# Advanced Skin Replacement

Lecture

ธนา เชื้อบัณฑิต
กลุ่มงานศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ใหญ่สุดในร่างกาย มีหน้าที่ในการปกป้องร่างกายต่อการบาดเจ็บ ปกป้องรังสียูวี และเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย อีกทั้งยังมีหน้าที่ในการรักษาสมดุลของน้ำ และอุณหภูมิในร่างกายอีกด้วย

ในกรณีที่มีการบาดเจ็บต่อผิวหนังเป็นบริเวณกว้าง และลึกนั้น ผลที่ตามมาคือ การเสียสมดุลต่างๆของร่างกายตามมา เช่น การสูญเสียน้ำจากการระเหยออก จากบาดแผล จนอาจจะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำในร่างกาย เป็นสาเหตุให้ช็อคได้ และจากการสูญเสียโปรตีนจากร่างกาย ทำให้สูญเสียแรงดัน oncotic จึงทำให้เกิดภาวะเนื้อเยื่อบวมตามมา ดังนั้นหน้าที่ของศัลยแพทย์ คือการทำให้ผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บ กลับมามีโครงสร้างและหน้าที่ของผิวหนังให้ใกล้เคียงปกติมากที่สุด

ในกรณีที่การบาดเจ็บของผิวหนังบริเวณกว้าง หากปล่อยทิ้งไว้ ไม่ได้รับการรักษาอย่างรวดเร็ว อาจทำให้การหายของแผลเกิดเป็นแผลเป็นนูนและดึงรั้งในที่สุด ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าในกรณีที่สามารถทำให้แผลหายได้ภายใน 3 สัปดาห์ มักจะไม่ทำให้เกิดแผลเป็นที่เห็นได้ชัด [1] นอกจากนี้การรักษาบาดแผลที่ใช้เวลานาน ยังเพิ่มโอกาสทำให้เกิดแผลติดเชื้อ และทำให้แผลแย่ลงไปอีก ซึ่งทำให้เพิ่มค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลมากขึ้นตามมา การให้การรักษาการบาดเจ็บของผิวหนังแต่เนิ่นๆนั้นช่วยให้แผลปิดเร็วขึ้น ลดการติดเชื้อซ้ำซ้อน และป้องกันการเกิดแผลเป็นดึงรั้งที่จะตามมา ทำให้ลดความจำเป็นในการผ่าตัดแก้ไขความพิการจากแผลเป็นดึงรั้งได้

มาตรฐานในการรักษาแผลเปิดขนาดใหญ่ยังคงเป็นการใช้การปลูกถ่ายผิวหนังของตนเอง แต่ในบางกรณีเช่น บาดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวกบริเวณกว้าง, แผลเปิดเรื้อรัง, แผลที่เกิดจากการรักษาโรคผิวหนังบางชนิด เช่น โรคปานดำแต่กำเนิดขนาดใหญ่ การใช้การปลูกถ่ายผิวหนังของตนเองไม่สามารถทำได้หมด เนื่องจากพื้นที่ผิวหนังที่จะนำมาใช้ไม่เพียงพอ

ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนเพื่อเป็นการทดแทนผิวหนังผู้ป่วยได้บางส่วน หรือเพื่อปิดบาดแผลเบื้องต้นรอการปลูกถ่ายผิวหนังผู้ป่วยต่อไป นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติ และข้อดีหลายประการ เช่น ลดความเจ็บปวด, ดูดซึมสารคัดหลั่งจากแผล, รักษาสมดุลความชื้นของบาดแผล ซึ่งส่งผลให้มีการกระตุ้นการสร้างเซลล์ epithelium ได้ดีขึ้น เพิ่มความหนาและความยืดหยุ่นของผิวหนังที่จะนำมาปลูกถ่าย ซึ่งส่งผลให้เกิดการหดตัวของแผลน้อยลง

ยังมีการใช้เนื้อเยื่อผิวหนังทดแทนเพื่อทดสอบคุณภาพของฐานแผลว่าดีพอที่จะปลูกถ่ายผิวหนังจริงของผู้ป่วยได้สำเร็จหรือไม่ (test Graft) ในกรณีที่คุณภาพฐานแผลยังไปที่สงสัยว่าดีพอหรือไม่อีกด้วย

**มีการสรุปหน้าที่หลักของเนื้อเยื่อทดแทนดังนี้** (4Ps) [2]

Protection

เปรียบเสมือนเกราะป้องกันการลุกล้ำของเชื้อโรค และแรงภายนอก

Procrastination

เป็นการเตรียมฐานแผลก่อนการรักษาด้วยผิวหนังจริง หรือผิวหนังจริงจากการเพาะเลี้ยง

Promotion

ส่งเสริมให้มีการสร้าง dermal matrix, cytokines, growth factors เพื่อกระตุ้นการหายของแผล

