**COORDINATORE:**

**Prof. Antonino Buffone**

**TUTOR:**

**Prof. Rosario Perrotta**

---

***TRIENNIO 2007 - 2010***

# Sommario

<b>1 - Introduzione .....</b>	<b>3</b>
<b>2 – Funzione della cute normale e caratteristiche richieste ai sostituti dermici .....</b>	<b>5</b>
<b>3 – Differenti tipi di sostituti dermici .....</b>	<b>13</b>
Derivati biologici naturali .....	14
Derivati biologici di sintesi.....	17
Derivati di sintesi .....	22
<b>4 - I sostituti dermici.....</b>	<b>29</b>
Derivati biologici naturali .....	33
Derivati biologici di sintesi.....	38
Derivati di sintesi .....	46
<b>5 - Casi clinici .....</b>	<b>49</b>
Caso clinico: Matriderm® .....	50
Caso clinico: Integra® double-layer .....	53
Caso clinico: Hyalomatrix PA® .....	55
<b>6- Discussione e ricerche cliniche .....</b>	<b>59</b>
Ricerche cliniche .....	78
<b>7- Conclusioni .....</b>	<b>96</b>
<b>8 - Bibliografia .....</b>	<b>99</b>

# 1

## Introduzione

Da sempre, nella storia della medicina, ci si è trovati di fronte alla necessità di dover rimpiazzare, a causa dei differenti tipi di traumi, la cute, l'organo più grande del corpo umano.

Storicamente, nei gravi traumi (come le ustioni estese e le grosse perdite di sostanza dei tessuti molli) la maggiore importanza era data alla sopravvivenza del traumatizzato; minore attenzione era posta al recupero della funzionalità dell'organo traumatizzato.

Per decenni, i chirurghi plastici di tutto il mondo hanno cercato di rimpiazzare la cute lesa con dei prelievi allogenici, praticati su cadavere.

Questa tecnica è ancora oggi utilizzata da molti chirurghi ricostruttivi, soprattutto nei vari Centri Ustioni.

È durante la I e la II guerra mondiale che si pone l'esigenza, per il chirurgo, di far fronte a vaste perdite di sostanza e a soldati gravemente ustionati, per cui la pelle sana non era sufficiente a causa della vastità delle lesioni.

Alcuni precursori dei sostituti cutanei furono trovati durante la II guerra mondiale, facendo supporre la possibilità che si possa introdurre nel corpo umano una sostanza estranea biocompatibile.

Con l'avvenuto miglioramento delle tecniche rianimatorie nelle terapie intensive e nei centri ustioni, si è avuto un aumento della percentuale dei sopravvissuti ai gravi traumi. L'escissione delle zone ustionate e la ricostruzione dei tessuti traumatizzati conferma, ancora oggi, l'innesto cutaneo come *gold standard*,

ma fa sorgere nuovi problemi, prima impensabili, come ad esempio il ripristino completo della funzionalità della parte traumatizzata e la possibilità di minimizzare le cicatrici restanti e di renderle il più possibile accettabili ed invisibili.

Tutto questo ha incoraggiato lo sviluppo della ricerca sui sostituti cutanei, che negli ultimi trent'anni hanno visto un boom di produzione e di interesse.

Malgrado gli sforzi fatti in laboratorio, l'applicazione clinica dei sostituti dermici, alle volte non porta sul paziente i risultati sperati, che sono stati osservati sull'animale in laboratorio.

Ancora oggi, c'è una certa mancanza delle conoscenze biologiche sulla progettazione, sull'uso dei vari tipi di biomateriali e sulla loro influenza nei tessuti circostanti. Il nostro obiettivo è quello di fare il punto sullo stato d'arte attuale dei differenti sostituti dermici, dalle conoscenze biologiche alle applicazioni cliniche.

## 2

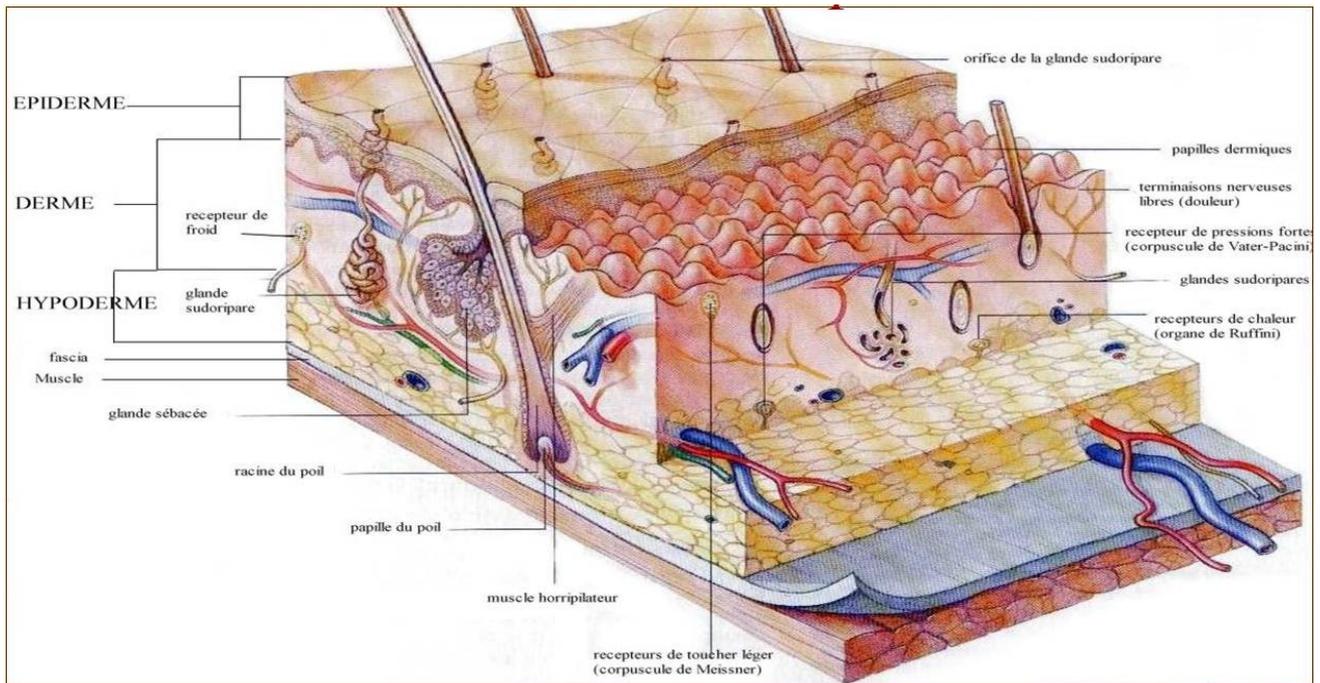
### **Funzione della cute normale e caratteristiche richieste ai differenti sostituti dermici.**

Anatomicamente e funzionalmente la cute è composta da due strati:

1. Lo strato superficiale, l'epidermide, che ha lo scopo di far da barriera e proteggere l'organismo dalle infezioni e dalle perdite idriche.
2. Lo strato più profondo, il derma, che ha il compito di assicurare l'elasticità e l'integrità meccanica della cute; questo strato contiene i vasi sanguigni, responsabili della nutrizione dei tessuti periferici e dell'epidermide e della termoregolazione.

Il derma è attraversato dai bulbi piliferi, dalle ghiandole sudoripare e dalle terminazioni nervose sensitive, che raggiungono o sboccano sull'epidermide.

La rigenerazione epidermica ed il rinnovamento degli strati cutanei più superficiali è assicurato dallo strato basale, strato più profondo delle cellule epidermiche, che differenziandosi perdono il nucleo cellulare e si trasformano in tessuto corneo esteriorizzandosi progressivamente.



**Fig.1:** Struttura della cute normale

La capacità della cute lesa, di potersi rigenerare e restaurare la propria funzionalità, è assicurata dalla presenza di cellule epidermiche nello strato più profondo della ferita e dall'integrità del derma sottostante; la cicatrizzazione avverrà dai margini della ferita e sarà insufficiente se quest'ultima è più grande di qualche centimetro.

È per questo che il processo di guarigione delle ferite più estese necessita di una copertura che abbia una funzione di barriera e di protezione dalle infezioni, dalla perdita di liquidi e favorisca la crescita e lo sviluppo del tessuto di granulazione. Questi materiali di copertura delle ferite sono molto importanti nei gravi traumatizzati, dove creano ed accrescono un ambiente adatto alla formazione ed

allo sviluppo del tessuto di granulazione, provvedendo da barriera contro le infezioni e le perdite ematiche.

In funzione di tutto questo, sono fondamentali alcune caratteristiche fisiche e chimiche, intrinseche al sostituto dermico, che devono essere tenute presenti, rispettate e mantenute durante il processo di fabbricazione.

Tra le **proprietà fisiche** dobbiamo ricordare: la perdita di fluidi e di umidità, la capacità a modellarsi e conformarsi alla ferita, la resistenza a forze tangenziali, l'elasticità, la resistenza all'esfoliazione, l'impermeabilità alle infezioni, la sua porosità e struttura tridimensionale, la sua capacità ad essere maneggiato facilmente e la possibilità di sutura ai margini della ferita.

Tra le **proprietà chimiche** si devono includere: la biodegradazione e l'integrazione all'organismo, l'assenza di metaboliti tossici, un'antigenicità nulla o tale da non provocare una reazione infiammatoria o una reazione da corpo estraneo, la capacità di essere colonizzata da cellule dell'organismo ospite, di permettere la sintesi di un nuovo derma, la prevenzione di un'infezione e di una contrazione cicatriziale abnorme e la formazione di una cicatrice (Burke JF, 1981).

I sostituti dermici necessitano, che tutte queste caratteristiche fisiche e chimiche, siano riprodotte in caratteristiche meccaniche finali durante la fabbricazione (Tab.1).

### Caratteristiche generali dei sostituti dermici.

- A. Protezione della ferita dalle infezioni e perdita di liquidi;
- B. Fornire una matrice stabile e biodegradabile che permetta la neosintesi di un tessuto dermico;
- C. Capacità di colonizzazione e d'immuno-compatibilità per permettere un'integrazione della matrice ai tessuti dell'ospite, producendo un tessuto dermico piuttosto che un tessuto cicatriziale;
- D. Facilità nel maneggiare il sostituto e resistenza alle forze meccaniche a cui è sottoposto.

**Tabella 1:** Caratteristiche generali dei sostituti dermici

**Protezione della ferita dalle infezioni e perdita di liquidi:** E' possibile ottenere una protezione alle infezioni della perdita di sostanza e alla perdita di liquidi dalla ferita aggiungendo al sostituto dermico una copertura impermeabile. Questa opportunità è stata ottenuta per la prima volta aggiungendo alla matrice uno strato sottile di silicone, che viene ritirato al momento del completo attecchimento della placca e rimpiazzato da un auto-innesto cutaneo a spessore parziale. Questa procedura è nota come *Two-step procedure*.

La vascolarizzazione della matrice dermica avviene in modo progressivo e dura circa tre settimane, periodo durante il quale rimane purtroppo presente un rischio d'infezione (Leffler L, 2010; Chun-Wui Kang G, 2010; Bargues L, 2009). Questo è il maggiore inconveniente di questa tecnica.

Per questo motivo, una seconda strategia è stata sviluppata. Questo metodo è noto come *one-step procedure*: nella stessa seduta operatoria è possibile, dopo aver praticato la toilette chirurgica, posizionare la matrice dermica sulla perdita di sostanza e coprirlo con un autoinnesto cutaneo a spessore parziale.

Questo metodo permette un processo di guarigione più rapido e semplice, ma l'attecchimento cutaneo è reso più difficile dalla matrice. Purtroppo, non tutti i materiali utilizzabili attualmente permettono questo tipo di soluzione. La possibilità o meno di poter utilizzare una *one-step procedure* dipende dalla dimensione dei pori della matrice e dalla possibilità di imbibizione della matrice con conseguente colonizzazione cellulare della matrice stessa; tutto questo sarà discusso di seguito.

La copertura temporanea della ferita può essere praticata, non solamente con la matrice dermica definitiva, ma tramite delle medicazioni biologiche, più o meno sofisticate, in grado di migliorare la situazione locale della ferita per permettere poi in un solo tempo operatorio la chiusura definitiva della perdita di sostanza (Lineen E, 2008; Whitaker IS, 2008; Uhlig C, 2007).

**Fornire una matrice stabile e biodegradabile che permetta la neosintesi di un tessuto dermico:** Altra caratteristica chiave di un'ideale matrice dermica è legata alla stabilità ed alla biodegradabilità di quest'ultima, permettendo così la sua progressiva trasformazione in un neoderma funzionale. Ad oggi non si è ancora in grado di affermare il tempo esatto di permanenza della matrice nei tessuti.

Nell'uomo, la proliferazione/migrazione delle cellule all'interno della matrice necessita all'incirca di tre settimane. A tre settimane, la matrice dermica permette alle cellule colonizzatrici (fibroblasti, angioblasti, miofibroblasti, keratinociti) di trovare una struttura tridimensionale colonizzabile simile ad un derma umano.

La stabilità di una matrice può essere aumentata con processi fisici e/o chimici di cross-linking (McKegney M, 2001; Nishi C, 1995; Yannas IV, 1980), ma facendo sempre attenzione agli effetti negativi sul processo di cicatrizzazione dovuto alla tossicità organica dei residui chimici utilizzati nel cross-linking o dalla presenza eccessivamente prolungata della matrice stessa, comportando una reazione abnorme tipo reazione da corpo estraneo.

La biodegradabilità della matrice dovrebbe intervenire in questo momento esatto, permettendo una buona colonizzazione "guidata" delle cellule interessate, senza indurre una reazione eccessiva tipo reazione da corpo estraneo.

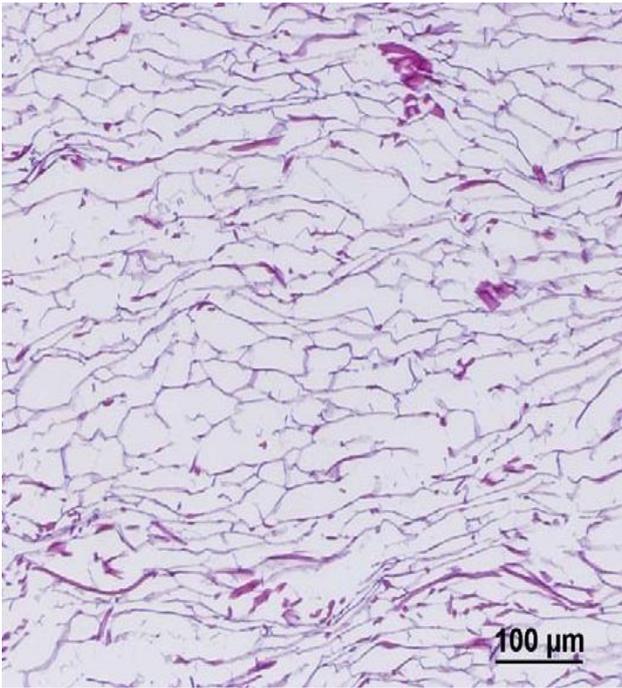
La matrice dovrebbe essere composta da un materiale immuno-compatibile, tale da non attivare dei processi immuno-reattivi.

I primi studi sul componente principale delle matrici, hanno dimostrato che il collagene ricostituito, sia nelle matrici dermiche definitive che in quelle a scopo di medicazione temporanea, sia il miglior costituente di base. In particolare Grillo e Gross hanno dimostrato che la quantità di collagene che viene riassorbito e

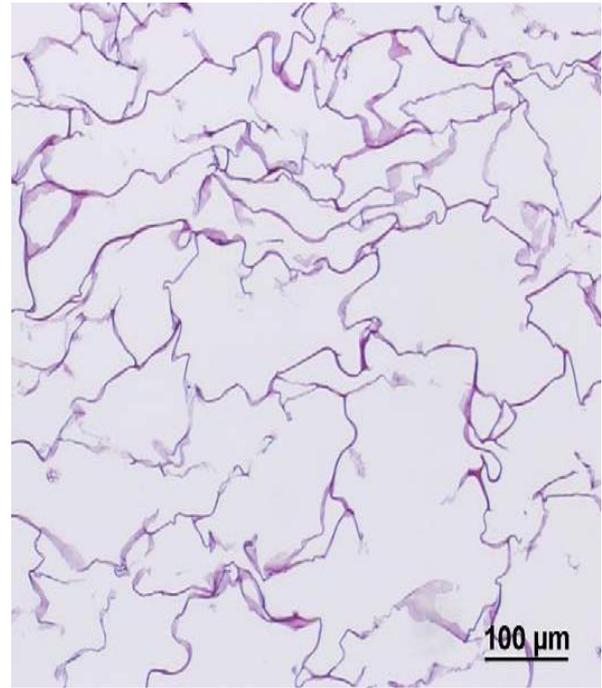
degradato diminuisce se questo è cross-linked con la formaldeide e la risposta immunitaria è alquanto bassa.

Yannas e Burke (Yannas IV, 1980), padri del futuro Integra<sup>®</sup> nel 1980, ebbero l'idea di costruire una protesi dermica biodegradabile che potesse eventualmente essere completamente sostituita dall'organismo con un nuovo tessuto e successivamente pienamente integrato dall'organismo. Questi autori crearono più tardi il primo Integra TM, una membrana bistrato che permetteva di rimpiazzare la cute; a sei settimane dopo aver effettuato la sua copertura con un autoinnesto a spessore parziale, all'esame istologico era possibile ritrovare un'interfaccia dermo-epidermica simile al derma umano normale. Non era più ritrovabile del collagene bovino ed il derma era completamente identico a quello umano.

**Capacità di colonizzazione e d'immuno-compatibilità:** In generale, la migrazione cellulare stimolata dalla matrice dermica è influenzata dalla composizione, dalle dimensioni dei pori e dalla biodegradabilità del sostituto dermico (Wang H, 2005; Suzuki S, 1990; Dagalakis N, 1980) (fig 2-3).



**Fig. 2:** Matriderm<sup>®</sup> al MO, colorazione HE



**Fig. 3:** Integra<sup>®</sup> al MO, colorazione HE

Il concetto di colonizzazione cellulare può essere veramente attraente da un punto di vista scientifico e funzionale. La scelta del tipo cellulare (allogenico vs autologo), la progettazione di un sostituto pronto all'uso o da fabbricare in funzione delle necessità, le complicazioni legate alle procedure di culture cellulari sono alcune delle difficoltà associate ai tessuti di bioingegneria di sintesi o provenienti da vivente (Hernon CA, 2007; Lamme EN, 2002).

**Facilità nel maneggiare il sostituto:** Infine, per il chirurgo dovrebbe essere possibile posizionare la matrice dermica e questa essere capace di resistere a forze di trazione, entro certi limiti, specialmente quando applicata su zone difficili come: il dorso, le articolazioni, il bacino, i glutei.

# 3

## Differenti tipi di sostituti dermici.

Nella classificazione dei vari sostituti dermici possiamo distinguere due grandi categorie con scopi ben differenti:

1. Sostituti dermici atti alla copertura temporanea della perdita di sostanza;
2. Sostituti dermici atti alla cicatrizzazione della perdita di sostanza.

Tutti questi composti possono essere differenziati secondo la loro origine in tre grandi gruppi:

- Derivati biologici naturali;
- Derivati biologici di sintesi;
- Derivati di sintesi.

