



Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta
Klinika popáleninové medicíny

Robert Zajíček

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Vliv acelulární prasečí dermis
na hojení termického poranění kůže**

Influence of acellular pig dermis on the healing
of thermal skin injuries

vedoucí práce – prof. MUDr. Radana Königová, CSc.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vykonal samostatně s využitím uvedených pramenů a literatury.

.....

Doktorand:

MUDr. Robert Zajíček

Klinika popáleninové medicíny FNKV

Šrobárova 50, Praha 10

Školitel:

Prof. MUDr. Radana Königová, CSc.

Klinika popáleninové medicíny FNKV

Šrobárova 50, Praha 10

Školitel specialista:

RNDr. Eva Matoušková, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta

Ruská 87, Praha 10

OBSAH

Seznam zkratek	5
1 ÚVOD	7
2 CÍL PRÁCE, HYPOTÉZA	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1 Funkční a anatomické vlastnosti kůže ve vztahu k vývoji kožních náhrad	10
3.2 Princip hojení	11
3.3 Kožní náhrady	12
3.3.1 Současný vývoj kožních náhrad	12
3.3.2 Klasifikace kožních náhrad	13
3.3.3 Epidermální náhrady	13
3.3.4 Dermální náhrady	17
3.3.4.1 Biologické náhrady dermis	17
3.3.4.2 Kompozitní náhrady dermis	19
3.3.4.3 Syntetické náhrady dermis	21
3.3.5 Dermoepidermální náhrady s kultivovanými buňkami	22
4 MATERIÁL A METODY	23
4.1 Izolace keratinocytů z kůže	23
4.2 Kultivace keratinocytů pomocí feeder layer techniky	23
4.3 Kultivace a diferenciací keratinocytů na XD	23
4.4 Kultivace a diferenciací keratinocytů na Biopadu	24
4.5 Kultivace keratinocytů v bezsérovém médiu KGM	24
4.6 Histologická a imunocytochemická vyšetření XD a kůže	24
4.7 Krytí popáleninových ran pomocí XD	24
4.8 Krytí odběrových ploch XD v kombinaci s čerstvě izolovanými keratinocyty	26
4.9 Krytí rány Flammazinem	26
4.10 Krytí ran Askinou Derm	26
5 VÝSLEDKY	27
5.1 Růst a diferenciací keratinocytů in vitro a in vivo ve vztahu k hojení ran	27
5.1.1 Kultivace keratinocytů	27
5.1.1.1 Kultivace keratinocytů feeder layer technikou	27
5.1.1.2 Kultivace keratinocytů v bezsérových médiích	27
5.1.2 Růst a diferenciací lidských keratinocytů na Xe-Dermě ve vztahu k hojení ran	28
5.1.2.1 Biomechanické vlastnosti a struktura XD	29
5.1.2.2 Histologické výsledky	29
5.1.2.3 Růst keratinocytů in vivo a in vitro	30
5.1.2.4 Expresí a distribuce diferenciací markerů keratinocytů in vitro a in vivo	31
5.1.2.5 Růst keratinocytů in vitro na Biopadu®	33

5.2	Vliv epitelializačního potenciálu XD na různé typy popáleninových ran	35
5.2.1	Aplikace XD na povrchní opaření II. stupně	35
5.2.2	Aplikace XD na hluboké dermální popálení	37
5.2.3	Aplikace XD na odběrovou plochu	39
5.3	Srovnání efektivity hojení povrchních opaření u dětí po aplikaci XD a hydrokoloidu	41
5.3.1	Kritéria zařazení do studie	41
5.3.2	Charakteristika souboru pacientů	41
5.3.3	Charakteristika materiálů	41
5.3.4	Léčebný protokol	42
5.3.5	Data	43
5.3.6	Statistické zhodnocení	44
5.3.7	Výsledky srovnání	44
5.4	Hojení široce meshovaného autotransplantátu a odběrové plochy pomocí kombinace XD a autologních kožních buněk	47
5.5	Opakované hojení odběrové plochy u rozsáhle popáleného pacienta	55
6	DISKUZE	59
7	ZÁVĚR	67
8	SOUHRN, SUMMARY	69
9	POUŽITÁ LITERATURA	70
10	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE	77