Provision

มีการสร้างโครงสร้างใหม่ของแผลที่ยังคงอยู่ใน ระหว่างและหลังการหายของแผลสมบูรณ์

ความคิดที่จะใช้เนื้อเยื่อทดแทนผิวหนังเริ่มจากการนำเอาผิวหนังจากคนอื่นมาใช้ (allograft) ซึ่งวิธีการนี้ในปัจจุบัน

ยังถือเป็น มาตรฐานในการรักษาแผลเปิดขนาดใหญ่ในกรณีที่ผิวหนังของผู้ป่วยเองไม่เพียงพอในการปลูกถ่าย [3-5] การรักษาด้วยวิธีนี้เป็นที่แพร่หลาย จนมีการจัดตั้งธนาคารผิวหนังขึ้นในหลายแห่งของโลก ธนาคารผิวหนังที่ใหญ่และมีชื่อเสียงแห่งหนึ่ง คือ ธนาคารผิวหนังแห่งสหภาพยุโรป (Euro Skin Bank)

การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อผิวหนังผู้อื่นลงบนแผล กระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่จากฐานแผล เข้ามาในเนื้อเยื่อผิวหนังผู้อื่น หากสมบูรณ์แล้วจะมีลักษณะเสมือนเป็นเนื้อเยื่อเดียวกัน (biointrigation) อย่างไรก็ตามเนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อผู้อื่น ร่างกายก็จะมีการปฏิเสธเนื้อยื่นตามมา (rejection) แต่เนื่องจากการบาดเจ็บของผิวหนังบริเวณกว้าง มักส่งผลให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันลดลง จึงทำให้การรักษาด้วยปลูกถ่ายผิวหนังผู้อื่นมีปฏิกิริยาการปฏิเสธเนื้อเยื่อช้าลง โดยทั่วไปใช้เวลา 1-3 สัปดาห์ ดังนั้นจึงมีความพยายามในการทดลองใช้ยากดภูมิคุ้มกัน เพื่อยืดเวลาในการปฏิเสธเนื้อเยื่อของร่างกายออกไป แต่เนื่องจากผลข้างเคียงทำให้มีความเสี่ยงในการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นยังเป็นที่ถกเถียงในเรื่องของเหมาะสม [6,7]

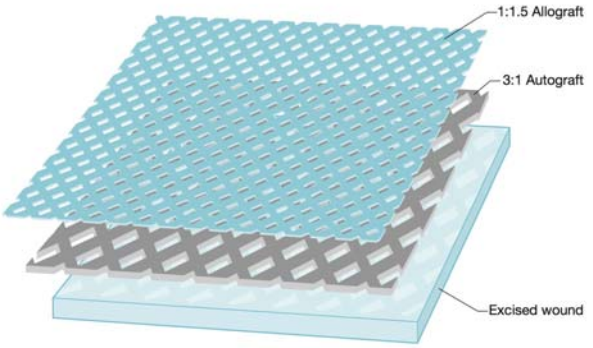
โดยทั่วไประยะเวลาในการใช้เนื้อเยื่อผิวหนังผู้อื่นภายหลังการรับบริจาคและการเตรียม(harvest)ใช้เวลาไม่เกิน 7 วัน ด้วยการเก็บในตู้เย็น เรียกว่า fresh cadaveric allograft มีข้อดี คือ มีความคงสภาพของเซลล์สูง มีความสามารถในการสร้างเส้นเลือดใหม่ดี มีความแข็งแรงของเนื่อเยื่อสูง อีกทั้งยังมีอัตราการติดเชื้อต่ำกว่าการเก็บด้วยวิธีอื่น แต่มีปัญหาในเรื่องการจัดหาให้ได้ใช้ ดังนั้นจึงมีการเก็บรักษาเนื้อเยื่อผิวหนังผู้อื่นด้วยวิธีอื่นๆ เพื่อที่จะเก็บไว้ใช้งานได้นานขึ้น เช่นวิธี lyophilized, glycerolized, cryopreserved ซึ่งมีข้อดีข้อเสียต่างกัน (ตารางที่ 1)