## **Derivati biologici naturali**

Questa classe di derivati consiste in materiali provenienti da tessuti di cadavere umano ed animale, che sono stati trattati per produrre una matrice acellulare da utilizzare come matrice dermica.

I vantaggi di questi materiali sono innanzitutto dati dal fatto che essi hanno una struttura, perfettamente o quasi, identica al derma dell'ospite. Questa struttura tridimensionale, malgrado i vari passaggi di sterilizzazione e di eliminazione cellulare, resta comunque integra.

Il grosso svantaggio é che, purtroppo, questi derivati allogenici possono essere oggetto di una reazione di rigetto da parte dell'ospite e quindi, per questo motivo sono utilizzati come medicazioni biologiche temporanee, piuttosto che come sostituti dermici permanenti.

I derivati biologici naturali derivati da cadavere possono essere causa di trasmissione di malattie virali. Un accurato screening è fatto sui derivati di natura umana per poter ridurre al minimo tale rischio, anche se, purtroppo non è possibile eliminarlo del tutto.

La cute allogenica, proveniente da cadavere, resta in loco, come medicazione biologica per circa 12-21 giorni dall'applicazione a causa della risposta immunitaria dell'ospite ai residui cellulari del donatore. Le varie tecniche per eliminare le cellule del donatore sono estremamente aggressive e possono alterare la struttura e la composizione del derma. Ghosh (Ghosh MM, 1997) ha dimostrato che i processi di sterilizzazione tramite ossido d'etilene o con raggi  $\gamma$  possono provocare alterazioni alla struttura dermica, mentre un processo con glicerolo sembra avere effetti deleteri minori sulla struttura del derma. Questa é fondamentale nel processo di cicatrizzazione, perché permette la migrazione dei fibroblasti, che formeranno il neoderma ed inibiranno la produzione incontrollata ed abnorme di tessuto cicatriziale.

Un'altra importante caratteristica di questi materiali é che generalmente tutti contengono la membrana basale del derma papillare. Vari studi (Ralston DR, 1999; Krejci NC, 1991) hanno dimostrato che la presenza della membrana basale permette una maggiore aderenza, crescita e differenziazione dei keratinociti. Questa azione é caratterizzata dalla presenza della laminina e del collagene tipo IV nella membrana basale. Sahota et al (Sahota PS, 2003) hanno pubblicato uno studio sulla problematica percentuale di attecchimento dei sostituti dermici di origine biologica (da cadavere). Questo studio pone l'attenzione sul fatto che le cellule endoteliali

penetrano meno velocemente nei sostituti dermici di origine naturale e che questa migrazione diviene più veloce se il derma è danneggiato. La quantità di fibre collagene, in questi sostituti dermici, è elevata e presenta un problema alla rapida colonizzazione in vivo.

## Derivati biologici di sintesi

Questa classe di sostituti dermici deriva da molecole biologiche purificate, liofilizzate che vengono incorporate in matrici sintetizzate in laboratorio.

Le matrici sintetiche di origine naturale sono generalmente costituite da collagene come costituente principale. La struttura tridimensionale del collagene della matrice è controllata tramite diversi processi di congelamento a secco a cui viene sottoposta per poter regolare la dimensione dei pori e la connessione tra essi durante i processi di produzione della matrice. L'uso di questa matrice presenta certamente dei vantaggi, ma anche alcuni svantaggi.

Il principale vantaggio, nella produzione in laboratorio di una matrice cellulare, è quello di poter utilizzare delle molecole (generalmente collagene) e dei componenti naturali, riconosciuti come "self" dall'organismo ospite, che non stimolano un rigetto a causa di una risposta immunitaria, tipo reazione da corpo estraneo. La natura ed il grado d'immunogenicità del collagene rimane ancora alquanto sconosciuto. È stato dimostrato (Delustro F, 1990) che i telopeptidi situati sulla parte terminale della struttura tri-elica del collagene possono provocare una reazione immunitaria e che la rimozione di questa struttura produce un atelo-collagene che è meglio tollerato dall'organismo.

Le cellule si attaccano alla membrana extracellulare tramite specifici recettori, le integrine. La maggior parte delle integrine riconoscono questa sequenza di amminoacidi, come la fibronectina, la vitronectina e le sequenze RGD (fig.4). L'interazione con queste sequenze RGD permette alle cellule di attaccarsi a queste fibre. I fibroblasti ed i cheratinociti secernono le metallo-proteasi (MMPs), che sono in grado di rimodellare ed alterare la struttura della matrice extra-cellulare. L'azione associata delle integrine e delle MMPs permette alle cellule di migrare all'interno di questi materiali e di rimodellarli per poter infine essere integrati completamente dall'organismo ospite.

Per poter permettere alle matrici dermiche di restare nell'area d'impianto, sufficientemente a lungo da essere efficaci nella promozione del processo di guarigione, spesso è necessario effettuare un cross-linking del collagene strutturale per poterne rinforzare la stabilità.

Il cross-linking è un processo di "accoppiamento" di un materiale ad un altro, tale da poter alterarne la struttura e modificare il risultato dell'azione delle cellule dell'organismo su di esso. Generalmente, questo processo è usato per aumentare la stabilità della matrice dermica, ma può avere effetti deleteri sul processo di cicatrizzazione.

Se la matrice riesce a resistere a lungo all'azione di rimodellamento dell'organismo, porterà ad un'azione eccessiva tipo reazione da corpo estraneo con alterazione del processo di cicatrizzazione. De Vries (De Vries HJ, 1994) dimostrò, su matrici di collagene suino, che il cross-linking con glutaraldeide determinava una reazione da corpo estraneo su queste matrici rispetto alle stesse matrici non trattate con glutaraldeide.

Inoltre, si deve tener conto dei metaboliti tossici che si possono creare al momento del catabolismo di queste matrici; tali prodotti si possono avverare nefasti per il processo di cicatrizzazione ed impedirne lo sviluppo favorevole.

Yannas e Burke, durante lo sviluppo del loro precursore Integra<sup>®</sup>, trovarono che l'aggiunta di GAGs, come condroitin-6-solfato, condroitin-4-solfato, dermatan-solfato, eparan-solfato, alle matrici di collagene aumentava la loro resistenza alle collagenasi. I GAGs riescono a stabilizzare le matrici secondo differenti meccanismi (De Vries HJ, 1994).

Controllando quindi i componenti impiegati, si può arrivare ad ottenere una matrice con caratteristiche fisiche e chimiche ben precise. Sarebbe possibile, almeno sul piano teorico, poter aggiungere dei fattori di crescita e delle cellule che favorirebbero il processo di cicatrizzazione. Comunque, ancora oggi, non ci sono le

conoscenze adeguate, su quali sostanze utilizzare e quali evitare, per poter sfruttare appieno le capacità potenziali di queste matrici.

Un difetto importante di questi sostituti è che mancano della membrana basale e la loro struttura tridimensionale non è comparabile a quella del derma umano fisiologico. In questa classe di sostituti entrano di prepotenza le due matrici, probabilmente più utilizzate e più conosciute, l'Integra® ed il Matriderm®, usate principalmente nel trattamento dei gravi ustionati.

Ciascun additivo aggiunto alla matrice dermica gioca un ruolo importante e differente sulla vascolarizzazione della matrice e sulla sua integrazione.

Ad esempio, le matrici contenenti collagene/condroitin-6-solfato, come l'Integra® richiedono un protocollo *two-step procedure* per poter essere integrate adeguatamente ed infine innestate con autoinnesto parziale di cute. Questo è dovuto all'impiego, da parte dell'organismo, di tre settimane di tempo per poter adeguatamente colonizzare la matrice dermica. Altre matrici contenenti, invece, collagene/elastina, come il Matriderm®, hanno dimostrato una vascolarizzazione più importante e più evoluta, già dopo una sola settimana e per questo motivo si può effettuare una procedura *one-step* (Lamme EN, 1996).

Queste differenze nel processo di rivascolarizzazione sono spiegabili a causa del differente comportamento del condroitin-6-solfato (condroitin-solfato A) e l'elastina.

Vari studi, come quelli condotti da Luo e da Hahnenberger (Luo H, 2007; Hahnenberger R, 1991), hanno dimostrato che il condroitin-solfato A possiede capacità anti-angiogeniche, quando testato su di una matrice di membrana corionallantoidea (CAM); l'inverso accade se sulla stessa membrana è testata l'elastina. Quest'ultima ha un potere angiogenico elevato e favorisce la migrazione delle cellule muscolari lisce endoteliali.

La dimensione dei pori della matrice non sembra influenzare in questo caso la vascolarizzazione. La prova è data dal fatto che i pori della matrice Integra<sup>®</sup> sono più larghi di quelli del Matriderm<sup>®</sup> e quindi più facilmente accessibili (per ragioni fisiche) alle cellule (fig. 2-3).

## Derivati di sintesi

Strutturalmente simili alle matrici biologiche, questi sostituti dermici sono costruiti con molecole di origine non naturale e con polimeri non presenti nei tessuti umani.

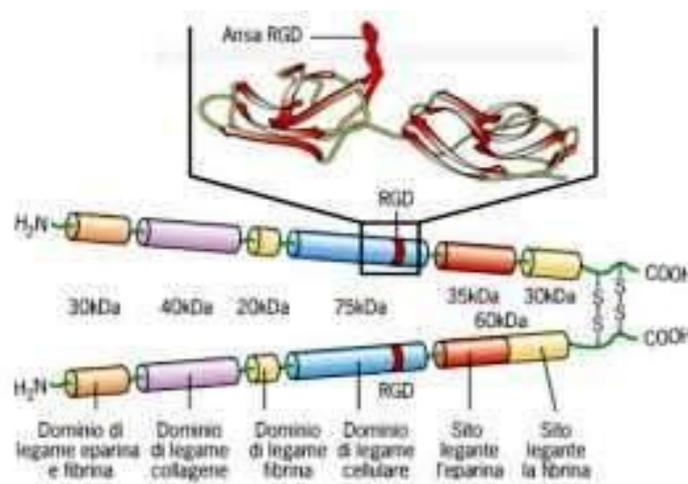
Per questa loro caratteristica, i sostituti dermici appartenenti a questa classe, pongono la maggior difficoltà nella scelta dei loro costituenti (molecole e polimeri), tali da poter essere integrati e accettati dall'ospite senza sviluppare una reazione immunitaria eccessiva, che possa sfociare in una reazione da corpo estraneo. L'utilizzo di prodotti non biologici può essere problematico, quando si cerca di sviluppare un materiale biocompatibile.

Sebbene molteplici siano i componenti sintetici ad essere stati provati in vitro o su animale (Powel HM, 2009. Blackwood KA, 2008), soltanto qualcuno è oggi utilizzato su l'uomo.

I fibroblasti e le altre cellule coinvolte nella costruzione del derma, hanno bisogno di segnali chemio-tattici e di recettori, che possano attrarle e legarle alla membrana dermica. L'interazione di queste cellule con la membrana sintetica differirà sostanzialmente dall'interazione che avviene tra cellule e ECM.

L'architettura e la composizione molecolare di questi sostituti di sintesi hanno, così come per i sostituti dermici biologici, un'azione ed un'influenza fondamentale sulla migrazione, l'adesione e la stabilità cellulare, il segnale intercellulare, etc.

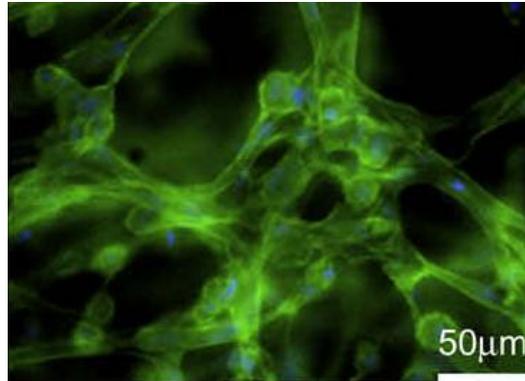
Per permettere il riconoscimento di queste matrici sintetiche come "self", da parte delle cellule dell'organismo ospite, si è pensato di integrarle con delle sequenze proteiche bio-mimetiche. Queste sequenze vengono integrate nelle matrici, permettendo il movimento cellulare. In questi anni, si è cominciato ad usare i peptidi RGD (fig.4).



**Fig. 4:** Struttura dei peptidi RGD

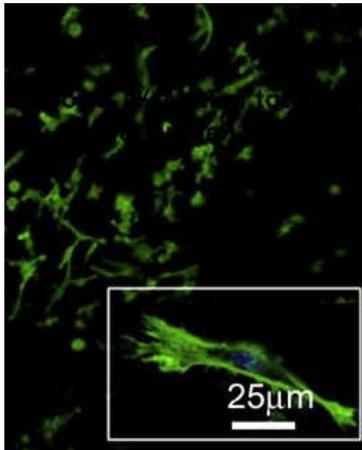
Incorporando questi peptidi-RGD in alcuni idrogel, si facilita la migrazione e la persistenza dei fibroblasti all'interno di questi materiali (fig.5), determinando ed aumentando l'interazione tra cellule e matrice e di conseguenza una contrazione

della matrice (Zhou M, 2009), dovuta all'attivazione dei fibroblasti, testimoniata dal loro cambiamento strutturale (da rotondi ad affusolati) (fig.6-7).

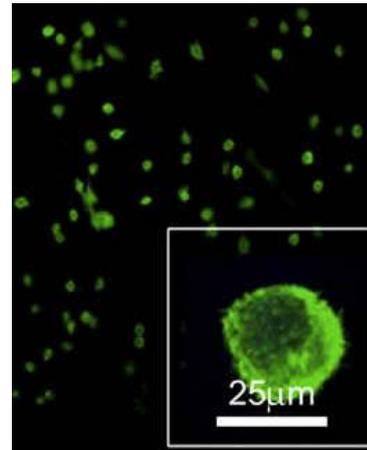


**Fig. 5:** Fibroblasti adulti umani legati alle nano fibre degli idrogel contenenti i peptidi RGD. Foto presa da: "Zhou M et al. (2009). Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells. *Biomaterials*, 13, 2523-30"

Secondo Zhou, questi idrogel, contenenti le sequenze proteiche bio-mimetiche RGD, sono in grado di promuovere l'adesione cellulare e di incapsulare i fibroblasti dermici attraverso specifici legami RGD-integrine, con conseguente riproduzione e proliferazione cellulare (fig. 5). Questi idrogel possono offrire un modello economico di matrici dermiche sostitutive per esperimenti in vitro.



**Fig. 6:** Fibroblasti con le integrine  $\alpha_5\beta_1$  libere di legarsi ai peptidi-RGD delle nano fibre degli idrogel e loro conseguente attivazione cellulare (forma affusolata). Foto presa da: "Zhou M et al. (2009). Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells. *Biomaterials*, 13, 2523-30"



**Fig. 7:** Fibroblasti con le integrine  $\alpha_5\beta_1$  saturate, incapaci di legarsi ai peptidi-RGD delle nano fibre degli idrogel e loro conseguente quiescenza cellulare (forma rotonda). Foto presa da: "Zhou M et al. (2009). Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells. *Biomaterials*, 13, 2523-30"

L'invasione cellulare della matrice porta alla metabolizzazione della matrice, che come abbiamo visto per gli altri tipi di sostituti dermici, si traduce nell'integrazione della matrice nell'organismo ospite.

Se la matrice resta in situ per molto tempo, invece, il sistema immunitario dell'ospite istaura una reazione immunitaria da corpo estraneo, cercando di eliminare la matrice incapsulandola tramite l'azione delle cellule giganti polinucleate. Questa azione dei macrofagi determina un'alterazione del processo di cicatrizzazione. Riguardo la migrazione cellulare, Lutolf (Lutolf MP, 2003) ha dimostrato come l'inclusione di sequenze di MMP degradabili negli idrogel della

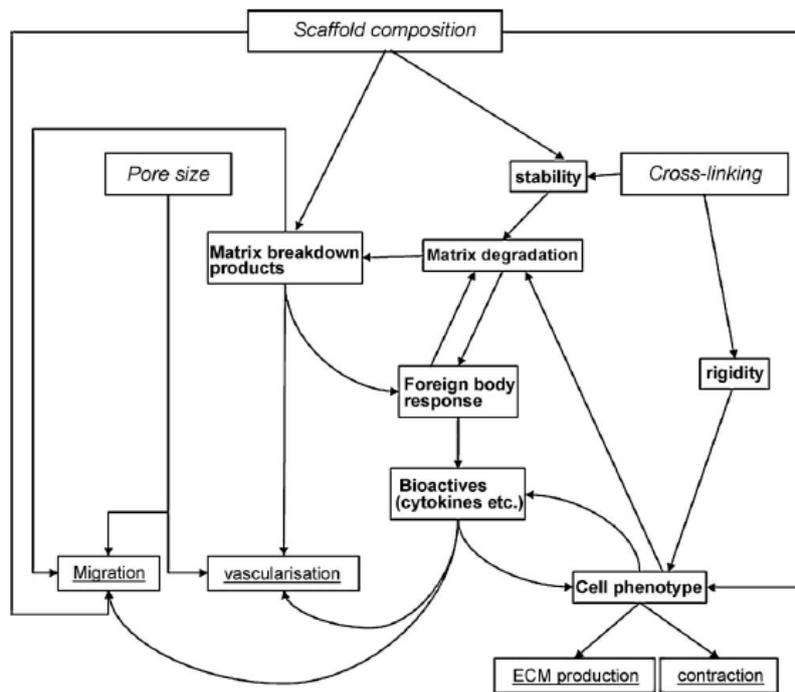
matrice sintetica, aumenti la migrazione e l'invasione di fibroblasti nella matrice, rispetto a matrici che non contengono sequenze degradabili di MMP. Inoltre, è stato dimostrato (Raeber GP, 2005) che inibendo l'attività mediata dalle MMP si inibisce la migrazione cellulare attraverso questi gel. Il grado di inibizione della migrazione cellulare, tramite inibizione delle MMP, è altamente dipendente dalla dimensione dei pori della matrice. In matrici con pori molto piccoli ( $\sim 25 \mu\text{m}$ ), come quelli degli idrogel usati in questi studi, l'inibizione delle MMP comporta un'inibizione completa della migrazione cellulare. Quando i pori della matrice sono leggermente più grandi la migrazione cellulare appare meno dipendente dalle MMP. Se i pori sono dell'ordine di  $1\text{-}10 \mu\text{m}$ , come nelle matrici di collagene, la migrazione non è influenzata dall'inibizione delle MMP, suggerendo che pori di larga taglia permettono ai fibroblasti di migrare senza aver bisogno di una proteolisi (Wolf K, 2003).

Come accennato avanti, la degradazione della matrice è importante per la sua integrazione nell'organismo ospite. Una degradazione insufficiente porterà ad una reazione immunitaria abnorme con risultante reazione da corpo estraneo. I materiali che rimangono nella zona del processo di cicatrizzazione per un lungo periodo di tempo o che sono degradati in materiali non riassorbibili, possono causare una reazione tipo da corpo estraneo. Oltre alla presenza di cellule infiammatorie, in caso

di risposta immunitaria abnorme, si osserverà la secrezione di citochine infiammatorie con alterazione della migrazione cellulare e alterazione del rimodellamento della matrice extra cellulare, a causa della presenza degli inibitori delle metallo-proteinasi della matrice extracellulare (Anderson JM, 2008).