เนื้อเยื่อผิวหนังผู้อื่นยังสามารถนำมาใช้ร่วมกับการปลูกถ่ายผิวหนัง ผู้ป่วยแบบถ่างขยาย (meshed autograft) เพื่อที่จะช่วยลดภาวะการอักเสบและ metabolic stress ได้ [8] ข้อเสียของการรักษาด้วยเนื้อเยื่อผิวหนังผู้อื่นคือ ความเสี่ยงต่อการรับเชื้อโรคของผู้ให้สู่ผู้รับเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ดีเทคนิคในการตรวจคัดกรองในปัจจุบันมีความก้าวหน้าไปมาก ทำให้โอกาสในการเกิดโรคติดต่อน้อยลงมาก

ภายหลังได้มีการพัฒนาการใช้เนื้อเยื่อผิวหนังทดแทนอีกมากมาย โดยมีการแบ่งชนิดได้หลายแบบตามคุณสมบัติและส่วนประกอบของเนื้อเยื่อผิวหนังทดแทนชนิดนั้นๆ [10-12] ดังตารางที่ 2 [13]

**ตารางที่** 1 แสดงชนิดการเก็บรักษาเนื้อเยื่อผิวหนังผู้อื่น (Allograft)

| Type of Allograft | |
|---|---|
| Fresh | Highly viable<br>Rapidity and strength of adherence<br>Better Infection control<br>High rate of angiogenesis<br>But difficult to obtain |
| Lyophilized | Destroys all the cells.<br>Role is reduced to that of a sheet of collagen. |
| Glycerolized | Reduced viability<br>without destroying all of the cellular components.<br>Reduces an inflammatory response<br>Does not hamper the desired biological effect. |
| Cryopreserved | Maximizes the survival of cellular components<br>Increases the inflammatory response<br>,subsequent possibility of immunological rejection. |




**รูปที่** 1 แผนภาพแสดง meshed allograft overlay technique

**รูปที่** 2 Allograft สามารถใช้ร่วมกับ meshed autograft ในผู้ป่วย large burns [9]

**ตารางที่ 2 Category of Skin Substitutes [13]**

**Anatomical structure**
(a) composite (dermo–epidermal)
(b) epidermal
(c) dermal substitute.

**Duration of the cover required as either**
(a) permanent
(b) semi-permanent
(c) temporary

**Type of the biomaterial required being**
(a) biological
  (a) autologous
  (b) allogeneic
  (c) xenogeneic
(b) synthetic
  (a) biodegradable
  (b) non-biodegradable.

**The site of biomaterial reconstitution occurring**
(a) in vitro in the laboratory
(b) in vivo on the patient.

**Biomaterial composition can be either**
(a) acellular
(b) cellular

ซึ่งในบทความนี้ผู้เขียนจะแบ่งชนิดของเนื้อเยื่อผิวหนังทดแทนตามองค์ประกอบตามกายภาพดังนี้

Epidermal Skin Substitutes

Dermal Skin Substitutes

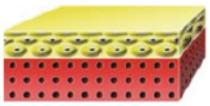
Dermo-epidermal Skin Substitutes

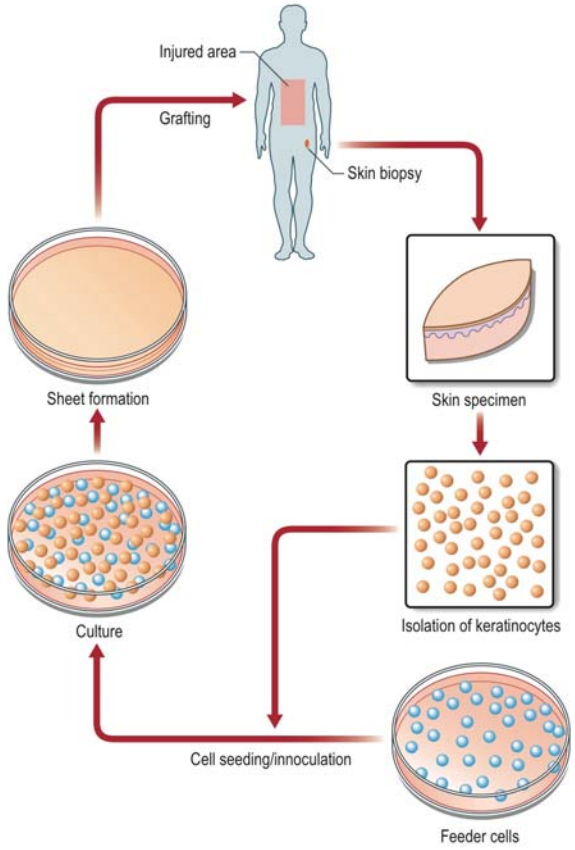
**Epidermal Skin Substitutes**

โครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อผิวหนังทดแทนชนิดนี้คือการใช้การเพาะเลี้ยง epithelial Cell มีการนำเสนอครั้งแรกโดย Rheinwald and Green [14] ในปีค.ศ. 1975 และต่อมาได้มีการพัฒนาดัดแปลงโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆอีกหลายชนิด ดังตารางที่ 3 [13]

ขั้นตอนในการเตรียม CEAs เริ่มจากการตัดผิวหนังของผู้ป่วยบางส่วน แยก Keratinocytes มาเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนในถาดเพาะเลี้ยง จนกระทั่งมีลักษณะเป็นแผ่นจึงนำไปใช้ในการปลูกถ่ายจริง ดังรูปที่ 3-4

**ตารางที่ 3** Currently commercially available epidermal constructs

| Brand name / manufacturer | Schematic representation | Incorporated human cells | Cell / Scaffold source | Scaffold material |
|---|---|---|---|---|
| **Bioseed®-S**<br>BioTissue Technologies GmbH, Freiburg, Germany | | Cultured keratinocytes | auto / allo | fibrin sealant |
| **CellSpray®**<br>Clinical Cell Culture (C3), Perth, Australia | | Non-/cultured sprayed keratinocytes | auto / — | — |
| **Epicell®**<br>Genzyme Biosurgery, Cambridge, MA, USA | | Cultured keratinocytes | auto / — | — |
| **EpiDex™**<br>Modex Therapeutiques, Lausanne, Switzerland | | Cultured keratinocytes from outer root sheath of scalp hair follicles | auto / — | — |
| **Laserskin™ or Vivoderm™**<br>Fidia Advanced Biopolymers, Padua, Italy |  | Cultured keratinocytes | auto / — | HAM |
| **MySkin™**<br>CellTran Ltd, Sheffield, UK | | Cultured sub-confluent keratinocytes | auto / — | silicone support layer with a specially formulated surface coating |



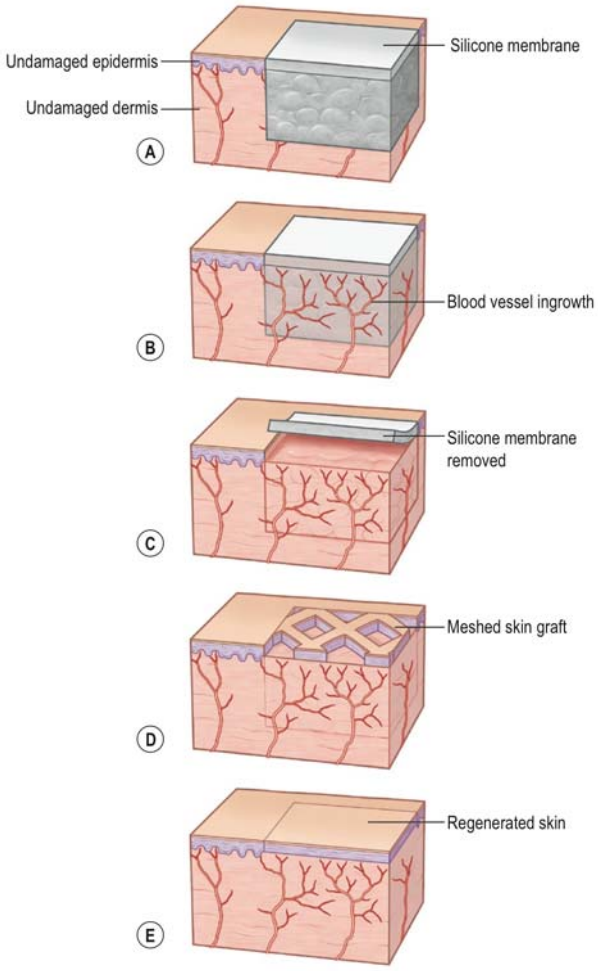

**รูปที่ 3** Keratinocyte culture (from Autologous Cultured Epidermis, www.jpte.co.jp.)Dermal Skin Substitutes

ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงข้างต้น อาจใช้เวลาถึง 5 สัปดาห์ ดังนั้นในระหว่างที่รอการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องทำการปิด แผลด้วยวัสดุปิดแผลชนิดอื่นไปก่อน อย่างไรก็ตาม เนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะมักจะมีความบาง ไม่แข็งแรง ฉีกขาดง่าย อัตราการปลูกถ่ายสำเร็จอยู่ที่ร้อยละ 0-50[16,17] และใช้จ่ายใน การเพาะเลี้ยงสูง ยังเป็นที่ถกเถียงเรื่องความคุ้มค่าของการรักษา