Per concludere, la buona funzionalità ed integrazione della matrice è un processo alquanto delicato, la cui riuscita risiede sul precario equilibrio dell'interazione tra le cellule dell'ospite e la stessa matrice dermica.

Un'invasione cellulare eccessiva della matrice può portare alla reazione immunologica tipo reazione da corpo estraneo, mentre un'invasione cellulare insufficiente porta alla mancata colonizzazione della matrice da parte delle cellule ospite. Una visione d'insieme dell'interazione cellule dell'ospite-matrice dermica è riassunta nella fig. 8.



**Fig. 8:** Visione d'insieme dell'interazione tra cellule dell'ospite-matrice dermica.

*Corsivo: proprietà della matrice; Grassetto: processi intermedi; Sottolineato: risultati.*

Figura presa da: "V. van der Veen et al. 2010. Biological background of dermal substitutes. Burns. 36(3):305-21"

# 4

## I sostituti dermici

Come abbiamo visto precedentemente, possiamo classificare i differenti sostituti dermici in tre classi diverse:

- Derivati biologici naturali;
- Derivati biologici di sintesi;
- Derivati di sintesi.

Questa classificazione si basa sulla caratteristica dei vari sostituti dermici di essere di origine naturale o meno e di essere composti da molecole biologiche o sintetizzate in laboratorio (Tab. 2).

**Tab. 2:** Differenti tipi di sostituti dermici

Nome	Produttore	Materiale	Spessore	Ø Pori	Cross-linking	Area d'applicaz.
<b>Alloderm®</b>	KCI/Life Cell©	Derma umano acellulare	0,79–2,03 2,06-3,30 mm	n. c.	No	Ustioni II e III grado; pds acute e croniche; sostituzione dei tessuti molli
<b>Glyaderm®</b>	Euro Skin Bank	Derma umano acellulare	0.2–0.6 mm	n. c.	No	Pds a tutto spessore
<b>Gammagraft™</b>	Promethean Lifesciences, Inc.	Cute umana irradiata	n. c.	n. c.	No	Ferite da traumi; ustioni; nelle ulcere croniche
<b>Epiflex®</b>	DIZC German Institute for Cell and Tissue replacement	Derma umano acellulare	n. c.	n. c.	No	Ustioni III; pds acute e croniche; pds dei tessuti molli nelle ricostruzioni mammarie post-mastectomie; nella riparazione della cuffia dei rotatori
<b>E•Z Derm™ Porcine Xenograft</b>	Brennen Medical, LLC	Cute suina cross-linked ad un aldeide	n. c.	n. c.	Si	Nelle ustioni; pds acute con perdita parziale o totale della cute; nelle dermoabrasioni; nelle zone di prelievo cutaneo
<b>Integra® Bi-Layer e Single-Layer</b>	Integra Lifesciences	Collagene bovino 1 e GAG	1 o 2 mm	30-120 µm	Si	Ustioni; pds acute e croniche; ferite chirurgiche; pds dei tessuti molli

Nome	Produttore	Materiale	Spessore	Ø Pori	Cross-linking	Area d'applicaz.
<b>Matriderm® Bi-Layer e Single-Layer</b>	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG	Collagene bovino 1 ed elastina	1 o 2 mm	~75 µm	No	Ustioni; pds acute e croniche; ferrite chirurgiche
<b>Renoskin®</b>	Perouse Plastie	Collagene bovino 1 e GAG	1,5 – 2,5 mm	~100 µm	Si	Ustioni; pds dei tessuti molli
<b>Pelnac®</b>	Gunze LTD	Atelocollagene suino ricoperto da silicone	n. c.	n. c.	No	nelle ustioni di III grado; pds dei tessuti molli, nelle exeresi oncologiche e dei nevi giganti
<b>Hyalomatrix® PA</b>	Fidia Advanced Biopolymers S.R.L.	Matrici di Hyaluronan con fibroblasti autologhi	~1,2 mm	n. c.	No	Ustioni; pds croniche
<b>Apligraf®</b>	Organogenesis, Inc.	Collagene bovino 1 con fibroblasti e cheratinociti autologhi	0,4 – 0,75 mm	n. c.	No	Ustioni di II e III grado; pds acute e croniche; aree donatrici d'innesti cutanei; Epidermolisi bollosa
<b>Oasis® Wound Matrix</b>	Healthpoint	Sottomucosa intestinale suina	~0,15 mm	20–30 mm	No	Pds croniche; ulcere diabetiche
<b>Oasis® Burn Matrix</b>	Healthpoint	Sottomucosa intestinale suina	~0,30 mm	20–30 mm	No	Ustioni di II e III grado

Nome	Produttore	Materiale	Spessore	Ø Pori	Cross-linking	Area d'applicaz.
<b>Veloderm®</b>	BTC SRL	polimero di CRYSTACELL 77™, un particolare tipo di cellulosa vegetale microcristallina caratterizzata da un basso tasso di polimerizzazione ed un alto livello di cristallinità	n. c.	n. c.	No	Nelle ustioni di II grado superficiali e profonde; pds dermica superficiali e di medio spessore; nella malattia di Lyell; nelle ulcere croniche
<b>Dermagraft®</b>	Advanced Biohealing	Poligalactina inseminata di fibroblasti neonatali	n. c.	n. c.	No	nelle ulcere del piede diabetico, a più di 6 settimane, interessanti cute e derma
<b>Dermagen®</b>	Genevrier	Collagene, chitosano e fibroblasti allogenici	n. c.	n. c.	No	Ustioni III grado; pds croniche; piede diabetico
<b>Biobrane®</b>	Smith & Nephew	Pellicola di silicone con tessuto di nylon, attaccati a collagene	n. c.	n. c.	No	Ustioni di II grado; aree donatrici d'innesti cutanei
<b>Suprathel®</b>	PolyMedics Innovations GmgH (PMI)	Polilactide (PLA)	70-150 µm	2 – 50 µm	No	Pds superficiali; aree donatrici d'innesti cutanei; ustioni di II grado

## Derivati biologici naturali

**Alloderm<sup>®</sup> (KCI/Life Cell<sup>©</sup>):** l'Alloderm<sup>®</sup> è una matrice dermica acellulare di origine umana, proveniente da cute di banca (US AATB: American Association of Tissue Banks). Questa matrice subisce dei processi chimico-fisici minimamente invasivi e per questo, la sua struttura naturale è praticamente inalterata. La FDA la considera come tessuto di banca. Durante la sua produzione, l'Alloderm<sup>®</sup> viene sottoposto alla separazione dello strato epidermico dalla membrana basale dermica e successivamente tutte le cellule e i componenti che presentano antigeni di istocompatibilità vengono rimossi per evitare un processo di rigetto.

Una volta impiantato, questo sostituto è praticamente sostituito da collagene dell'ospite. L'Alloderm<sup>®</sup> permette la migrazione cellulare dai margini della ferita e dai tessuti circostanti.

Le sue indicazioni sono molteplici e si può utilizzare in tutti i casi di ricostruzione dei tegumenti, inclusa la gengiva.

L'uso di questo sostituto dermico è controindicato in pazienti che presentano patologie autoimmuni del tessuto connettivo.

Le condizioni che potrebbero potenzialmente inibire l'integrazione di questa matrice acellulare sono: tessuti circostanti non ben vascolarizzati, traumi meccanici,

infezione locale o sistemica, condizioni generali precarie e stato nutrizionale deficitario.

**Glyaderm<sup>®</sup> (Euro Skin Bank):** il Glyaderm<sup>®</sup> è una matrice acellulare proveniente da cute di donatore umano, trattata con collagene-elastina.

La cute viene trattata con glicerolo in bassa concentrazione di NaOH (idrossido di sodio).

Questo sostituto dermico è stato concepito per la ricostruzione del derma nelle perdite di sostanza cutanea a tutto spessore in associazione ad un autoinnesto di cute a spessore parziale, per restaurare una cute a doppio strato simile a quella naturale. È utilizzabile nelle ustioni profonde, nelle exeresi oncologiche, nei nevi melanocitici giganti, nelle ricostruzioni post-fasciti necrosanti e nei traumi con perdite di sostanza importanti. Questa matrice è rivascolarizzata in circa una settimana e permette così un autoinnesto di cute a spessore parziale per poter ripristinare una cute a doppio strato.

Non è indicata nelle ferite infette o senza un'adeguata preparazione chirurgica. Un'adeguata toilette chirurgica della ferita deve essere fatta per poter

eliminare tutti i tessuti necrotici ed infetti, in seguito al trauma; solo successivamente, il Glyaderm® può essere posizionato sul sito ricevente.

Una ferita ben detersa e con un tessuto di granulazione adeguato permette l'integrazione della matrice dermica Glyaderm®.

**Gammagraft™ (Promethean Lifesciences, Inc.):** il Gammagraft™ è la prima cute umana irradiata ai raggi gamma ed è utilizzata come medicazione temporanea nelle ferite da traumi, da ustioni o nelle ulcere croniche, con perdita parziale o totale del derma.

Il suo uso è consigliato nelle ferite pulite e granuleggianti; non è concepito come una medicazione con potere decapante, ma è una medicazione in grado di fornire un ambiente ideale al processo di cicatrizzazione. È consigliato come medicazione dei siti di prelievo degli autoinnesti di cute a spessore parziale e nelle eviscerazioni, per ricoprire i visceri. Nelle zone articolari o in zone a rischio di scivolamento, alcune precauzioni dovrebbero essere prese per evitare che il Gammagraft™ si distacchi dal letto cicatriziale prima che il processo cicatriziale sia consolidato.

## **Epiflex<sup>®</sup> (DIZC GERMAN INSTITUTE FOR CELL AND TISSUE REPLACEMENT):**

l'Epiflex<sup>®</sup> è un derma acellulare di origine umana prelevato da donatori sani. Il derma, una volta prelevato, è trattato con processi per eliminare le cellule in esso presenti, sterilizzato e successivamente conservato e preservato. Prima di essere applicato deve essere reidratato.

Questo sostituto dermico naturale è consigliato nel trattamento delle ustioni più gravi e nelle ulcere croniche, nelle resezioni oncologiche (tipo nei sarcomi), nelle ricostruzioni mammarie post-mastectomie nella parte inferiore della loggia per la protesi, nella riparazione della cuffia dei rotatori nella chirurgia della spalla e in tutte quelle aree dove c'è stata una grande perdita di sostanza dei tessuti molli.

## **E•Z Derm™ Porcine Xenograft (Brennen Medical, LLC): l'E•Z Derm™**

Porcine Xenograft è una cute di origine suina, in cui il collagene è cross-linked con un aldeide. Questo xeno-innesto di cute porcina può essere usato nelle ustioni, nei traumi con perdita parziale o totale della cute, nelle dermoabrasioni, nelle zone di

prelievo cutaneo. L'E•Z Derm™ è consigliato anche come copertura temporanea nelle ustioni più profonde per permettere il ripristino del derma.

Le zone riceventi l'E•Z Derm™ devono essere deterse prima dell'applicazione dello xeno-innesto; dopo circa 8-10 giorni si può passare alla fase successiva con eliminazione chirurgica dell'E•Z Derm™ e auto-innesto di cute della perdita di sostanza, ripristinando una cute a doppio strato.

## Derivati biologici di sintesi

**Integra<sup>®</sup> Bi-Layer e Single-Layer (Integra Lifesciences):** l'Integra<sup>®</sup> è un derivato biologico di sintesi, acellulare, costituito da collagene bovino biodegradabile polimerizzato con copolimeri di GAGs. La matrice è composta da collagene tipo I e da condroitin-6-solfato. I GAGs sono co-precipitati, congelati a secco e cross-linked.

È una matrice tridimensionale, porosa, il cui diametro compreso è tra 20 e 125 µm ed è disponibile in due spessori:

- Un esemplare da 2 mm a “doppio strato”; questo esemplare è ricoperto da uno sottile strato di elastomero di silicone, che necessita di una procedura in due tempi. In un primo tempo la detersione della ferita e la deposizione della matrice. Dopo circa tre settimane dalla sua posa, la copertura della placca con un autoinnesto di cute a spessore parziale. Quest'intervallo è necessario per permettere la colonizzazione cellulare della matrice da parte dell'ospite e la sua integrazione all'organismo con conseguente vascolarizzazione.
- Un esemplare da 1mm a “strato singolo”; questo non è ricoperto da silicone e può essere utilizzato in procedure in un solo tempo, cioè durante lo stesso

intervento chirurgico, detersione della ferita, deposizione della matrice e autoinnesto di cute a spessore parziale sulla matrice.

L'Integra<sup>®</sup> è il sostituto dermico più utilizzato, soprattutto per gli ustionati, assieme al Matriderm<sup>®</sup>, descritto di seguito.

È indicato nel trattamento post-exeresi delle perdite di sostanza a perdita parziale o totale del derma, negli ustionati, nelle perdite di sostanza con esposizione di strutture come l'osso, i tendini ed in tutti quei casi in cui un innesto semplice di cute non attecchirebbe.

L'Integra<sup>®</sup> è molto efficace, ma alquanto sensibile alle infezioni, quindi una speciale attenzione deve essere posta al momento della medicazione tra primo e secondo tempo chirurgico.

## **Matriderm<sup>®</sup> Bi-Layer e Single-Layer (Dr. Suwelack Skin & Health**

**Care AG):** il Matriderm<sup>®</sup> è una matrice dermica costituita da fibrille collagene bovino di tipo I, III e V, proveniente dal legamento nucale ed elastina, strutturalmente intatte che facilitano e supportano la rigenerazione dermica.

Questa matrice è una matrice porosa con dei pori del diametro di circa 75µm.

Il Matriderm<sup>®</sup> è utilizzato per la ricostruzione del derma nelle perdite a tutto spessore di cute assieme ad un autoinnesto di cute a spessore parziale. È consigliato nel trattamento delle ustioni di II grado intermedio e profondo e di III grado, nei traumi importanti e negli esiti da ustioni per ripristino delle cicatrici.

Anche questo sostituto dermico, così come l'Integra<sup>®</sup> è disponibile in due differenti spessori da 1mm e da 2mm, rispettivamente utilizzati con autoinnesto di cute a spessore parziale nello stesso tempo operatorio della sua posa ed in un secondo tempo, dopo circa tre settimane per permettere la colonizzazione e la vascolarizzazione della matrice.

Le sue controindicazioni sono date dall'ipersensibilità del paziente ai costituenti bovini del collagene e dell'elastina, l'utilizzo su zone infette.

Questa matrice, inoltre, non sopporta assolutamente l'utilizzo dei disinfettanti allo Iodio (Betadine<sup>®</sup>) e di sostanze caustiche perché provocherebbero un'alterazione delle proteine del collagene.

**Renoskin<sup>®</sup> (Perouse Plastie):** Renoskin<sup>®</sup> è un sostituto dermico a doppio strato costituito da uno strato di collagene bovino e da uno strato di silicone che lo

protegge durante il periodo di attecchimento prima di poterlo innestare. È un prodotto simile al Matriderm® e all'Integra®, di cui abbiamo già parlato.

Le sue indicazioni sono simili a quelle del Matriderm® e dell'Integra®: ustioni profonde di II e III grado, exeresi di nevi melanocitici giganti congeniti, perdite di sostanza con esposizione tendinea o ossea, dove l'innesto semplice di cute non attecchirebbe.

È necessario anche per Renoskin® detergere la ferita e praticare prima della sua applicazione l'exeresi del tessuto necrotico o traumatizzato; dopo circa tre settimane, tempo necessario al suo attecchimento e vascolarizzazione, è possibile praticare l'autoinnesto di cute parziale.

**Pelnac® (Gunze LTD):** Il Pelnac® è una matrice dermica artificiale di origine suina, costituita da una matrice tridimensionale di atelocollagene con una bassa antigenicità e da uno strato di silicone. Per il momento è utilizzato solo in Giappone, Korea, Cina e Brasile.

È indicato nelle ustioni di terzo grado, nei traumi con perdita importante dei tessuti molli, nelle exeresi oncologiche e dei nevi giganti. Può essere utilizzato nelle

zone di prelevamento di un lembo cutaneo per migliorare gli esiti cicatriziali e il trofismo cutaneo post-innesto.

Da utilizzare con precauzione nei soggetti allergici, con asma ed orticaria; non è un prodotto con proprietà battericide né batteriostatiche, quindi da usare con precauzione sulle ferite che presentino una possibile infezione.

### **Hyalomatrix<sup>®</sup> PA (Fidia Advanced Biopolymers S.R.L.):** Lo

Hyalomatrix<sup>®</sup> PA è un sostituto dermico di origine biologica aviaria, utilizzato come medicazione temporanea. Questa matrice è costituita da un doppio strato: uno strato, che promuove la ricostituzione dermica costituita da HYAFF 11, un derivato esterificato di acido ialuronico ed uno strato più superficiale dato da una membrana semi permeabile di silicone. Lo HYAFF 11, biodegradabile, a contatto con la ferita, agisce come un'impalcatura tridimensionale per invasione cellulare e neoangiogenesi. Il silicone controlla le perdite idriche e aumenta la resistenza della matrice di HYAFF 11 alle forze di trazione, che può subire una volta posizionato.

È indicato come medicazione immediata nelle perdite importanti di cute e dove occorre un'immediata copertura delle zone lese, ma un innesto non è momentaneamente indicato. È utilizzabile come sostituto dermico nelle exeresi

chirurgiche prima di un autoinnesto parziale di cute (Gravante G, 2010; Perrot P, 2010).

Anche questo sostituto dermico, come quelli finora elencati, non possiede attività batteriostatiche o battericide.

**Apligraf® (Organogenesis, Inc.):** L'Apligraf® è l'unico sostituto dermico biologico, creato a partire da fibroblasti neonatali integrati in una matrice di collagene bovino tipo I associati a cheratinociti neonatali seminati sulla parte superiore.

È indicato soprattutto nell'uso di ferite non infette con perdita parziale o totale di derma, come ulcere venose, piede diabetico. Alcuni studi lo consigliano anche per le ustioni di II e III grado (Wong T, 2007).

È controindicato nelle ferite infette, dato che non possiede poteri battericidi e batteriostatici.

**Oasis® Wound Matrix - Oasis® Burn Matrix (Healthpoint):** queste matrici sono matrici biologiche acellulari di origine porcina. Contengono una matrice

extracellulare intatta e consentono un ambiente ottimale all'integrazione della matrice nei tessuti dell'ospite ed alla cicatrizzazione. Favoriscono infatti la ristorazione del collagene dermico e della sua struttura tridimensionale; contengono lo strato di sottomucosa dell'intestino tenue di maiale. Sono indicate nelle ustioni, nei traumi, nelle ulcere croniche degli arti inferiori, nel piede diabetico, nelle resezioni post-oncologiche e nelle exeresi dei nevi giganti. Sono controindicate nelle ustioni di III grado.

**Veloderm® (BTC SRL):** Veloderm® è la sola matrice biologica di natura vegetale; contiene infatti un polimero di CRYSTACELL 77™, un particolare tipo di cellulosa microcristallina ottenuta con particolari processi brevettati di biotecnologia, caratterizzata da un basso tasso di polimerizzazione ed un alto livello di cristallinità. Dopo essere stata idratata con soluzione fisiologica, la matrice di Veloderm® acquista un aspetto translucido, denso, di spessore e flessibilità simile alla cute umana con proprietà di permeabilità simili. È particolarmente permeabile ai gas, mentre resta impermeabile ai batteri ed all'acqua. La sua permeabilità varia da 1.100g/m<sup>2</sup>/24h quando la ferita è non essudativa a 15.000g/m<sup>2</sup>/24h quando la ferita è essudativa. Veloderm® è un sostituto temporaneo dell'epidermide nelle ustioni di II grado superficiali e profonde, ma non per le ustioni di III grado. È utilizzato in tutte

le perdite di sostanza dermica superficiali e di medio spessore, nelle lesioni cutanee della malattia di Lyell, nelle ulcere croniche. Può essere applicato su tutte le ferite rese pulite da una toilette chirurgica e senza segni d'infezione locale.