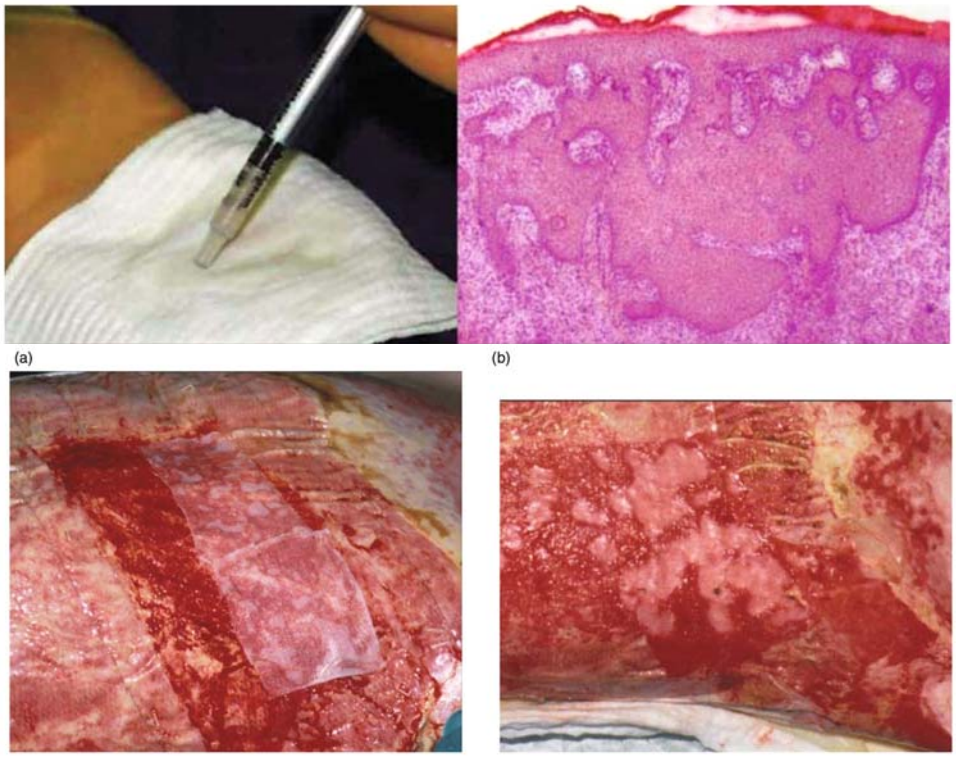
ภายหลังการใช้เนื้อเยื่อผิวหนังผู้อื่นได้มีการพัฒนาสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังทดแทนจากการสังเคราะห์ เป็นครั้งแรกโดย Yannas and Burke[18] ในปี ค.ศ. 1980 ได้นำ bovine type 1 collagen cross-linked with shark chondroitin-6-sulfate (aGAG) มาใช้เป็นส่วนประกอบหลัก และเคลือบด้านบนด้วยซิลิโคน เพื่อทำหน้าที่ปกป้องโครงสร้างสังเคราะห์ส่วนล่าง[19] ต่อมาได้มีการพัฒนาต่อยอดโดยการใช้ส่วนประกอบที่มีคุณสมบัติต่างๆกัน ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์มากมายในปัจจุบัน สรุปดังตารางที่ 4[13]

เนื้อเยื่อผิวหนังทดแทนในกลุ่มนี้ ถือว่าเป็นที่นิยมและใช่กันแพร่หลายมากที่สุด ขั้นตอนในการใช้เนื้อเยื่อผิวหนังทดแทนชนิดนี้เริ่มด้วย การนำเนื้อเยื่อผิวหนังสังเคราะห์ไปปลูกถ่ายยังพื้นแผลและรอประมาณ 3-4 สัปดาห์ จนกระทั่งเส้นเลือดจากฐานแผลเจริญเข้ามาในเนื้อเยื่อผิวหนังสังเคราะห์ ณ จุดนี้ถือว่าผิวหนังที่เกิดใหม่นี้เรียกว่า “neodermis” จากนั้นจึงลอกชั้นซิลิโคนออกและปลูกถ่ายผิวหนังผู้ป่วยแบบบางลงไปแทน ซึ่งทำให้แผลที่หายด้วยวิธีการนี้ช่วยลดปัญหา ของแผลเป็นดึงรั้งและช่วยในการเพิ่มความงามของแผลอีกด้วย[20-22] (รูปที่ 4)

จะเห็นได้ว่าขั้นตอนดังกล่าวต้องทำหัตถการถึง 2 ครั้ง ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการรักษามากขึ้น จึงมีความคิดที่จะลดขั้นตอนให้เหลือเพียงขั้นตอนเดียว โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผู้ป่วย (CEA) ลงบนเนื่อเยื่อสังเคราะห์ (รูปที่ 5) [13] จากการทดลองในสัตว์ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ แต่การนำมาศึกษา




**รูปที่ 4** Skin regeneration with dermal substitutes. (Revised from www.integra-ls.com.)




**รูปที่ 5** Positive clinical outcome in a patient treated with CEA on Integra.
(a) cell sheet applied to mature Integra, (b) epithelialization by cultured cells on Integra [13]

ในมนุษย์พบว่าได้ผลดีในช่วงแรก หลังจากนั้นเกิดแผลขึ้นใหม่ และต้องรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังตนเองอยู่ดี ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อแก้ปัญหาที่เหล่านี้เพิ่มเติม

**Dermo-epidermal Skin Substitutes**

มีความพยายามที่จะสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบเสมือนจริงโดยทดแทนทั้งชั้น dermis และ epidermis รวมอยู่ด้วยกัน ได้มีการนำเสนอครั้งแรกโดย Bell และคณะ[23] ในปี ค.ศ.1981 โครงสร้างหลักประกอบด้วย bi-layered living skin-equivalent composed of type I bovine collagen and allogenic keratinocytes and fibroblasts obtained from neonatal foreskin. จากการศึกษาพบว่า neonatal skin cells ช่วยเร่งการหายของแผล fibroblasts ที่ cultured ใน collagen matrix ช่วยในการกระตุ้นการสร้าง extracellular matrix ส่วน keratinocytes ช่วยในการสร้าง epidermal layer [24] และยังมีรายงานทางการศึกษาสนับสนุนว่า ช่วยรักษาผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก และผู้ป่วยแผลเรื้อรังให้มีผลการรักษาที่ดีขึ้น [25-27] ต่อมาได้มีการนำมาพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 4) [13]

**การพัฒนาในอนาคต**

การสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังสังเคราะห์เพื่อมุ่งหวังให้มีการทดแทนผิวหนังจริงให้ได้มากที่สุด แต่ในปัจจุบัน การแยกและการเพาะเลี้ยงยังคงได้ส่วนประกอบหลักคือ keratinocyte ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะแยกส่วนประกอบต่างๆของcell ผิวหนัง เช่น melanocyte ,fibroblast ,endothelial cell และ adipocyte มาเพาะเลี้ยงด้วย เพื่อให้ได้ประโยชน์จากคุณสมบัติของเซลล์ต่างๆ (รูปที่ 6)

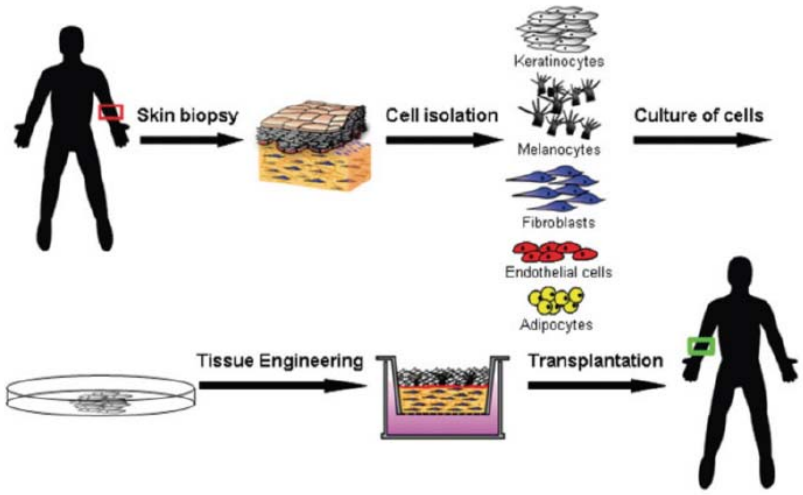
มีการทดลองเติมMelanocyteเพื่อให้เนื้อเยื่อผิวหนังสังเคราะมีสี (pigmentation) หวังในการช่วยป้องกันรังสี UV ,ช่วยในเรื่องของ Skin color match และช่วยเพิ่มความมั่นใจให้ผู้ป่วยได้ (รูปที่ 7) แต่การศึกษานี้มีเพียงในห้องทดลอง ยังไม่มีการนำมาใช้ทางคลินิกแต่อย่างใด [28]

ปัจจัยหลักในการที่จะบอกความสำเร็จของการปลูกถ่ายผิวหนังทดแทนคือ คุณภาพและความเร็วในการเจริญของเส้นเลือดใหม่ (vascularization) ซึ่งพบว่า ความหนาของผิวหนังทดแทนที่มากกว่า 1มม. ไม่สามารถสร้างเส้นเลือดใหม่ได้เร็วพอที่จะเลี้ยงชั้น epidermal layerได้ [29] ดังนั้น จึงมี