## Derivati di sintesi

**Dermagraft<sup>®</sup> (Advanced Biohealing):** Il Dermagraft<sup>®</sup> è un sostituto dermico sintetico costituito da una matrice sintetica biodegradabile di poligalattina (Vicryl™), dalla matrice extracellulare e da fibroblasti di origine umana crioconservati aggiunti alla matrice assieme al TGF- $\beta$  ed alla decorina.

I fibroblasti derivano dalla cute di prepuzio di neonato. È indicato in tutte le ulcere del piede diabetico, che durano più di 6 settimane, che interessano la cute ed il derma, ma non i tendini, le capsule articolari e le ossa. È controindicato nelle ulcere infette o in ulcere con fistole.

**Dermagen<sup>®</sup> (Genevrier):** questa matrice sintetica è composta da collagene, GAGs e da una matrice di chitosano (PRODERM<sup>®</sup>), colonizzata da fibroblasti allogenici. Il chitosano è un polisaccaride naturale, che possiede caratteristiche strutturali simili ai GAGs; non è tossica per l'organismo ed è riassorbibile.

È indicato nel trattamento delle ustioni gravi di III grado, nelle ulcere croniche e nel piede diabetico.

**Biobrane<sup>®</sup> (Smith & Nephew):** è una medicazione biosintetica, costituita da una pellicola di silicone con del tessuto di nylon (poliammidi) parzialmente legato nella pellicola di silicone. Il tessuto resta a contatto con la ferita e questa struttura complessa tridimensionale presenta del collagene attaccato chimicamente. Il suo meccanismo d'azione agisce sull'imprigionamento del coagulo ematico nel suo reticolato di nylon, che farà aderire il Biobrane<sup>®</sup> al letto cicatriziale fino alla riepitelizzazione della cute.

È indicato nelle ustioni superficiali e nelle zone di prelevamento di un autoinnesto di cute. Non aderisce al tessuto necrotico, che rimanendo sotto questa membrana può determinare delle infezioni locali; una toilette chirurgica adeguata dovrà essere fatta prima di apporre Biobrane<sup>®</sup>, così come un'attenta emostasi.

È stata notata una reazione allergica, su certi soggetti, dopo l'applicazione del Biobrane<sup>®</sup>, questo dovrà allora essere rimosso.

**Suprathel<sup>®</sup> (PolyMedics Innovations GmgH (PMI)):** è un sostituto dermico temporaneo sotto forma di membrana riassorbibile, costituita da D,L-polilactide (PLA), con una struttura che possiede dei micropori di 2-50 µm.

È molto utilizzata per la copertura temporanea di ferite superficiali non infette, siti donatori di autoinnesti di cute a spessore parziale, nelle ustioni di II grado e nelle ustioni di II grado associate ad aree presentanti ustioni di III grado (Uhlrig C, 2007). È stato provato che riduce il tempo totale del trattamento, riduce il dolore alla sua rimozione e non necessita di un cambio frequente (Uhlrig C, 2007).

Non è utilizzabile sulle ferite infette, né sulle ulcere profonde croniche. Se è presente un sanguinamento bisognerà associare il Suprathel® ad un emostatico.

## 5

### Casi clinici

L'esperienza personale sui sostituti dermici si basa su di un numero limitato di pazienti, per il quale ho utilizzato tre differenti tipi di sostituti dermici: Integra® double-layer, Matriderm® single-layer e Hyalomatrix® PA.

L'insieme dei pazienti (tab. 4) non costituisce una serie omogenea rappresentativa, ma in compenso, può servire da base di lavoro per l'utilizzazione e le indicazioni dei differenti sostituti dermici utilizzati.

La tecnica operatoria è all'incirca la stessa per tutti questi sostituti dermici: un primo tempo operatorio, consistente nell'exeresi dei tessuti morti e traumatizzati, seguita, a seconda del sostituto dermico utilizzato (Matriderm® ed Integra® single-layer) nella posa del sostituto con conseguente autoinnesto cutaneo a spessore parziale; nel caso dell'Integra® double-layer e dello Hyalomatrix PA, la condotta operatoria varia, consistendo nella posa del sostituto dermico ed attesa del suo attecchimento con conseguente messa in opera dell'azione ricostruttiva del sostituto dermico. Successivamente, in un secondo tempo operatorio, possiamo innestare il sostituto dermico con un autoinnesto di cute a spessore parziale.

In poche parole, come accennato precedentemente, per l'Integra® ed il Matriderm® single-layer utilizzeremo una tecnica *one-step*, mentre per l'Integra® double-layer e lo Hyalomatrix, utilizzeremo una tecnica *two-step*.

## **Caso Clinico: Matriderm®.**

Paziente, lavoratore manuale (meccanico) di 42 anni, di sesso maschile, con ustioni alle mani di II grado profondo e III grado, che necessita di incisioni di scarico fatte d'urgenza per ripristinare il flusso sanguigno (fig. 9-10). Il paziente è sottoposto a medicazioni quotidiane con sulfadiazina e sali di Ag (Flammazine®) per circa 10 giorni; successivamente viene sottoposto ad intervento, consistente in una procedura one-step.

Al momento dell'exeresi delle ustioni, dopo accurata emostasi e lavaggio delle zone cruentate, si procede alla posa del Matriderm® e su di esso, nello stesso tempo operatorio, di un autoinnesto di cute a spessore parziale (fig. 11-12).

Alla prima medicazione (3 giorni post-op.) gli innesti sono ben attecchiti e alla seconda medicazione (5 giorni post-op.) si procede alla rimozione parziale delle graffette metalliche (fig. 13-14).

Ad un anno osserviamo un ottimo risultato funzionale, in questo paziente, lavoratore manuale, che presentava delle ustioni di cattiva prognosi (III grado).

All'esame clinico, il paziente presentava un ottimo trofismo cutaneo, un'elasticità cutanea presente e l'assenza di briglie cicatriziali o retrazioni cicatriziali; i gradi di flessione-estensione delle dita e del pollice sono pressoché normali (fig. 15,17).

Ad un anno, il paziente riferisce di non avere nessun impedimento nel suo lavoro manuale. Il risultato estetico è giudicato eccellente tanto dal paziente, quanto dall'esaminatore (fig. 15-17).



**Fig. 9:** Ustione di II grado profondo e di III grado mano dx



**Fig. 10:** Ustione di II grado profondo e di III grado mano sin.



**Fig. 11:** Applicazione Matriderm®SL

Tesi di Dottorato in Traumatologia di Antonio Brancati



**Fig. 12:** Applicazione dell'autoinnesto di cute a spessore parziale sul Matriderm® SL



**Fig. 13:** Post-operatorio a 5 giorni mano sin; buon attecchimento della matrice ed innesti di cute



**Fig. 14:** Post-operatorio a 5 giorni mano dx; buon attecchimento della matrice ed innesti di cute



**Fig. 15:** Controllo a distanza di un anno



**Fig. 16:** Controllo a distanza di un anno



**Fig. 17:** Controllo a distanza di un anno

## **Caso clinico: Integra® double-layer.**

Paziente di 38 anni, di sesso maschile, vittima di un incidente stradale con lo scooter e conseguente ustione di III grado da contatto con il tubo di scappamento del suo scooter (fig. 18). Dopo una prima toilette chirurgica, si evidenzia un'apertura della prima articolazione metatarso-falangea, che viene stabilizzata con due fili di Kirschner incrociati e posa di una TPN (fig. 19), per favorire la crescita di un tessuto di granulazione. Un secondo intervento viene quindi effettuato per coprire la perdita di sostanza con una matrice di Integra® DL (fig. 20), dopo aver effettuato un'artrodesi tarso-metatarsica con un'agrafe metallica a causa dell'apertura articolare. L'Integra® viene lasciato per tre settimane (fig. 21-22), prima di essere innestato con un autoinnesto di cute a spessore parziale (fig. 23).

Le agrafoes sono eliminate progressivamente tra il 3° ed il 5° giorno post-op. (fig. 24); ed il risultato a distanza ad un anno, mostra la capacità di questo sostituto dermico di poter attecchire sull'osso e permettere un attecchimento su delle zone non perfettamente vascolarizzate (fig. 25-26).



**Fig. 18:** Ustione di III grado piede dx



**Fig. 19:** Dopo prima escissione chirurgica dell'ustione e posa di due fili di Kirschner per stabilizzazione della prima metatarso-falangea



**Fig. 20:** Dopo il primo cambio della TPN



**Fig. 21:** 10 giorni dopo la posa dell'Integra® DL



**Fig. 22:** Tre settimane dopo la posa dell'Integra® DL, prima dell'autoinnesto di cute a spessore parziale



**Fig. 23:** Post-op. immediato dell'autoinnesto di cute a spessore parziale su Integra® DL



**Fig. 24:** Post-op. a 5 giorni; ablazione parziale delle agrafes



**Fig. 25:** Controllo a distanza ad un anno



**Fig. 26:** Controllo a distanza ad un anno. Stabilizzazione della cicatrice

## Caso clinico: Hyalomatrix PA.

Paziente di 53 anni, di sesso femminile, che presenta un'ustione di II grado profondo e III grado a livello della caviglia sinistra (fig. 27). Dopo circa dieci giorni di attesa, prima dell'intervento e preparazione della zona con medicazioni quotidiane alla sulfadiazina e sali d'Ag (Flammazine®), si procede all'escissione chirurgica con idrobisturi (Versajet®) (fig. 28) e posa della matrice di Hyalomatrix PA (fig. 29). A 12

giorni post-op. la matrice dello Hyalomatrix PA presenta un aspetto infetto (fig. 30), ma dopo la sua rimozione (fig. 31), troviamo un buon tessuto di granulazione, pronto ad accogliere l'autoinnesto di cute a spessore parziale (fig. 32), che ad una settimana post-op. è completamente attecchito ed in via di cicatrizzazione completa (fig. 33). I risultati a distanza, estetico e funzionale, sono pienamente soddisfacenti (fig. 34-35).



**Fig. 27:** Ustione di II grado profondo e III grado della caviglia sin



**Fig. 28:** Intra-operatorio: exeresi al Versajet® dell'ustione



**Fig. 29:** Posa dello Hyalomatrix PA tramite agrafes



**Fig. 30:** Aspetto dello Hyalomatrix PA dopo 12 giorni di posa



**Fig. 31:** Aspetto del tessuto di granulazione dopo asportazione dello Hyalomatrix PA



**Fig. 32:** Posa dell'autoinnesto di cute espansa a spessore parziale



**Fig. 33:** Post-op. a 5 giorni dell'autoinnesto di cute espansa a spessore parziale

<b>N° paziente</b>	<b>Sesso</b>	<b>Età</b>	<b>Tipo trauma</b>	<b>Sede</b>	<b>Materiale utilizzato</b>	<b>Delai tra Sostituto - Innesto</b>	<b>Infezione</b>
<b>1</b>	M	35	Ustione	Mano dx	Matriderm®	G+0	No
				Mano sin	Integra SL®	G+0	Si
<b>2</b>	F	41	Ustione	Mano dx	Matriderm®	G+0	No
				Mano sin	Matriderm®	G+0	No
<b>3</b>	M	40	Ustione	Mano sin	Matriderm®	G+0	No
				Mano dx	Matriderm®	G+0	No
<b>4</b>	M	31	Incidente stradale	Piede sin	Matriderm®	G+0	No
<b>5</b>	M	13	Ustione	Mano dx	Matriderm®	G+0	Si
				Mano sin	Matriderm®	G+0	SI
<b>6</b>	M	41	Ustione	Gamba dx	Matriderm®	G+0	No
<b>7</b>	F	9	Incidente stradale	Piede sin	Matriderm®	G+0	No
<b>8</b>	M	40	Ustioni	Mano dx	Matriderm®	G+0	No
				Mano sin	Matriderm®	G+0	No
<b>9</b>	M	34	Ustione	Piede dx	Integra®	G+21	No
<b>10</b>	M	36	Incidente stradale	Piede dx	Integra®	G+18	No
<b>11</b>	M	39	Incidente di caccia	Gamba dx	Integra®	G+19	No
<b>12</b>	F	53	Ustione	Caviglia sin	Hyalomatrix PA®	G+12	Si

**Tab. 4:** Casistica operatoria dei vari sostituti dermici utilizzati in caso di traumi agli arti

## 6

### Discussione e ricerche cliniche

Analizzando la nostra casistica (tab.4), possiamo evidenziare che si tratta di una piccola casistica non omogenea, basata soprattutto su casi post-ustione.

Purtroppo a causa della sua esiguità non possiamo donare delle conclusioni certe sull'utilizzo di questi sostituti dermici, ma possiamo, senza dubbio, poter affermare che questi biomateriali ci aprono delle possibilità ricostruttive più semplici e meno pesanti per il paziente (interventi meno lunghi, assenza di zone donatrici, assenza di morbidità delle zone donatrici, decorso post-op. più semplice).

Nella nostra esperienza abbiamo utilizzato l'Integra® DL per copertura delle perdite di sostanza con esposizione ossea e tendinea, con buoni risultati.

Il Matriderm® SL é stato utilizzato sulle mani con buoni risultati, ma senza esposizioni ossee o tendinee, mentre nelle zone come le dita dei piedi, meno vascolarizzate i migliori risultati sono stati ottenuti con l'Integra® DL.

Il Matriderm® SL, secondo la nostra casistica, non é riuscito a coprire le esposizioni ossee o tendinee, a differenza dell'Integra® DL, ma non dobbiamo

dimenticare il fatto che abbiamo utilizzato il Matriderm® SL e non abbiamo un'esperienza sul Matriderm® DL.

Sebbene alquanto limitata, la nostra casistica ci ha permesso di poter apprezzare le potenzialità dei differenti sostituti dermici utilizzati in casi post-traumatici.

Nel caso delle ustioni profonde delle mani, i nostri casi (9 mani operate su 7 pazienti con il Matriderm® SL ed 1 solo caso con Integra® SL) ci hanno permesso di valutare l'azione positiva sulla cicatrizzazione degli innesti e sostituti su delle zone funzionali come le mani e le dita.

In alcuni pazienti abbiamo già un follow-up di più di un anno con degli ottimi risultati estetici e funzionali sia per il chirurgo che per il paziente (fig. 15-17). Quello che abbiamo potuto notare, grazie al conseguente follow-up, è che la cicatrizzazione è alquanto stabile senza presenza di piccole escoriazioni e ferite ai traumi più leggeri, come può accadere su delle cicatrici non ben stabilizzate.

Per quanto riguarda l'utilizzo dello Hyalomatrix® PA, personalmente ho utilizzato solo una volta questo prodotto, ma abbiamo partecipato ad un studio di 10 casi (tra cui 7 di origine traumatica) nel Servizio di chirurgia plastica e ustioni del Policlinico di Nantes (Perrot P, 2010) con buoni risultati (tab. 5).

Secondo quanto rilevato da questo studio, possiamo dire che lo Hyalomatrix® PA, a differenza delle altre matrici utilizzate, contenenti GAGs ed elastina, contiene solamente un estere dell'acido ialuronico (conferendogli un'assenza totale di antigenicità e di rischi d'infezione virale e prionica). I dati bibliografici su questo sostituto dermico temporaneo sono ancora alquanto ridotte (Perrot P, 2010; Gravante G, 2010) rispetto all'Integra®.

N°	Sesso	Età	Eziologia e localizzazione	Superficie coperta con Hyalomatrix PA (cm <sup>2</sup> )	Infezione Hyalomatrix PA	Intervallo Hyalomatrix PA/innesto di cute	% dell'innesto di cute attecchito
1	M	24	Ustione/gamba	300	No	G+9	100
2	F	53	Ustione/piede	100	No	G+12	100
3	M	70	Ustione/gamba	100	No	G+11	90
4	M	27	Ustione/collo	200	Si	G+13	100
5	F	16	Ustione/piede	100	No	G+10	95
6	M	75	Exeresi tumore/gamba	80	No	G+14	90
7	M	12	Trauma/piede	80	No	G+7	100
8	F	83	Prelevamento lembo surale	70	No	G+7	85
9	M	46	Prelevamento lembo surale	80	Si	G+13	50
10	M	20	Trauma/piede	80	No	G+10	100

**Tab. 5:** Riepilogo dello studio sullo Hyalomatrix® PA preso da: "Perrot P, Delliere V, Brancati A, Duteille F. (2010). Place du Hyalomatrix PA au sein des substituts cutanés. À propos de dix cas. *Ann Chir Plast Esthet*, doi: [10.1016 / j.anplas. 2010.10.006](https://doi.org/10.1016/j.anplas.2010.10.006)

Sebbene la serie di 10 pazienti studiata sia eterogea, c'è un punto in comune per tutti questi pazienti: la perdita completa dello strato dermico dovuto ad un'azione traumatica accidentale (incidente stradale, ustioni) o programmato (chirurgia oncologica) con successivo autoinnesto di cute a spessore parziale.

Il tasso d'infezione è del 20%, per la nostra piccola casistica (10 casi), ma la differenza è che, anche se infettato, questo materiale permette, dopo la sua eliminazione un attecchimento completo degli innesti cutanei.

I risultati a distanza sembrano stabili e di buona qualità.

Uno studio con un numero maggiore di pazienti potrebbe aiutarci a confermare questi primi risultati incoraggianti; inoltre questo studio potrebbe aiutarci a definire la sua affidabilità su strutture nobili esposte (ossa, tendini, vasi e nervi) o su delle superfici più importanti, come nei grandi ustionati.

Negli ultimi decenni, le ricerche di bio-ingegneria sui sostituti dermici hanno permesso di aprire nuove porte alla medicina.

Il problema delle perdite di sostanza a tutto spessore dello strato dermico, in seguito ad un trauma importante, come nelle ustioni profonde o nei traumi da sguantamento, non viene risolto con un innesto a spessore parziale, dovuto alla mancanza di componenti dermici. Il rischio di retrazione cicatriziale e di ulcerazione

della cicatrice, assieme alla possibilità che una struttura nobile resti intrappolata nel processo di cicatrizzazione e l'importanza del risultato estetico finale, ha portato alla scelta di altre tecniche di copertura su traumi importanti, come ad esempio lembi peduncolati locali e lembi liberi.

Per poter assicurare i migliori risultati possibili, sia funzionali che estetici, sono stati concepiti diversi sostituti dermici.

Le possibilità ricostruttive su di un grande ustionato o a seguito di un grave trauma, con i tessuti circostanti, rimasti lesi durante il processo traumatico e con l'esposizione di strutture nobili, rende la scelta dei lembi liberi quasi obbligatoria.

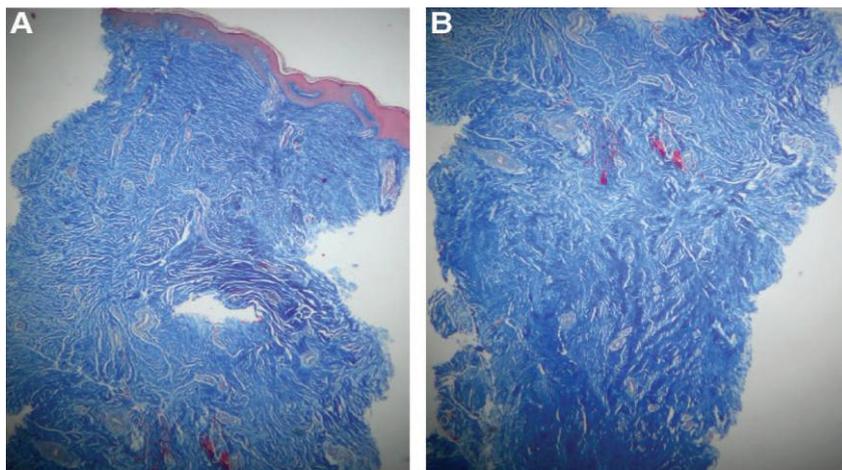
Con l'avvento dei nuovi sostituti dermici, questa scelta diviene meno impellente e la possibilità di poter coprire l'osso o i tendini esposti con una matrice dermica, rende la scelta ricostruttiva più facile e meno pesante per il paziente, diminuendo anche i costi delle cure e dell'ospedalizzazione.

Attualmente, sono sempre più numerosi gli autori (Chun-Wui Kang G, 2010; Campitiello F, 2005; etc.), che hanno apportato la loro esperienza sulla possibilità di utilizzare le matrici dermiche, non solo sugli ustionati, ma anche su traumi con esposizioni ossee e tendinee di piccola e media grandezza.

L'uso di una matrice dermica è caratterizzato da varie fasi. Dalla sua posa alla completa integrazione, possiamo verificare istologicamente diversi processi:

- Imbibizione della matrice da parte dei liquidi organici,
- Migrazione dei fibroblasti nella matrice,
- Neovascolarizzazione della matrice,
- Rimodellamento della matrice e maturazione di un tessuto dermico normale (fig. 36).

Tutte queste fasi istologiche corrispondono alle differenti fasi di cicatrizzazione e di attecchimento dell'autoinnesto di cute a spessore parziale, che viene posto successivamente (*two-step procedure*) o nello stesso tempo operatorio (*one-step procedure*) sulla matrice.



**Fig. 36:** Biopsia cutanea della perdita di sostanza trattata con Integra® ed autoinnesto di cute (follow-up a 6 mesi). Colorazione tricromica per evidenziare le fibre collagene mature ed il completo ripristino del collagene bovino con un omo-collagene umano. Preso da:” Jeng JC et al. (2007). Seven Years' Experience With Integra as a Reconstructive tool. *Journal of Burn Care & Research* , 28 (1), 120-26”

Le differenti matrici dermiche sono state ideate per la cura dei gravi ustionati, ma trovano, attualmente, un'indicazione terapeutica molto più ampia, come ad esempio: perdite di sostanza traumatiche importanti, nelle fasciti necrosanti (Bache SE, 2010; Muangman P, 2006), nella purpura fulminans (Pollard RL, 2008), nelle perdite di sostanza dovute allo stravasamento di antiblastici (Onesti MG, 2010), nei traumi da sguantamento (Martinet L, 2007; Muangman P, 2006; Wolter TP, 2005; Lozano DD, 2003), od ancora, nelle perdite di sostanza dopo exeresi di grandi tumori cutanei. Applicati alle perdite di sostanza evitano ogni sorta di perdita ematica e di fluidi ed evitano la sovra-infezione delle ferite.

Le matrici dermiche hanno permesso di aumentare o rimpiazzare, nelle zone traumatizzate, il derma che è stato leso durante il trauma, così da aumentare la funzionalità, l'efficienza nel tempo ed il risultato estetico dell'autoinnesto a spessore parziale, senza aumentare una morbilità del sito donatore di un eventuale lembo.

Inoltre, un sostituto di tessuti molli, che sia capace di permettere la copertura di piccole esposizioni ossee e tendinee, permette di aumentare le possibilità ricostruttive del chirurgo. Secondo Lee (Lee FL, 2008) l'Integra<sup>®</sup> permette di coprire con successo delle zone poveramente vascolarizzate come le ossa esposte, i tendini, senza il bisogno di ricorrere a lembi liberi (Chou TD, 2001).

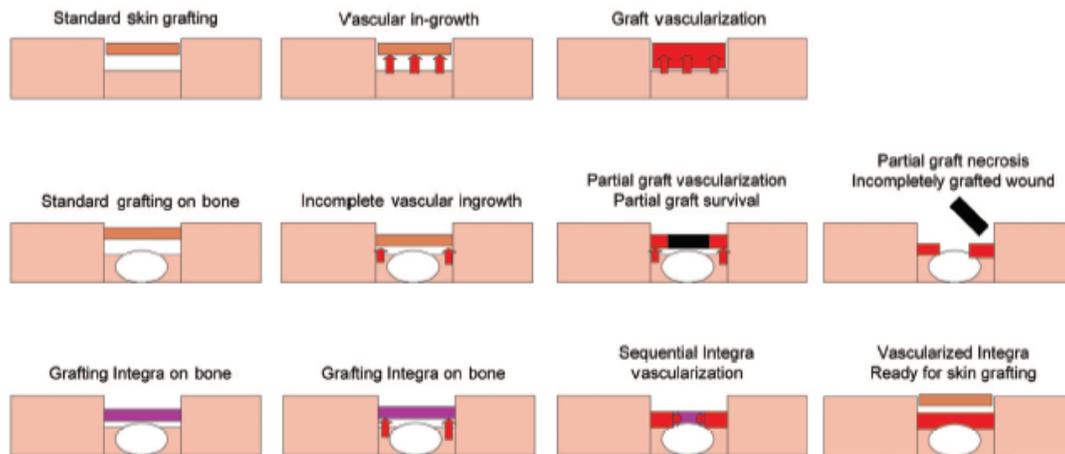
Alcuni autori (Chun-Wui Kang G,2010; Leffler M, 2010; Lee-Pu LQ, 2009; Pollard RL, 2008; Unglaub F, 2005; Jeschke MG, 2004; Molnar JA, 2004) hanno integrato l'utilizzo della terapia a pressione negativa (TPN) all'uso delle matrici dermiche.

Incidendo la placca di silicone, che si trova sullo strato superiore della matrice, si può mettere in atto una TPN a -125mmHg continua. Questo permette di placcare bene e fermamente sul fondo della ferita la matrice, evitando in questo modo la possibilità di lasciare degli spazi morti e dell'aria tra matrice dermica e ferita, causa spesso d'infezione della placca.

Sin dall'inizio della sua utilizzazione, la TPN ha dimostrato di incrementare la vascolarizzazione locale delle ferite e di accelerare la presenza di un tessuto di granulazione su di esse. Inoltre, utilizzata sugli innesti, permette di poter favorire l'attecchimento dell'innesto di cute aumentandone il contatto con la ferita (Argenta LC, 2006; Molnar JA, 2004); per queste ragioni, si può ipotizzare che, posizionata sulla matrice dermica, ne acceleri l'integrazione e l'attecchimento (Molnar JA,2004).

L'integrazione della matrice dermica richiede in media circa tre settimane, ma se la ferita presenta un'esposizione ossea o tendinea, la possibilità di una buona vascolarizzazione si riduce e questo comporta un aumento del tempo necessario

all'attecchimento della matrice (dalle 4 alle 6-8 settimane). Questo si spiega col fatto che la matrice sarà vascolarizzata dalla periferia verso il centro (Fig.37).



**Fig. 37:** Meccanismo d'azione dell'Integra. (Sopra) Autoinnesto di cute a spessore parziale, che richiede un'adeguata vascolarizzazione per l'attecchimento. (Centro) L'osso corticale e i tendini sono scarsamente vascolarizzati, attecchimento incompleto dell'autoinnesto sopra queste strutture. L'innesto è incapace di attecchire su questi tessuti. Non è capace di sostenersi aspettando un adeguato apporto vascolare dalla periferia verso il centro. (Sotto) L'Integra, non richiedendo un apporto vascolare elevato, permette attraverso la sua vascolarizzazione dalla periferia verso il centro durante varie settimane di favorire il suo attecchimento e permettere poi l'autoinnesto di cute su queste strutture con un'interfaccia ben vascolarizzata. Preso da: "Integra in Lower Extremity Reconstruction after Burn Injury. L. F. Lee et al. *Plast. Reconstr. Surg.* 121: 1256-62, 2008"

In generale, occorrerà più tempo, se la ferita si trova in zone non ben vascolarizzate (Komorowska-Timek E, 2005).

Generalmente, le perdite di sostanza degli arti inferiori, con esposizione ossea o tendinea, richiedevano l'utilizzazione di lembi.

Il problema essenziale è che questo tipo di ferite non contengono un flusso sanguigno sufficiente per la sopravvivenza di innesti; durante gli scorsi decenni, il trattamento

ideale di queste perdite di sostanza erano i lembi liberi; dato che questi tessuti vengono trasferiti con il loro supporto vascolare, non necessitano di un supporto sanguigno locale. Ancora oggi per la maggior parte dei pazienti, questo resta il trattamento ideale, ma alcuni di essi non sono candidati alla microchirurgia. L'utilizzo dei vari sostituti dermici, in questo caso, permette di chiudere la perdita di sostanza con un materiale che inizialmente non ha bisogno di supporto vascolare dato che è un materiale non vivente.

I sostituti dermici possono essere utilizzati su tutti i pazienti, senza distinzione d'età, sesso e genere.

In regioni anatomiche più delicate e più sensibili all'immobilizzazione, come le mani e le dita, si può preferire dei sostituti dermici utilizzabili in un solo tempo operatorio, come il Matriderm®. Alcuni Autori (W. Haslik, 2010. Sugamata A, 2009) hanno riportato la loro esperienza con il Matriderm® sui traumi della mano e delle dita, zone dove è richiesta un'alta elasticità ed estensibilità della cute ed una buona stabilità e flessibilità delle cicatrici, così come nella regione del polso, per poter garantire una buona funzionalità. Taras (Taras JS, 2010) propone, per le perdite di sostanza delle dita, con esposizione ossea, o tendinea o delle articolazioni, l'utilizzo dell'Integra® seguito da un autoinnesto di cute a tutto spessore. Dantzer (Dantzer E, 2003), analizzando la sua

casistica, analizza i risultati ottenuti con l'Integra® e autoinnesti di cute a spessore parziale su 14 casi; il follow up medio dei pazienti é di un anno. L'Integra®, posto in acuto sulle ustioni profonde delle dita, nella sua casistica, ha una percentuale di attecchimento del 100% con risultati nettamente soddisfacenti, sia dal punto di vista estetico (basato sul Vancouver Scar Scale), sia dal punto di vista funzionale (basato su tre criteri: opposizione del pollice, distanza polpastrello-palmo della mano e prensione fina).

I risultati articolari ed estetici restano stabili nel tempo (follow up di un anno), con la cute che presenta un'eccellente elasticità e morbidezza, assenza di cicatrici patologiche.

Quando l'Integra® é stato utilizzato sulle zone più profonde, con conseguente esposizione ossea, ha permesso la copertura di queste zone e la possibilità di recuperarle senza ricorrere ad un'amputazione delle dita.

Secondo Dantzer, la presenza dell'Integra® ha permesso di ritrovare, sottoponendo ad esame istologico le zone trattate con l'Integra® ed autoinnesto di cute a spessore parziale, la presenza di un derma normale piuttosto che un tessuto cicatriziale. La presenza della matrice collagenica serve da substrato per la migrazione dei fibroblasti, cellule endoteliali, linfociti e la loro proliferazione. Con la progressione

del processo di guarigione, un tessuto endogeno si viene a formare progressivamente all'interno della matrice metabolizzandola e permettendone l'integrazione, grazie all'azione dei fibroblasti. Un derma intatto e normale viene formato con un apparente derma reticolare e papillare (Stern R, 1990).

Jeschke ha proposto l'utilizzo della colla biologica di fibrina assieme alla TPN per poter aumentare l'integrazione della matrice dermica Integra®. Questi autori hanno visto che, utilizzando la colla di fibrina tra la perdita di sostanza e la matrice dermica, si aumenta di circa il 20% la possibilità di riuscita dell'innesto di matrice dermica su di una ferita. Inoltre, hanno visto che si può ridurre da 24 +/- 3 giorni a 10 +/- 1 giorno il tempo tra la vascolarizzazione della matrice e l'autoinnesto di cute su di essa, se si utilizza la colla biologica di fibrina e la TPN (Jeschke MG, 2004).

L'uso della colla di fibrina e della TPN, secondo questi autori, porterebbe ad una riduzione del tempo necessario all'integrazione della matrice dermica e si tradurrebbe in una riduzione dei rischi d'infezione della ferita, di trombosi del paziente, con una riduzione dei tempi di ricovero e delle complicanze associate a questo tipo di procedure.

È stato dimostrato che durante il processo di cicatrizzazione nelle perdite di sostanza, ci sia un rilascio di citochine e di ormoni pro infiammatori (come trombocitani

e prostaglandine), che aumentano e promuovono l'ipercatabolismo. Perdite di sostanza estese, dovute a gravi traumi, sono generalmente trattate con importanti interventi ricostruttivi (lembi liberi), che sono associati spesso a lunghi ricoveri, rischio d'infezioni, trombosi e perdita dei lembi (Dantzer E, 2001).

L'Integra® fu descritto per la prima volta da Burke e Yannas nel 1981 (Burke JF, 1981) per il trattamento delle ustioni estese. Questi autori concepirono la matrice Integra® per permettere un'escissione chirurgica precoce delle zone ustionate e la sua copertura temporanea, evitando così il rischio di infezioni e perdita eccessiva di liquidi con ipercatabolismo. La sua struttura tridimensionale, caratterizzata da collagene e GAGs stimola la migrazione cellulare (fibroblasti e cellule endoteliali) all'interno della matrice, con il risultato della ricostituzione di un nuovo derma simile a quello fisiologico (Moiemen NS, 2001) (fig.3 e 36).

L'obiettivo della matrice dermica è di provvedere ad un buon substrato per poter permettere la colonizzazione cellulare. Questa matrice tridimensionale permette le interazioni cellulari con sequestro dei fibroblasti e conseguente produzione di un nuovo tessuto connettivo. Il derma artificiale viene degradato progressivamente lasciando al suo posto un nuovo derma fatto da tessuto collagene normale e non cicatriziale (Moiemen NS, 2001; Chou TD, 2001; Burke JF, 1981). Sebbene questo neoderma sia

stabile, occorrerà effettuare un autoinnesto di cute a spessore parziale per permettere la guarigione completa della ferita.

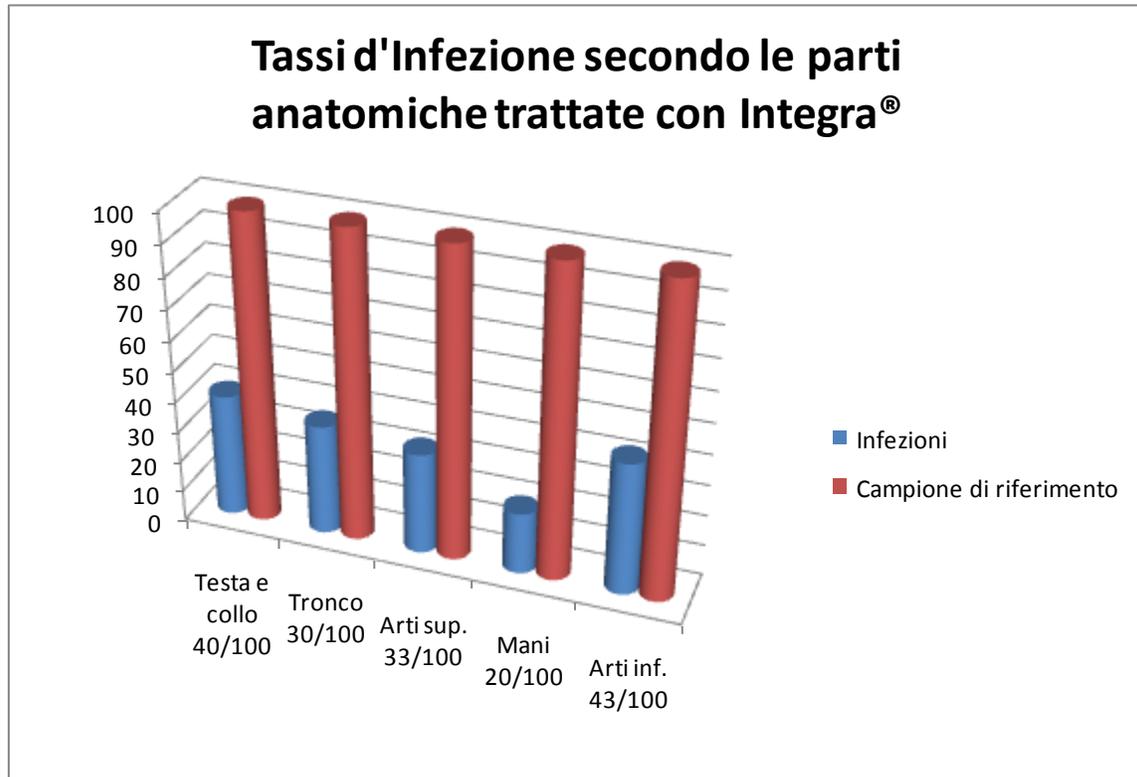
Complicazioni associate a questa procedura sono riassorbimento muscolare e rigidità articolare a causa dell'immobilizzazione, associati al rischio di infezioni e trombosi. Nel suo studio (Jeschke MG, 2004), Jeschke ha dimostrato una riduzione del 60% del tempo necessario tra le due fasi associando l'uso della colla di fibrina e la TPN. La TPN permette la neovascolarizzazione ed una riduzione dei margini della ferita. Per quanto riguarda la colla di fibrina, non si conosce ancora se agisca sulla neovascolarizzazione; nonostante ciò, ancorando la matrice alla perdita di sostanza ed associandola alla TPN, questi autori hanno dimostrato una riduzione delle infezioni.

Secondo diversi autori (Leffler L, 2010; Chun-Wui Kang G, 2010; Bargues L, 2009; Lee-Pu LQ, 2009; Lily F. Lee, 2008; Muangam P, 2006; Jeschke MG, 2004) la complicazione più frequente è l'infezione della matrice dermica dopo la sua deposizione sulla perdita di sostanza.

Secondo Muangam e Bargues, statisticamente, queste infezioni sono più frequentemente sostenute da varie specie di Staphylococcus e da Pseudomonas aeruginosa.

L'intervallo medio d'infezione delle matrici è, secondo Bargues, che lo ha valutato esclusivamente negli ustionati, di 13 +/- 5 giorni. Le zone meno infettabili, sempre secondo Bargues, sono le mani (20% dei casi), gli altri siti, con tassi più elevati sono: gli arti superiori (33% dei casi), il tronco (36% dei casi), la testa ed il collo (40% dei casi) e gli arti inferiori (43% circa) (Bargues L, 2010) (Tab.6).

Questo autore ha isolato generalmente bacilli Gram negativi come: Enterobatteri, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Haemophilus influenzae; dei cocci Gram positivi come: Staphylococchi e Streptococchi; raramente dei funghi e lieviti.