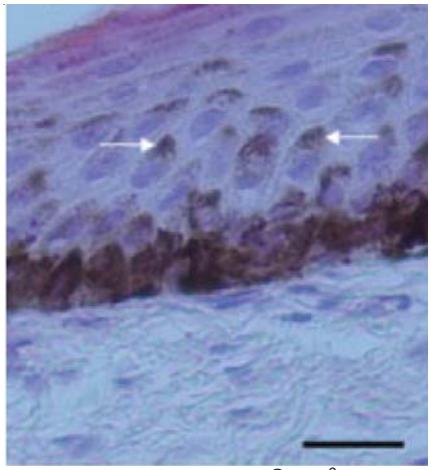
**ตารางที่** 4 Currently commercially available dermo-epidermal constructs

| Brand name / manufacturer | Schematic representation | Incorporated human cells | Cell / scaffold source | Scaffold material |
|---|---|---|---|---|
| **Allograft (cadaveric)** From not for profit skin banks | | — | allo /allo | native human skin with dermal and epidermal cells |
| **Apligraf®** Organogenesis Inc., Canton, Massachusetts, CA, USA | | Cultured keratinocytes and fibroblasts | allo / xeno | bovine collagen (Type I) |
| **PolyActive™** HC Implants B.V., Leiden, Netherlands | | Cultured keratinocytes and fibroblasts | auto / — | PEO/PBT |
| **OrCel®** Ortec International, Inc., New York, NY, USA | | Cultured keratinocytes and fibroblasts | allo/xeno | bovine collagen sponge (Type I collagen) |

PEO – polyethylene oxide; PBT – polybutyliterephthalate.

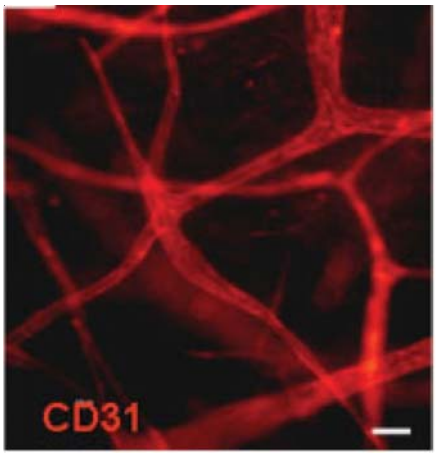



**รูปที่** 6 Tissue Engineer of skin substitutes



**รูปที่** 7 Human melanocytes ถูกเติมลงใน epidermal compart ment of engineered skin substitutes. Supranuclear melanin caps (ลูกศรขาว)

การคิดวิธีการที่เรียกว่า prevascularization โดยการนำ adult human dermal microvascular endothelial cells มารวมใน fibrin หรือ collagen hydrogels และพิสูจน์ได้ว่ามีการเกิดการเชื่อมของเส้นเลือด (inosculation) จากฐานแผลกับเส้นเลือดที่สร้างขึ้นในผิวหนังสังเคราะห์ได้จริง [30-35] (รูปที่ 8)




**รูปที่ 8** Human microvascular endothelial cells ซึ่งแยกจาก skin biopsy,เพาะเลี้ยง, และนำไปเพิ่มใน dermal compartment ของ engineered skin substitutes. เห็นได้ว่ามีการเจริญเป็น capillary plexus ประกอบด้วย branching and lumenized microvessels.

นอกจากนี้ได้มีการปรุงแต่งทางพันธุกรรมของ keratinocyte เพื่อให้มีการสร้างสารต่างๆเช่น PDGF, human growth hormone, IGF-1, และgrowth factors อื่น ๆ ออกมากขึ้นโดยหวังให้ช่วยในการหายของแผลเร็ว และสมบูรณ์ขึ้น [36]

โดยสรุปในปัจจุบันยังไม่มีเนื้อเยื่อผิวหนังทดแทนใดที่มีคุณสมบัติที่สมบูรณ์ใกล้เคียงผิวหนังของเราเอง ซึ่งต้องรอการศึกษาและพัฒนาต่อไป