**Tab. 6:** Tasso d’infezione in funzione del sito anatomico d’impianto secondo Bargues. (Bargues L et al. (2009). Incidence et microbiologie des complications infectieuses lors d'utilisation de la peau artificielle Integra chez le brulé. *Annales de chirurgie plastique esthétique*, 54, 533—539).

Secondo Ryan (Ryan CM, 2002), in uno studio retrospettivo su 270 pazienti ustionati allo stesso grado, alla stessa percentuale corporea ed alla stessa età, l’utilizzo dell’Integra® è associato ad una riduzione significativa della durata totale del ricovero, malgrado le tre settimane di attesa tra la posa della matrice dermica e l’innesto cutaneo.

Uno dei vantaggi offerti dalle matrici dermiche è il migliore risultato estetico e funzionale finale.

Molti autori, a tal proposito, hanno notato e confermato la proprietà dei sostituti dermici di migliorare, sia funzionalmente sia esteticamente, il risultato cicatriziale finale, ma nessuno aveva apportato dei risultati oggettivi su tale aspetto. Alcuni autori hanno notato una buona uniformità degli innesti a distanza di tempo, associata ad un elevato recupero della elasticità e flessibilità cutanea (Bache SE, 2010; Martinet L, 2007; Wolter TP, 2005).

Bloemen (Bloemen MCT, 2010) ha condotto uno studio su un *follow up* di 12 anni su cicatrici trattate con Integra® e Matriderm® per ustioni in acuto e chirurgia ricostruttiva. Lo scopo di questo studio è valutare l'efficacia a lungo termine dei sostituti cutanei nei traumi acuti e nella chirurgia ricostruttiva dei postumi da ustioni.

In questo studio, gli Autori hanno trovato dei risultati nettamente migliori, sulle cicatrici che erano state trattate con sostituti dermici.

I sostituti dermici migliorano dunque le cicatrici apportando un supporto per la crescita, al loro interno, di vasi sanguigni e di fibroblasti autologhi.

Per effettuare la valutazione delle cicatrici, Bloemen e la sua equipe hanno utilizzato: il Cutometer Skin Elasticity Meter 575, per valutare la morbidezza e l'elasticità della cute; il Phaseshift Rapid in Vivo Measurement of Skin, per valutare l'omogeneità della cicatrice ed il suo aspetto liscio; ed infine la Patient and Observer

Scar Assessment Scale (POSAS) per una valutazione soggettiva ed oggettiva delle cicatrici.

Da questo studio è venuto fuori che le cicatrici che avevano avuto un sostituto dermico al momento del trauma, risultano, oggettivamente e soggettivamente, migliori nel loro aspetto (rugosità inferiore e omogeneità maggiore) e nella loro funzionalità (capacità elastiche maggiori), rispetto alle cicatrici che avevano avuto solo un autoinnesto di cute.

Si è visto che le cicatrici che hanno avuto un sostituto dermico e un autoinnesto di cute espanso, a parità di espansione, hanno una maggiore elasticità rispetto le cicatrici trattate solo con autoinnesto di cute.

Questo è stato spiegato dagli autori, dal fatto che il sostituto dermico permette un minore grado di ipertrofia tra gli interstizi dell'autoinnesto espanso; il sostituto dermico sarebbe in grado di fare da ponte tra gli interstizi dell'innesto apportando un derma seppure sottile.

Tutti questi risultati confermano che l'azione dei sostituti dermici è oggettivabile e continua, malgrado il tempo trascorso dal trauma (12 anni di *follow up*) e dalla loro deposizione.

Secondo alcuni autori (Greig A, 2010; Martinet L, 2007; Wolter TP, 2005),

l'utilizzo dell'Integra<sup>®</sup> nei traumi da sguantamento è un'alternativa ad altre tecniche più

complicate e pesanti per il paziente. Si ottiene così, una cute con una buona elasticità e flessibilità che resta stabile anche se esposta all'utilizzo di una protesi. Inoltre, il vantaggio delle matrici dermiche è che sono immediatamente disponibili e non si aggiunge una morbidità residua dovuto al prelievo di tessuti necessari per allestire un lembo. Questi sostituti permettono di ottenere cicatrici stabili a lungo termine con un migliore risultato estetico (Bloemen MTC, 2010), paragonato ad una cicatrizzazione ottenuta dal solo autoinnesto di cute a spessore parziale.

I sostituti dermici permettono inoltre, di coprire strutture nobili, tipo tendini, ossa ed articolazioni (Jeng J, 2007), quando un lembo non è un'opzione utilizzabile.

Le matrici dermiche permettono di limitare l'adesione degli innesti di cute a spessore parziale alle strutture profonde, riducendo anche le contrazioni cicatriziali e le cicatrici ipertrofiche.

Frame (Frame JD, 2004), in uno studio multicentrico, ha notato che l'uso dell'Integra<sup>®</sup>, in pazienti ustionati, assieme ad altri presidi (fisioterapia (57%), pressoterapia (46%), immobilizzazione delle fratture (64%)), ha riportato soddisfacenti risultati senza aderenze cicatriziali alle strutture profonde, né cicatrici patologiche.

## Ricerche cliniche

Come abbiamo visto, il processo di cicatrizzazione è caratterizzato da una moltitudine di cellule, che possono secernere un assortimento di citochine ed altri composti, influenzanti il processo cicatriziale.

Sebbene i modelli in vitro sono alquanto sviluppati e si avvicinano moltissimo all'ambiente tipico di una ferita, mancano comunque d'importanti aspetti fisiologici, come per esempio, il ruolo del sistema immunitario nel processo cicatriziale.

Lo scopo principale di testare dei materiali in vitro è quello di testare la tossicità di questi materiali e di conoscere la loro interazione ed integrazione con le cellule dell'organismo.

I fibroblasti sono il principale tipo cellulare implicato nel processo cicatriziale. Essi sono responsabili del mantenimento del derma e per questo sono le cellule più importanti nel processo di cicatrizzazione.

Nei test in vitro, sono fondamentali per testare il materiale costituente la matrice dermica, poiché permettono di verificare la possibile risposta in vivo da parte dei fibroblasti dell'ospite e quindi la sua metabolizzazione. Possono essere facilmente ottenuti per mezzo di coltura; messi a contatto della matrice da testare permettono di

verificare la migrazione cellulare, la proliferazione cellulare e la contrazione della matrice stessa. Tutti questi elementi daranno informazioni riguardanti la dimensione dei pori, il legame con le integrine e i siti di degradazione proteolitica.

Secondo Wong (Wong T, 2007) i fibroblasti giocano un ruolo fondamentale nel processo di cicatrizzazione e nelle interazioni cellule epiteliali e cellule mesenchimali; secernendo una serie di differenti citochine e fattori di crescita, stimolano direttamente la proliferazione epidermica, la formazione e la differenziazione della matrice extracellulare.

I fibroblasti, provenienti da differenti siti anatomici, presentano un DNA differente (Chang HY, 2002), con una differente espressione genica e caratteristiche fenotipiche diverse; sono capaci di sintetizzare proteine della matrice extracellulare e citochine, specifiche del sito di origine.

L'integrazione dei fibroblasti nei sostituti dermici di sintesi ha dato, secondo Wong, incoraggianti risultati, includendo: la scomparsa del dolore sintomatico, un più rapido processo di guarigione delle ferite acute e croniche, risultati estetici migliori ed un tessuto cicatriziale ridotto.

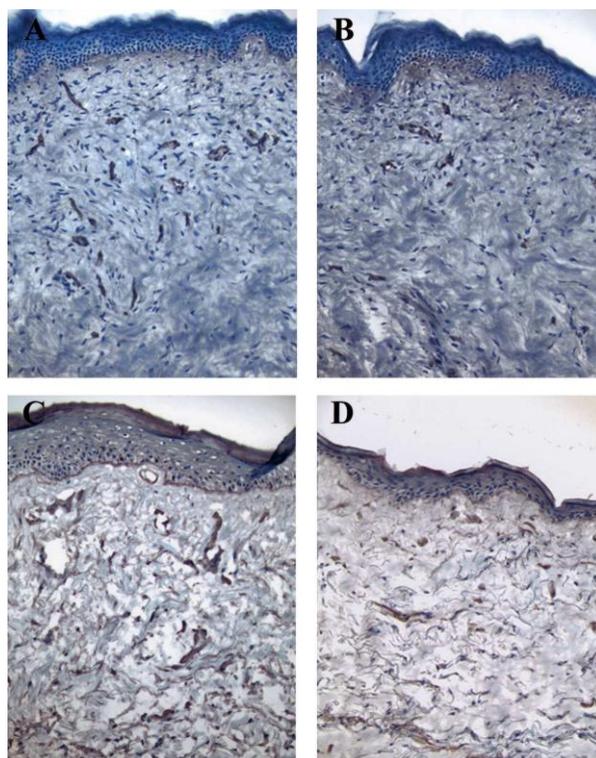
Secondo un altro autore (Erdag G, 2004), che conferma il ruolo centrale dei fibroblasti, queste cellule mesenchimali, appaiono rapidamente nel sito della ferita e accelerano il processo cicatriziale, tramite:

- la regolazione della deposizione della matrice extracellulare (collagene tipo I, tipo IV, elastina e laminina),
- la differenziazione epidermica,
- la rigenerazione dermica.

In aggiunta, i fibroblasti secernono vari fattori di crescita, che aiutano e stimolano il processo di cicatrizzazione:

- Insulin Growth Factor (IGF),
- Keratinocyte Growth Factor (KGF),
- Platelet Derived Growth Factor A (PDGF-A),
- Trasforming growth Factor (TGF),
- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
- Differenti citochine;

L'aggiunta di queste cellule ai sostituti dermici, secondo Erdag, porta ad una promozione della rigenerazione dermo-epidermica e ad una differenziazione epidermica (fig. 38).



**Fig. 38:** Istologia dei sostituti dermici con (A e C) e senza fibroblasti (B e D) a due settimane dopo il trapianto. Colorazione con anticorpi monoclonali anti-CD31 e collagene tipo IV. La colorazione marrone indica la positività a questi anticorpi (200x). Figura presa da:” Erdag G et al. (2004). Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns*, 30, 322-28”

Nel suo lavoro, Erdag indaga sui benefici dell'aggiunta dei fibroblasti al sostituto epidermico, testandolo su topi atimici. I sostituti cutanei con aggiunta di fibroblasti, se trapiantati su topi atimici (topi nudi), mostrano uno strato epidermico più spesso, un

aumentato attecchimento quando impiantati, una ridotta contrazione cicatriziale ed una più importante rivascolarizzazione rispetto ai sostituti dermici senza fibroblasti.

L'aggiunta dei fibroblasti promuove una precoce proliferazione cheratinocitica e la loro stratificazione, producendo uno strato epidermico più spesso.

Un'aumentata espressione di Integrina  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\beta_1$  e di cheratina 10 hanno dimostrato l'attivazione dei cheratinociti e la loro differenziazione. Il KGF é un fattore di origine fibroblastica, ma che stimola i cheratinociti.

I fibroblasti promuovono la rigenerazione dermo-epidermica e l'adesione dei cheratinociti, secernendo proteine della membrana basale (Maruguchi T, 1994; Tuan TL, 1994). Quest'ultima è essenziale per l'adesione dei cheratinociti.

A parte l'influenza sull'epidermide, i fibroblasti svolgono un ruolo sul derma; ad esempio la contrazione dermica durante la cicatrizzazione. Erdag ha osservato una contrazione inferiore (pari al 2%) nelle ferite trattate con sostituti dermici con fibroblasti rispetto al 29% delle ferite trattate con i soli sostituti cutanei. Inoltre, i sostituti dermici con fibroblasti sono rivascolarizzati più velocemente rispetto ai semplici sostituti dermici. Dopo una settimana, all'esame istologico, non ci sono vasi nei sostituti dermici senza fibroblasti, mentre si cominciano a distinguere strutture

endoteliali nei sostituti con fibroblasti; a due settimane la differenza è ancora più importante ed eclatante (fig. 38).

Da questo studio si può evincere le enormi possibilità che hanno le matrici dermiche inseminate con fibroblasti e con cellule epidermiche (cheratinociti e melanociti).

I cheratinociti sono un altro importante tipo cellulare che interagisce con il sostituto dermico nel processo di cicatrizzazione. Un sostituto dermico che acceleri la ripitelizzazione di una ferita, può accelerare il processo di cicatrizzazione. Per poter sopravvivere e restare nella perdita di sostanza, i cheratinociti hanno bisogno della membrana basale, elemento mancante nei sostituti dermici. Se si vuole introdurre l'utilizzo dei cheratinociti nei sostituti dermici, che in questo caso agirebbero come mezzo di trasporto cellulare, fondamentale diviene la scelta dei cheratinociti, poiché i cheratinociti di tipo HaCaT (Boelsma E, 1999) e quelli provenienti da prepuzio di neonato hanno una capacità di produrre l'epidermide alquanto differente dai cheratinociti normali adulti (Tjabringa G, 2008).

L'interazione fibroblasti-cheratinociti gioca un ruolo fondamentale su tutti gli altri ceppi cellulari e sul processo di cicatrizzazione. (Ghahary A, 2007).

Infatti, l'interazione cheratinociti-fibroblasti, durante il processo di cicatrizzazione determina un'attivazione ed una over-expression delle MMPs, soprattutto la MMP-1 (collagenasi), la MMP-2 (gelatinasi), la MMP-3 (stromelisina-1) e la MMP-11 (stromelisina-3).

L'interazione cheratinociti-fibroblasti avviene, secondo Ghahary, grazie alla produzione, da parte dei cheratinociti, del KDAF (Keratinocyte-Derived Antifibrinogenic Factor), l'IL- $\beta$  e l'EGF, che agiscono sui fibroblasti attivandone la produzione delle MMPs.

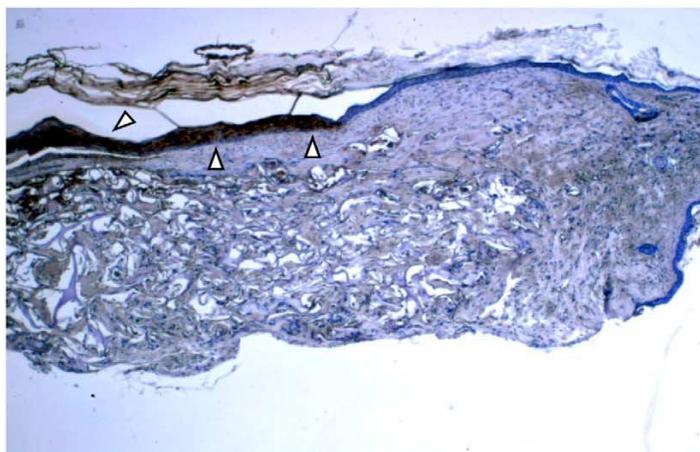
Kopp (Kopp J, 2004) ha studiato le colture epiteliali associate alle matrici di fibrina naturale. Le applicazioni in vivo, di questo tipo di sostituto tissutale, hanno dimostrato che i cheratinociti autologhi umani, coltivati e posti sulla perdita di sostanza assieme ad una matrice di fibrina, sono in grado di aderire alla perdita di sostanza e di proliferare sulla ferita, portando ad una riepitelizzazione delle perdite di sostanza sia acute che croniche.

La matrice di fibrina produce da sola l'emostasi e l'adesione degli innesti alla perdita di sostanza, agendo da mezzo di trasporto per i cheratinociti autologhi. La matrice successivamente sarà degradata e metabolizzata in pochi giorni dopo l'applicazione.

Come naturale substrato del processo di cicatrizzazione, la fibrina, sotto forma di matrice, rappresenta un mezzo di trasporto ideale per apportare, senza difficoltà, delle cellule coltivate in vitro e per poter guidare la riorganizzazione dei cheratinociti.

Un altro autore (Mis B, 2004) ha studiato le capacità delle matrici di fibrina-autoinnesti di cute coltivati in vitro (FS-CEA: Fibrin Sheet-Cultured Epithelium Autografts) rispetto alle classiche matrici collageniche (Integra®).

Le matrici di fibrina sono prodotti biodegradabili che giocano un ruolo importante per l'adesione epiteliale, la sopravvivenza e lo sviluppo del neo-derma. Secondo i suoi studi in vivo su topi atimici, dopo circa 2-5 giorni di cultura, all'esame istologico, si poteva vedere la presenza dei fibroblasti nella matrice dermica e questo determinava un aumento dell'adesione dell'epitelio sul derma artificiale. Le colture di cheratinociti (CE: cultured epithelium) erano più fermamente aderite alla matrice dermica, quando questa era inseminata da cellule, come ad esempio i fibroblasti. Strette giunzioni, tra i fibroblasti e le matrici di fibrina sono state viste nelle matrici inseminate con quest'ultimo tipo di cellule. Lo strato di fibrina determina un ambiente favorevole all'adesione dei cheratinociti ed alla loro crescita sulla superficie di un derma artificiale. In vivo, su topi atimici, tre settimane circa dopo l'innesto, è stato osservato che, il derma artificiale era ben integrato con i tessuti dell'ospite (fig. 39).



**Fig. 39:** Biopsia a tre settimane dell'epitelio rigenerato. I cheratinociti umani coltivati in vitro e trasportati tramite matrici di fibrina (FS-CE) innestati assieme all'Integra® su topi atimici (90x), attecchiscono solo se posti sull'Integra®. Le frecce mettono in evidenza un marker fisiologico dei cheratinociti umani, l'involucrina (proteina prodotta dalle cellule epiteliali ed accumulata nello strato spinoso dell'epidermide). Figura presa da: " Mis B et al. (2004). Combined use of a collagen-based dermal substitute and a fibrin-based cultured epithelium: a step toward a total skin replacement for acute wounds. *Burns*, 30, 713–719"

La presenza di alcuni neovasi è stata riportata ai margini della matrice. Le cellule dell'ospite sono molto più numerose ai margini della matrice, che al centro della stessa, spiegabile dal fatto che la colonizzazione avviene soprattutto dalla periferia verso il centro, come affermato da Lee (Lee LF, 2008).

Lo scopo di questo studio era, secondo Mis, di dimostrare che l'uso combinato di un derma artificiale (Integra®) e delle matrici di fibrina associate alle colture epiteliali (FS-CEA) potrebbe divenire una procedura efficace per il trattamento delle perdite di sostanza acute o croniche che siano.

La fibrina é un prodotto della cascata del sistema di coagulazione e gioca un ruolo importante durante il processo cicatriziale. É stato provato che la matrice di fibrina, anche se provvisoria, aiuti la migrazione dei cheratinociti nella perdita di sostanza per poter permettere la sua riepitelizzazione (Martin P, 1997; Odland G, 1968), agendo da substrato per i cheratinociti.

Le proprietà fisiche della fibrina aumentano enormemente il trapianto e la manipolazione delle colture di cheratinociti.

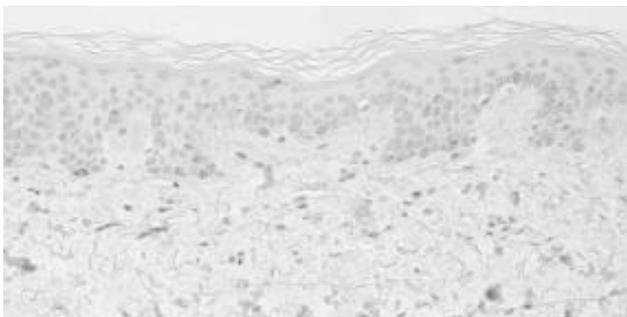
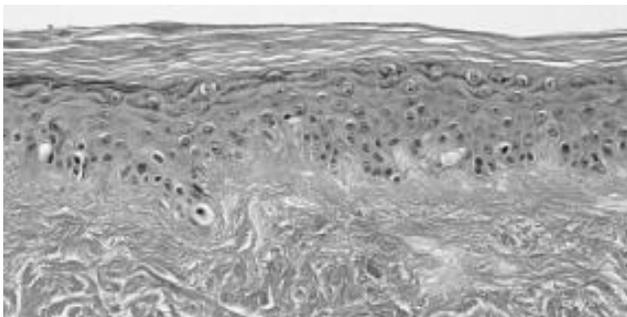
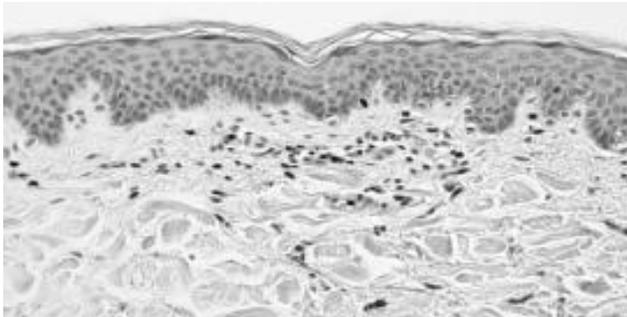
Mis e i suoi collaboratori hanno dimostrato che le matrici di fibrina aumentano l'adesione e lo sviluppo dell'epidermide su di un derma artificiale, in questo caso l'Integra® (fig. 39).

Un altro studio (Waaijman T, 2010) ha dimostrato, per il momento solo in vitro, che la matrice tridimensionale costituita da collagene tipo I, III e V ed elastina (Matriderm®) é in grado di permettere un facile trasporto e trasferimento di cellule epiteliali (cheratinociti e melanociti) proliferanti sulla perdita di sostanza. Dopo il trasporto Waaijman ha dimostrato, che queste cellule sono in grado di rigenerare e creare un epidermide ben differenziato, contenente dei melanociti.

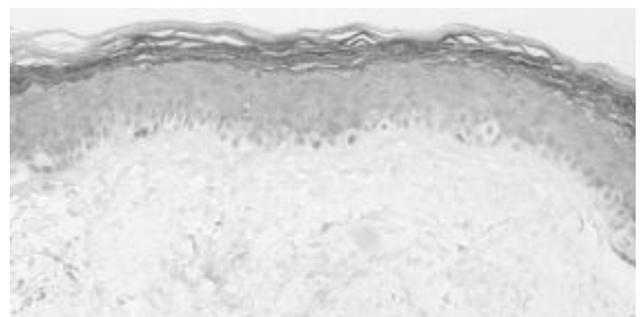
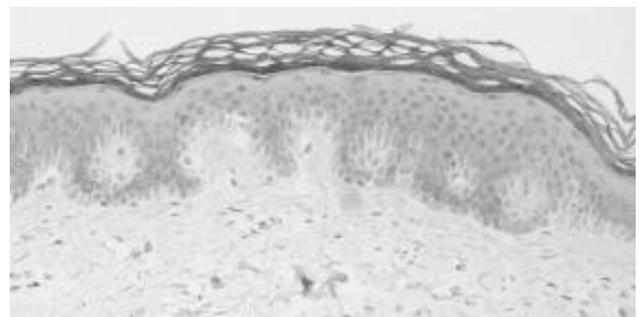
Gli autori hanno scelto il Matriderm® come mezzo di trasporto per le cellule epiteliali umane autologhe coltivate in vitro. Queste cellule sono capaci di proliferare ed hanno un buon potenziale rigenerativo. Secondo questi autori, il loro protocollo é

riproducibile con piccole variazioni intra- ed inter- sperimentali riguardo, soprattutto la quantità (numero di cellule), che possono essere trasferite con il Matriderm®.

### Cute Normale



### Epidermide coltivata su Matriderm®



**Fig. 40:** Epidermide coltivata in vitro (a 14 giorni di sviluppo). All'Ematossilina/Eosina si evidenzia una cute completamente sviluppata. Alla colorazione immunostochimica per le cellule attivate dell'epidermide (Ab anti-cheratina 6) e per le cellule differenzianti dell'epidermide (Ab anti-cheratina 10), si evidenzia una cute completamente normale. Preso da:” Waaijman T et al. (2010). Use of a collagen / elastin matrix as transport carrier system to transfer proliferating epidermal cells to human dermis in vitro. *Cell Transplantation* , 3”

La possibilità di costruire in vitro un sostituto dermico con delle cellule epiteliali proliferanti e di poterlo successivamente trapiantare sulla perdita di sostanza apre enormi possibilità ricostruttive sui grandi ustionati e nelle gravi perdite di sostanza post-traumatiche, nonché sulle perdite di sostanza croniche. In questo studio le cellule epiteliali ed il Matriderm<sup>®</sup> sono trasferiti sulla perdita di sostanza nel giro di tre giorni, così da permettere una rigenerazione epidermica completa nel giro di due settimane. L'epidermide ricostruita presenta un compatto strato basale, uno strato spinoso, uno strato granuloso, ed uno strato corneo; inoltre, non c'è alcun segno di *blistering*, ossia di separazione tra epidermide e membrana basale dermica.

In aggiunta la presenza di melanociti, dimostra che il Matriderm<sup>®</sup> ha le potenzialità e le capacità di rigenerare un'epidermide pigmentata.

La proliferazione e differenziazione dei cheratinociti è associata ad un aumento della cheratina 6, fattore positivo nel processo di cicatrizzazione, poiché lo favorisce e permette la riepitelizzazione promuovendo la migrazione dei cheratinociti (Smiley AK, 2006).

Questo studio in vitro ha prodotto un robusto protocollo che potrà passare alla fase successiva di studio clinico.

Per restare nelle sperimentazioni dei sostituti dermici come mezzo di trasporto cellulare, Pianigiani (Pianigiani E, 2010) ha utilizzato del derma allogeneo

disepidermizzato (DED) come sostituto dermico, nel quale ha inseminato vari tipi cellulari, per permettere un trasporto, sulla zona traumatizzata, di derma e di cellule proliferanti capaci di accelerare il processo di cicatrizzazione.

In vitro, gli autori sono riusciti ad inoculare nel DED fibroblasti attivi, che restano tali per 21 giorni; dopo 4 settimane, gli autori hanno osservato delle alterazioni morfologiche strutturali del DED.

L'idea degli autori è quella di inoculare delle cellule staminali totipotenti CD34+, prelevati da cordone ombelicale umano, nel DED; tutto questo per poter permettere, tramite il DED, come mezzo di trasporto, di portare sulla perdita di sostanza, cellule staminali e permettere a quest'ultime di potersi differenziare secondo necessità locali, favorendo la crescita e la proliferazione dei cheratinociti e la sintesi dei componenti della membrana basale.

All'esame istologico, 14 giorni dopo aver inoculato delle cellule staminali periferiche totipotenti CD34+, è possibile ritrovare, vicino alle fibrille di collagene, la presenza di cellule, metabolicamente attive, strutturalmente simili ai fibroblasti. Questo non si verifica nei controlli, dove le cellule CD34+ non venivano inoculate.

Dopo 14 giorni, gli autori hanno trovato nel derma profondo, delle strutture tubulari senza lume CD31+, indice questo di un'attivazione della neoangiogenesi.

Sono stati osservati, inoltre, dei cluster di cellule epiteliali e cellule simili ai fibroblasti senza caratteristiche specifiche.

Dopo quattro settimane, però, l'integrità strutturale della matrice dermica comincia a venire meno.

Questo studio dà lo spunto a nuove idee nella ricerca di nuovi materiali biocompatibili, dimostrando la validità del derma disepidermizzato autologo, come matrice dermica capace di permettere la colonizzazione e la proliferazione delle cellule dermiche ed epidermiche.

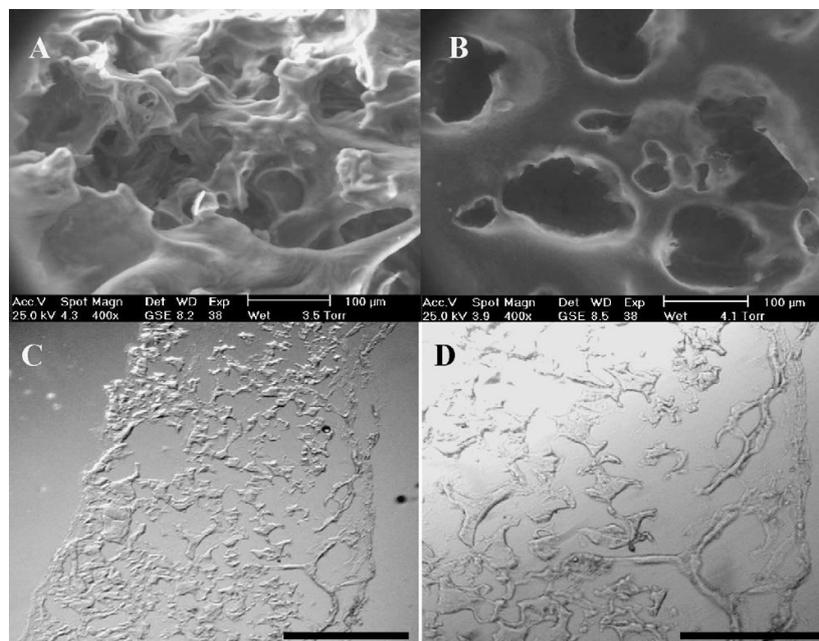
Fino ad ora abbiamo parlato della possibilità di inseminare le matrici dermiche naturali di origine sintetica con cellule epidermiche e con fibroblasti, ma vi sono degli studi rivolti verso la creazione di matrici dermiche sintetizzate in laboratorio, capaci di permettere la sopravvivenza cellulare se inseminate con le suddette cellule.

Tra gli studi più rilevanti, Garric (Garric X, 2008) ha dimostrato che i derivati dell'acido poli-lattico (PLA) sono da tener in considerazione per la concezione di matrici dermiche porose biocompatibili, inseminate con fibroblasti umani e cheratinociti.

I risultati di questo suo studio, mostrano che i polimeri di PLA<sub>50</sub>-PEG-PLA<sub>50</sub> (acido poli-L-lattico – polietilenglicolo – acido poli-L-lattico) sono compatibili con le colture cellulari di fibroblasti e di cheratinociti umani e la necessità che la matrice abbia una struttura tridimensionale porosa, è una condizione essenziale e necessaria per la

formazione di un sostituto dermico che sia colonizzabile da cellule della sfera cutanea.

È possibile rendere porosa una matrice tramite la tecnica di Lin (Lin HR, 2002), ossia imprigionando dei sali di bicarbonato d'ammonio al momento della sua costruzione; successivamente questi sali saranno disciolti lasciando lo spazio ai pori della matrice (tra 20 e 500  $\mu\text{m}$ ) (fig.41).



**Fig. 41:** Struttura di una matrice porosa di PLA<sub>50</sub>-PEG-PLA<sub>50</sub> ottenuta con la tecnica di Lin di solubilizzazione dei sali. Le immagini A (faccia superiore) e B (faccia inferiore) sono ottenute al microscopio elettronico a scansione, mentre le immagini C e D (in sezione) sono ottenute al microscopio ottico. Le barre rappresentano 1 mm e 500 $\mu\text{m}$ . Preso da:" Garric X et al. (2008). Développement de nouveaux substituts cutanés à base de polymères biorésorbables pour la prise en charge des affections cutanées sévères. *Annales Pharmaceutiques Françaises* (66), 313—318"

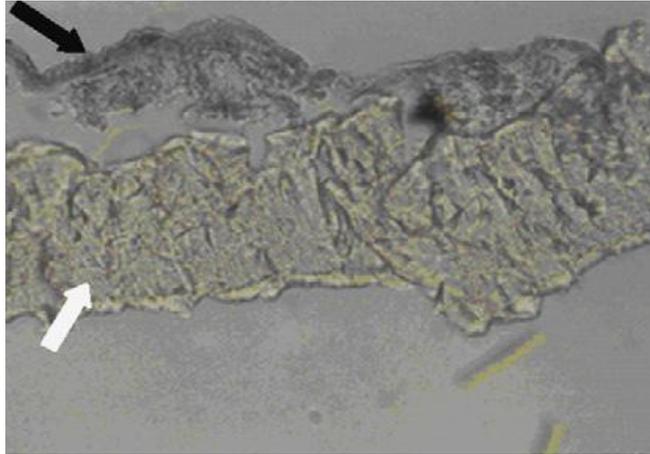
Questi polimeri di PLA<sub>50</sub>-PEG-PLA<sub>50</sub> sembrano fornire il migliore compromesso alla costruzione di una matrice dermica porosa biodegradabile e biocompatibile dato che possiedono numerosi vantaggi:

1. un meccanismo di degradazione con sviluppo di sola acqua;
2. la moltitudine di monomeri utilizzabili e la varietà delle composizioni determinerà le loro proprietà meccaniche e il tempo necessario alla loro degradazione;
3. la loro biocompatibilità, già testata e provata, in numerose utilizzazioni, come: nei fili di sutura, negli stents uretrali, nelle viti d'interferenza, etc.

La biocompatibilità delle cellule umane con il film di PLA è già stata provata, sempre da Garric (Garric X, 2005); i cheratinociti ed i fibroblasti presentano un'eccellente adesione per questo tipo di supporto.

I risultati di questo studio hanno dimostrato una biocompatibilità tra le cellule epiteliali e la matrice, che autorizza la proliferazione dei cheratinociti e dei fibroblasti umani, ma dopo 14 giorni, purtroppo le matrici di PLA<sub>50</sub>-PEG-PLA<sub>50</sub> diventano friabili e si rompono facilmente, non permettendo la manipolazione chirurgica (fig.42).

Ulteriori studi dovranno essere condotti per poter migliorare le grandi potenzialità di questi materiali e aumentarne la manipolazione fino a renderle efficaci nella clinica quotidiana.



**Fig.42:** Formazione di un foglietto epidermico su di una matrice di PLA<sub>50</sub> dopo 14 giorni di cultura. La freccia bianca indica la matrice polimerica PLA<sub>50</sub>-PEG-PLA<sub>50</sub>; la freccia nera il monostrato epidermico. Preso da:" Garric X et al. (2008). Développement de nouveaux substituts cutanés à base de polymères biorésorbables pour la prise en charge des affections cutanées sévères. *Annales Pharmaceutiques Françaises* (66), 313—318"

Possibilmente la degradazione di questi materiali sintetici e la loro involuzione dopo un certo periodo di tempo è dato dal fatto che, come pubblicato da Grieb (Grieb G, 2010), la loro attività è limitata alle loro basse capacità e potenzialità angiogeniche. La rapida degradazione in vivo dei vari growth factor, riduce la rivascularizzazione di questi prodotti di sintesi e la loro attività plastica.

Grieb ha riportato la possibilità di aumentare le capacità proliferative della placca, tramite un cross-linking fisico del VEGF e del FGF- $\beta$ , tramite un'immobilizzazione dei fattori di crescita con l'eparina, legata alla matrice.

In questo modo si aumentano le capacità proliferative della matrice stessa, aumentandone il tempo di rilascio e dunque la permanenza di questi fattori nel sito interessato dal processo di cicatrizzazione.

L'esposizione di queste matrici modificate a cellule endoteliali (EC) ed ai progenitori delle cellule endoteliali (EPC) ha dimostrato una più alta attività proliferativa

rispetto le matrici di controllo (non modificate, non eparinate e non accoppiate al VEGF e FGF- $\beta$ ).

Entrambi i ceppi cellulari sono indispensabili alla neoangiogenesi ed alla vasculogenesi. Per neoangiogenesi si intende un processo di formazione di nuovi vasi attraverso la proliferazione di cellule endoteliali da una rete vascolare pre-esistente; la vasculogenesi, invece, è la formazione di vasi sanguigni *de novo*, attraverso l'incorporazione e la proliferazione delle cellule progenitrici endoteliali (Velazquez OC, 2007).

Questo studio ha dimostrato la capacità di queste matrici modificate, di agire su entrambi i processi e su entrambi i ceppi cellulari.

Recenti studi hanno messo in evidenza che le cellule progenitrici endoteliali sono un gruppo cellulare eterogeneo, che include cellule che si differenziano verso la linea cellulare endoteliale, responsabile della formazione del lume vasale e in cellule che supportano la formazione vascolare attraverso la secrezione di citochine e la modificazione dello spazio extracellulare (Prater DN, 2007).

Ulteriori studi saranno necessari per certificare gli effetti della matrici modificate studiate fin ora in vitro nella neoangiogenesi e nella vasculogenesi.

# 7

## Conclusioni

La bio-ingegneria tissutale, nonostante in suo rapido e relativamente recente sviluppo, ha mantenuto la promessa di permettere un approccio completamente nuovo nella riparazione e ricostruzione delle perdite di sostanza della cute e dei tessuti molli, siano queste di origine traumatica, siano in seguito ad una chirurgia oncologica od a difetti congeniti.

L'ingegneria tissutale associa i progressi tecnologici nelle culture cellulari ai progressi scientifici medici e chirurgici per permettere nuove soluzioni, tramite l'impianto di materiali sintetici sostitutivi sempre più efficaci e performanti.

I risultati, ottenuti sino a questo punto, indicano che i sostituti dermici hanno degli enormi potenziali, per permettere un aumento delle possibilità terapeutiche a disposizione del chirurgo ed a vantaggio del paziente.

La comprensione dettagliata delle interazioni tra la matrice dermica sostitutiva, i tessuti dell'organismo ospite e le sue cellule, sia di origine dermica, come i fibroblasti e gli endotelociti, sia di origine epiteliale, come i cheratinociti ed i melanociti, ci permetterà, in futuro, di influenzare la possibilità di aumentare la migrazione e l'adesione dei cheratinociti su di essa, per permetterne l'attecchimento e la ricostituzione di una cute normale.

Questo potrà eventualmente essere estremizzato fino al punto da poter pensare che sia possibile rigenerare i tessuti, creando direttamente in vitro una cute, composta da uno strato dermico e da uno strato epidermico, che rimpiazzerà la cute perduta e di conseguenza rimpiazzerà la presenza di un esito cicatriziale.

È alquanto tentante speculare sul fatto che sia possibile coltivare in vitro una matrice multistrato e modificarla geneticamente, accelerandone le capacità neoangiogeniche e scatenando:

- la crescita al suo interno delle fibre nervose sensitive, per rigenerare le sensazioni cutanee;
- la crescita di cellule staminali orientate verso la differenziazione epiteliale e dei suoi annessi, per permettere la ricomparsa degli annessi cutanei e di una cute completamente simile alla cute normale.

Appare alquanto chiaro che una collaborazione interdisciplinare tra ricercatori e medici sia fondamentale per lo sviluppo dell'ingegneria tissutale. Per i clinici, il compito principale è quello di ottenere una cicatrizzazione completa e della migliore qualità possibile, nel più breve tempo possibile. Per i ricercatori, lo scopo finale è quello di ottenere in laboratorio una cute perfettamente normale, capace di essere conservata "in uno scaffale" e pronta all'uso in qualsiasi momento.