## Reference


1. Cubison TC, Pape SA, Parkhouse N.Evidence for the link between healing time and the development of hypertrophic scars (HTS) in paediatric burns due to scald injury. Burns 2006;32:992–9.
2. Shakespeare PG. The role of skin substitutes in the treatment of burn injuries. Clini Dermatol 2005;23:413–418
3. Bondoc CC, Burke JF. Clinical experience with viable frozen human skin and a frozen skin bank. Ann Surg 1971;174:371-82.
4. Herndon DN. Perspectives in the use of allograft. J Burn Care Rehabil. 1997;18:S6.
5. Kagan RJ, Robb EC, Plessinger RT. Human skin banking. Clin Lab Med 2005;25:587-605.
6. Burke JF, May JW Jr, Albright N, et al. Temporary skin transplantation and immunosuppression for extensive burns. N Engl J Med 1974;290:269-71.
7. Sheridan R, Mahe J, Walters P. Autologous skin banking. Burns 1998;24:46-8.
8. Alexander JW, MacMillan BG, Law E, et al. Treatment of severe burns with widely meshed skin autograft and widely meshed skin allograft overlay. J Trauma 1981; 21:433–438
9. Robert L. Sheridan, Ronald G. Tompkins. Alternative wound coverings. Total burn care. 2012;210
10. Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD.Tissue engineering of cultured skin substitutes. J Cell Mol Med 2005;9:592–608.
11. MacNeil S.Progress and opportunities for tissue-engineered skin. Nature 2007;445:874–80.
12. Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. J Invest Dermatol 2007;127:1018–29
13. James SE, Booth S, Gilbert P, Jones I, Shevchenko R. Strategies in Regenerative Medicine. Santin M, editor. New York, NY: Springer New York; 2008; 1–33.
14. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 1975; 6:331–343.
15. Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature. Burns 2006;32:395–401.
16. Meuli M, Raghunath M. Burns (Part 2). Tops and flops using cultured epithelial autografts in children. Pediatr Surg Int 1997;12:471–7.
17. Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. J Cell Mol Med 2005;9:592–608
18. Yannas IV, Burke JF .Design of an artificial skin. I. Basic design principles. J Biomed Mater Res 1980;14:65–81
19. Martin P, Mehendale F. The cellular and molecular events of wound healing. In: Falanga V, (ed) Cutaneous Wound

Healing London, UK: Martin Dunitz pp 12001;5–38.

20. Sheridan RL, Hegarty M, Tompkins RG, Burke JF. Artificial skin in massive burns Results to 10 years. Eur J Plast Surg 1994; 17:91–3.

21. Anthony ET et al. The development of novel dermal matrices for cutaneous wound repair. Drug Discovery Today: Ther Strateg 2006;3:81–6.

22. Kim PJ, Dybowski KS, Steinberg JS. Feature: a closer look at bioengineered alternative tissues. Podiatry Today 2006;19:38–55.

23. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. Science 1981;211:1052–4.

24. Orgill DP, Butler CE, Barlow M, et al. Method of skin regeneration using a collagenglycosaminoglycan matrix and cultured epithelial autograft. U.S. Patent, 1998; 5:716,411.

25. Edmonds M; European and Australian Apligraf Diabetic Foot Ulcer Study Group. Apligraf in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers. Int J Low Extrem Wounds 2009;8:11–8.

26. Barber C, Watt A, Pham C, et al. Influence of bioengineered skin substitutes on diabetic foot ulcer and venous leg ulcer outcomes. J Wound Care 2008;17:517–27.

27. Waymack P, Duff RG, Sabolinski M; The Apligraf Burn Study Group The effect of a tissue engineered bilayered living skin analog, over meshed split-thickness autografts on the healing of excised burn wounds. Burns 2000;26:609–19.

28. Bottcher-Haberzeth S, Klar AS, Biedermann T, et al. "Trooping the color": restoring the original donor skin color by addition of melanocytes to bioengineered skin analogs. Pediatr Surg Int 2013;29:239–47.

29. Sahota PS, Burn JL, Heaton M, et al. Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis. Wound Repair Regen 2003;11:275–84.

30. Sahota PS, Burn JL, Heaton M, et al. Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis. Wound Repair Regen 2003;11 :275–84.

31. Black AF, Berthod F, L'heureux N, Germain L, Auger FA. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue- engineered skin equivalent. FASEB J 1998;12:1331–40.

32. Schechner JS, Nath AK, Zheng L, et al. In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunode-ficient mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:9191–6.

33. Supp DM, Wilson-Landy K, Boyce ST. Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. FASEB J 2002;16:797–804.

34. Chen X, Aledia AS, Ghajar CM, et al. Prevascularization of a fibrin- based tissue construct accelerates the formation of functional anastomosis with host vasculature. Tissue Eng Part A 2009; 15:1363–71.

35. Montano I, Schiestl C, Schneider J, et al. Formation of human capillaries in vitro: the engineering of prevascularized matrices. Tissue Eng Part A 2010;16:269–82.

36. Pham C, Greenwood J, Cleland H, et al. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. Burns 2007;33:946-57.