In un prossimo futuro, i sostituti cutanei potranno, possibilmente, essere capaci di stimolare una rigenerazione tissutale piuttosto che una riparazione e questi saranno considerati *gold standard*, come lo sono oggi gli autoinnesti di cute.

## 8

### Bibliografia

1. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*, 20 (2), 86-100.
2. Anh-Tuan N. Truong, Areta Kowal-Vern, Barbara A. Latenser, Dorion E. Wiley, Robert J. Walter. (2005). Comparison of Dermal Substitutes in Wound Healing Utilizing a Nude Mouse Model. *Journal of burns and wounds* (4:e4), 72-82.
3. Argenta LC, Morykwas MJ, Marks MW, DeFranzo AJ, Molnar JA, David LR. (2006). Vacuum-assisted closure: state of clinic art. *Plast Reconstr Surg*, 117 (Suppl 7), 127S-42S.
4. Bache SE, Watson SB,. (2010). Bedside application of Integra. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 1-2.
5. Bargues L, Boyer S, Leclerc T, Duhamel P, Bey E. (2009). Incidence et microbiologie des complications infectieuses lors d'utilisation de la peau artificielle Integra chez le brûlé. *Annales de chirurgie plastique esthétique*, 54, 533—539.
6. Blackwood KA, McKean R, Canton I, Freeman CO, Franklin KL, Cole D. (2008). Development of biodegradable electrospun scaffolds for dermal replacement. *Biomaterials*, 29 (21), 3091-104.
7. Bloemen M. C. T., van Leeuwen M.C.E., van Vucht N.E., van Zuijlen P.P.M., Middelkoop E. (2010). Dermal Substitution in Acute Burns and Reconstructive Surgery: A 12-Year Follow-Up. *Plast. Reconstr. Surg.*, 125 (5), 1450-59.
8. Boelsma E, Verhoeven MC, Ponc M. (1999). Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). *J invest Dermatol*, 112 (4), 489-98.
9. Brandi C, Grimaldi L, Nisi G, Silvestri A, Brafa A, Calabro` M, D'Aniello C. (2008). Treatment with vacuum-assisted closure and cryo-preserved homologous de-epidermalised dermis of complex traumas to the lower limbs with loss of substance, and bones and tendons exposure. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 61, 1507-1511.

10. Burke JF, Yannas IV, Quinby Jr WC, Bondoc CC, Jung WK. (1981). Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* , 194 (4), 413-28.
11. Campitiello F, Della Corte A, Fattopace A, D'Acunzi D, Canonico S. (2005). The use of artificial dermis in the treatment of chronic and acute wounds: regeneration of dermis and wound healing. *ACTA BIOMED*, 76 (Suppl 1), 69-71.
12. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. (2002). Diversity, topographic differentiation and positional memory in human fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA* , 99 (20), 12877-82.
13. Chou TD, Chen SL, Lee TW, Chen SG, Cheng TY, Lee CH, Chen TM, Wang HJ. (2001). Reconstruction of burn scar of the upper extremities with artificial skin. *Plast Reconstr Surg*, 108, 308
14. Chun-Wui Kang G, Chen Por Y, Bien-Keem Tan. (2010). In Vivo Tissue Engineering Over Wounds With Exposed Bone and Tendon Autologous Dermal Grafting and Vacuum-assisted Closure. *Annal Plastic Surg*, 65 (1), 70-3.
15. Dagalakis N, Flink J, Stasikelis P, Burke JF, Yannas IV. (1980). Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. *J Biomed Mater Res* , 14 (4), 511-28.
16. Dai Q.A. Nguyen, Tom S. Potokar, Patricia Price. (2010). An objective long-term evaluation of Integra (a dermal skin substitute) and split thickness skin grafts, in acute burns and reconstructive surgery. *Burns* (36), 23-28.
17. Dantzer E, Braye FM. (2001). Reconstructive surgery using an artificial dermis (Integra): Results with 39 grafts. *Br J Plast Surg*, 54, 659.
18. Dantzer E, Queruel P, Salinier L, Palmier B, Quinot JF. (2003). Dermal regeneration template for deep hand burns: clinical utility for both early grafting and reconstructive surgery. *British Journal of Plastic Surgery* , 56, 764-74.
19. De Vries HJ, Middelkoop E, Mekkes JR, Dutriex RP, Wildevuur CH, Westerhof H. (1994). Dermal regeneration in native non-cross-linked collagen sponges with different extracellular matrix molecules. *Wound Repair Regen* , 1, 37-47.

20. Delustro F, Dasch J, Keefe J, Ellingsworth L. (1990). Immune responses to allgenic and xenogenic implants of collagen and collagen derivatives. *Clinical orthopaedics and related research* , 260, 263-79.
21. Erdag G, Sheridan RL. (2004). Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns* , 30, 322-28.
22. Frame JD, Still J, Lakhel-LeCoadou A, Carstens MH, Lorenz C, Orlet H, Spence R, Berger AC, Dantzer E, Burd A. (2004). Use of dermal regeneration template in contracture release procedures: a multicenter evaluation. *Plast Reconstr Surg*, 113, 1330-38.
23. Garric X, Moles JP, Garreau H, Guilhou JJ, Vert M. (2005). Human skin cell cultures onto PLA50 (PDLLA) bioresorbable polymers: influence of chemical and morphological surface modifications. *J Biomed Mater Res A* , 72 (2), 180-89.
24. Garric X, Vert M, Molès JP. (2008). Développement de nouveaux substituts cutanés à base de polymères biorésorbables pour la prise en charge des affections cutanées sévères. *Annales Pharmaceutiques Françaises* (66), 313—318.
25. Gavin Chun-Wui Kang, Yong Chen Por, Bien-Keem Tan. (2010). In Vivo Tissue Engineering Over Wounds With Exposed Bone and Tendon. *Annals of Plastic Surgery* , 65 (1), 70-73.
26. Ghahary A, Ghaffari A. (2007). Role of keratinocyte-fibroblast cross-talk in development of hypertrophic scar. *Wound Repair Regen* , 15 (Suppl. 1), S46-53.
27. Ghosh MM, Boyce S, Layton C, Freedlander E, Mac Neil SA. (1997). A comparison of methodologies for the preparation of human epidermal-dermal composites. *Annal Plastic Surg* , 39 (4), 390-404.
28. Gravante G, Sorge R, Merone A, Tamisani AM, Di Lonardo A, Scalise A, Doneddu G, Melandri D, Stracuzzi G, Onesti MG, Cerulli P, Pinn R, Esposito G. (2010). Hyalomatrix PA in burn care practice: results from a national retrospective survey, 2005 to 2006. *Ann Plast Surg*. 64(1): 69—79.

29. Greig A, Angel J, Jones N, Healy C. (2010). The use of Integra with a sensate fasciocutaneous pedicled flap for the salvage reconstruction of a below knee amputation after pedestrian vs train multi-planar degloving injury. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* , 63, e38 - e40.
30. Grieb G, Groger A, Piatkowski A, Markowicz M, Steffens GCM, Pallua N. (2010). Tissue Substitutes with Improved Angiogenic Capabilities: An in vitro Investigation with Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells. *Cells Tissues Organs* , 191, 96-104.
31. Hahnenberger R, Jakobson AM. (1991). Antiangiogenic effect of sulphated and nonsulphated glycosaminoglycans and polysaccharides in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Glycoconj J* , 8 (4), 350-53.
32. Haslik W, Kamolz LP, Manna F, Hladik M, Rath T, Frey M. (2010). Management of full-thickness skin defects in the hand and wrist region: first long-term experiences with the dermal matrix Matriderm. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* , 63, 360-364.
33. Hernon CA, Harrison CA, Thornton DJ, MacNeil S. (2007). Enhancement of keratinocyte performance in the production of tissue-engineered skin using a low-calcium medium. *Wound Repair Regen*, 15, 718–26.
34. Jeng JC, Fidler PE, Sokolich JC, Jaskille AD, Khan S, White PM, Street JH, Light TD, Jordan MH. (2007). Seven Years' Experience With Integra as a Reconstructive tool. *Journal of Burn Care & Research* , 28 (1), 120-26.
35. Jeschke MG, Rose C, Angele P, Füchtmeier B, Nerlich MN, Bolder U. (2004). Development of New Reconstructive Techniques: Use of Integra in Combination with Fibrin Glue and Negative-Pressure Therapy for Reconstruction of Acute and Chronic Wounds. *Journal of Plastic, Reconstructive and Esthetic Surgery*, 113 (2), 525-530.
36. Jones I, Curie L, Martin R. (2002). A guide to biological skin substitutes. *British Journal of Plastic Surgery* (55), 185-193.
37. Komorowska-Timek E, Gabriel A, Bennett DC, Miles D, Garberoglio C, Cheng C, Gupta S . (2005) Artificial dermis as an alternative for coverage of complex scalp defects following excision of malignant tumors. *Plast Reconstr Surg*, 115 (4), 1010-17.

38. Kopp J, Jenschke MG, Bach AD, Kneser U, Horch RE. (2004). Applied tissue engineering in the closure of severe burns and chronic wounds using cultured human autologous keratinocytes in a natural fibrin matrix. *Cell and Tissue Banking* , 5, 89-96.
39. Krejci NC, Cuono CB, Langdon RC, McGuire J. (1991). In vitro reconstitution of skin: fibroblasts facilitate keratinocyte growth and differentiation on acellular reticular dermis. *J Invest Dermatol* , 97 (5), 843-48.
40. Kyle A. Belek, Lee W. T. Alkureishi, Ashley A. Dunn, Zlatko Devcic, Mauricio Kuri, Charles K. Lee, Scott L. Hansen. (2010). Single-Stage Reconstruction of a Devastating Antebrachial Injury With Brachial Artery, Median Nerve, and Soft Tissue Deficit: A Case Report and Review of the Literature. *ePlasty* , 10, 275-80.
41. Lamme EN, de Vries HJ, van Veen H, Gabbiani G, Westerhof W, Middelkoop E. (1996). Extracellular matrix characterization during healing of full-thickness wounds treated with a collagen/elastin dermal substitute shows improved skin regeneration in pigs. *J Histochem Cytochem* , 44 (11), 1311-22.
42. Lamme EN, van Leeuwen RT, Mekkes JR, Middelkoop E. (2002). Allogeneic fibroblasts in dermal substitutes induce inflammation and scar formation. *Wound Repair Regen* , 10 (3), 152-60.
43. Lee-Pu L. Q. (2009). An alternative approach for soft-tissue coverage of a complex wound in the foot and ankle with vacuum-assisted closure over artificial dermis and subsequent skin graft. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* , 62, e682ee684.
44. Leffler M, Horch RE, Dragu A, Bach AD. (2010). The use of the artificial dermis (Integra) in combination with vacuum assisted closure for reconstruction of an extensive burn scar - A case report. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* , 63, e32ee35.
45. Lily F. Lee, Juliet V. Porch, C. William Spenser, Warren L. Garner. (2008). Integra in Lower Extremity Reconstruction after Burn Injury. *Journal of Plastic, Reconstructive and Esthetic Surgery* , 121 (4), 1256-62.
46. Lin HR, Kuo CJ, Yang CY, Shaw SY, Wu YJ. (2002). Preparation of macroporous biodegradable PLGA scaffolds for cell attachment with the use of mixed salts as porogen additives. *J Biomed Mater Res* , 63 (3), 271—9.

47. Lineen E, Namias N. (2008). Biologic dressing in burns. *J craniofacial Surg* , 19 (4), 923–8.
48. Lozano DD. (2003). The use of a dermal regeneration template for the repair of degloving injuries: a case report. *Wounds* , 15, 395-8.
49. Luo H, Xu J, Yu X. (2007). Isolation and bioactivity of an angiogenesis inhibitor extracted from the cartilage of *Dasyatis akajei*. *Asia Pac J Clin Nutr* , 16 (Suppl. 1), 286-89.
50. Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB,. (2003). Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* , 100 (9), 5413-18.
51. Machensa HG, Bergerb AC, Mailaendera P. (2000). Bioartificial Skin. *Cells Tissues Organs* (167), 88-94.
52. Martin P. (1997). Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* , 276 (5309), 75–81.
53. Martinet L, Pannier M, Duteille F. (2007). Intérêt de l'Intégra® dans la prise en charge d'un dégantage complet de l'avant-bras. À propos d'un cas. *Chirurgie de la main* (26), 124–126.
54. Maruguchi T, Maruguchi Y, Suzuki S, Matsuda K, Toda K, Isshiki N. (1994). A new skin equivalent: keratinocytes proliferated and differentiated on collagen sponge containing fibroblasts. *Plast Reconstr Surg*, 93 (3), 537-44 e discussion 545-6.
55. McKegney M, Taggart I, Grant MH. (2001). The influence of crosslinking agents and diamines on the pore size, morphology and the biological stability of collagen sponges and their effect on cell penetration through the sponge matrix. *J Mater Sci Mater Med* , 12 (9), 833-44.
56. Mis B, Rolland E, Ronfard V. (2004). Combined use of a collagen-based dermal substitute and a fibrin-based cultured epithelium: a step toward a total skin replacement for acute wounds. *Burns* , 30, 713–719.
57. Moiemens NS, Staiano JJ, Ojeh NO, Thway Y, Frame JD. (2001). Reconstructive surgery with a dermal regeneration template: Clinical and histological study. *Plast Reconstr Surg*, 108, 93.

58. Molnar JA, DeFranzo AJ, Hadaegh A, Morykwas MJ, Shen P, Argenta LC. (2004). Acceleration of Integra incorporation in complex tissue defects with sub atmospheric pressure. *Plast Reconstr Surg*, 113, 1339-46.
59. Muangman P, Engrav LH, Heimbach DM, Harunar N, Honari S, Gibran NS, Klein MB. (2006). Complex Wound Management Utilizing an Artificial Dermal Matrix. *Annals of Plastic Surgery*, 57 (2), 199-202.
60. Nishi C, Nakajima N, Ikada Y. (1995). In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *J Biomed Mater Res*, 29 (7), 829-34.
61. Odland G, Ross R. (1968). Human wound repair. I. Epidermal regeneration. *J Cell Biol.*, 39 (1), 135-51.
62. Onesti MG. (2010). Use of Integra dermal substitute in the treatment of complex wounds caused by antiblastic extravasation injury. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 1-3.
63. Perrot P, Delliere V, Brancati A, Duteille F. (2010). Place du Hyalomatrix PA au sein des substituts cutanés. À propos de dix cas. *Ann Chir Plast Esthet*, doi: [10.1016 / j.anplas. 2010.10.006](https://doi.org/10.1016/j.anplas.2010.10.006)
64. Pianigiani E, Ierardi F, Mazzanti B, Saccardi R, Cuciti C, Fimiani M. (2010). Human De-epidermized Dermis as a Stem Cell Carrier. *Transplantation Proceedings*, 42, 2244–2246.
65. Pollard RL, Kennedy PJ, Maitz PK. (2008). The use of artificial dermis (Integra) and topical negative pressure to achieve limb salvage following soft-tissue loss caused by meningococcal septicaemia. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 61, 319-22.
66. Powell HM, Boyce ST. (2009). Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends: morphogenesis and mechanical properties. *Tissue Eng Part A*, 15 (8), 2177-87.
67. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. (2007). Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*, 21 (6), 1141-149.
68. Raeber GP, Lutolf MP, Hubbell JA. (2005). Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration. *Biophys J*, 89 (2), 1374-88.

69. Ralston DR, Layton C, Dalley AJ, Boyce SG, Freedlander E, Mac Neill S. (1999). The requirement for basement membrane antigens in the production of human epidermal/dermal composites in vitro. *Br J Dermatol* , 140 (4), 605-15.
70. Ryan CM, Schoenfeld DA, Malloy M, Schulz JT, Sheridan RL, Tompkins RG. (2002). Use of Integra® artificial skin is associated with decreased length of stay for severely injured adult burn survivors. *J Burn Care Rehabil*, 23, 311-17.
71. Sahota PS, Burn JL, Heaton M, Freedlander E, Suvarna SK, et al. (2003). Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis. *Wound Repair Regen* , 11 (4), 275-84.
72. Smiley AK, Klingenberg JM, Boyce ST, Supp DM. (2006). Keratin expression in cultured skin substitutes suggests that the hyperproliferative phenotype observed in vitro is normalized after grafting. *Burns* , 32 (2), 135-38.
73. Stern R, McPherson M, Longaker MT. (1990). Histological study of artificial skin used in the treatment of full-thickness thermal injury. *J Burn Care Rehabil*, 11, 7—13.
74. Sugamata A, Yoshizawa N. (2009). Treatment of fingertip injuries using artificial dermis. *Journal of wound technologies* (4), 7-11.
75. Suzuki S, Matsuda K, Isshiki N, Tamada Y, Ikada Y. (1990). Experimental study of a newly developed bilayer artificial skin. *Biomaterials* , 11 (5), 356–60.
76. Taras JS, Sapienza A, Roach JB, Taras JP. (2010). Acellular Dermal Regeneration Template for Soft Tissue Reconstruction of the Digits. *J Hand Surg* , 35A, 415-21.
77. Tjabringa G, Bergers M, van Rens D, de Boer R, Lamme E, Schalkwijk J. (2008). Development and validation of human psoriatic skin equivalents. *Am J Patol* , 173 (3), 815-23.
78. Tuan TL, Keller LC, Sun D, Nimni ME, Cheung D. (1994). Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels. *J Cell Sci* , 107 (Pt 8), 2285-89.
79. Uhlig C, Rapp M, Hartmann B, Hierlemann H, Planck H, Dittel KK. (2007). SuprathelW—An innovative, resorbable skin substitute for the treatment of burn victims. *Burns* , 33, 221-229.

80. Unglaub F, Ulrich D, Pallua N. (2005). Reconstructive surgery using an artificial dermis (Integra): results with 19 grafts. *Zentralbl Chir*, 130 (157), e61.
81. van der Veen VC, van der Wal MBA, van Leeuwen MCE, Ulrich MMW, Middelkoop E. (2010). Biological background of dermal substitutes. *Burns*, 36, 305-321.
82. Velazquez OC. (2007). Angiogenesis and vasculogenesis: inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing. *J Vasc Surg*, 45 (Suppl A), A39-A47.
83. Waaijman T, Breetveld M, Ulrich M, Middelkoop E, Scheper RJ, Gibbs S. (2010). Use of a collagen / elastin matrix as transport carrier system to transfer proliferating epidermal cells to human dermis in vitro. *Cell Transplantation*, 3.
84. Wang H, Pieper J, Peters F, van Blitterswijk CA, Lamme EN. (2005). Synthetic scaffold morphology controls human dermal connective tissue formation. *J Biomed Mater Res*, 74 (4), 523-32.
85. Whitaker IS, Prowse S, Potokar TS. (2008). A critical evaluation of the use of Biobrane as a biologic skin substitute: a versatile tool for the plastic and reconstructive surgeon. *Ann Plast Surg*, 60 (3), 333-7.
86. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, 160 (2), 267-77.
87. Wolter TP, Noah EM, Pallua N. (2005). The use of Integra in an upper extremity avulsion injury. *Br J Plast Surg*, 58, 416-8.
88. Wong T, McGrath JA, Navsaria H. (2007). The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British Journal of Dermatology*, 156, 1149-1155.
89. Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, Huang C, Rubenstein RH. (1980). Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res*, 14 (2), 107-32.

90. Zhou M, Smith Am, Das AK, Hodson NW, Collins RF, Ulijn RV. (2009). Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells. *Biomaterials* , 13, 2523-30.