Seznam zkratek

BM – bazální membrána

BSA – celkový povrch těla (body surface area)

DE – dermoepidermální

EDTA - ethylendiaminotetraoctová kyselina

EM – extracelulární matrix

EGF – epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)

GAG – glykosaminoglykan

HE – hematoxylin–eosin

H-MEM – minimal essential medium in Hanks salts

HMW CK – high molecular weight cytokeratins

HPA axis – osa hypothalamus-hypofýza-nadledvina

IL1-beta – interleukin 1

IL-6 – interleukin 6

KGM – keratinocyte growth medium (bezsérové médium Lonza)

KGF – růstový faktor keratinocytů (keratinocyte growth factor)

KPM FNKV – Klinika popáleninové medicíny Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

NaHCO₃ – bikarbonát sodný

PBS – fosfátový pufr (phosphate buffered saline)

RK – rekombinovaná kůže

SAB – stratum basale

SC – stratum corneum

SS – stratum spinosum

SSD – silversulfadiazine

St. – stupeň

TGF – transformující růstový faktor (transforming growth factor)

TK – tkáňová kultura

XD – Xe-Derma

3D – třírozměrný

3T3 – název linie buněk myších fibroblastů

Rád bych touto cestou poděkoval své školitelce prof. MUDr. Radaně Königové, CSc., za odborné vedení, cenné rady, předané zkušenosti, obětavou pomoc a osobní přístup.

Dále pak děkuji RNDr. Evě Matouškové, CSc., za pomoc s experimentální částí práce.

Můj dík také patří všem kolegům z Kliniky popálenin FNKV, kteří se podíleli na uzdravení našich pacientů.

1 ÚVOD

Hojení popálenin významně závisí na kvalitě kožních krytů. Čerstvý dermoepidermální kožní autoštěp je stále jedinou alternativou při ztrátě kůže v celé síle. Při absenci ploch vhodných pro odběr štěpu a pro krytí popálenin II. stupně se používají kryty či náhrady kůže, které mohou být biologického nebo syntetického původu.

Historie pražské Kliniky popáleninové medicíny je úzce spjata s vývojem a širokým využitím dočasných biologických krytů – xenotransplantátů [Dvořánková et al., 2004]. V 60.-70. letech byly v Praze používány alotransplantáty z kadaverů nebo živých dárců. Díky pokrokům v medicíně však množství dostupných aloštěpů nestačilo uspokojovat zvyšující se spotřebu, proto byla vyvinuta sofistikovaná metoda odběrů prasečích dermoepidermálních xenoštěpů. Skladovány byly po dobu 10 dnů při 4°C po příslušné, přesně definované preparaci sulfonamidy a antibiotiky [Moserová et al., 1974]. Xenotransplantáty bylo ošetřeno cca 550-700 pacientů ročně [Königová a Bláha, 2010]. Byly používány pro krytí povrchních i hlubokých dermálních popálenin, pro krytí nekrektomovaných ploch před autotransplantací a také jako dočasný kryt u velkých rekonstrukčních výkonů. Kromě popálenin a jiných akutních ztrátových poranění byly xenografty užívány i pro krytí chronických trofických defektů, včetně diabetické nohy. Po 32 letech bezproblémového používání však byly v roce 2005 odběry xenotransplantátů ukončeny vzhledem k velmi náročným kritériím na zdravotní prostředky zvířecího původu ze strany legislativy EU.

Jako náhrada nativních xenotransplantátů byla na našem pracovišti ve spolupráci s Akademií věd ČR vyvinuta bezbuněčná prasečí dermis. Její komerční podoba Xe-Derma[®] (MEDICEM Technology, s.r.o., ČR) je sterilní, imunologicky inertní biologický kryt, který lze dlouhodobě skladovat za běžných podmínek. Bezbuněčná prasečí dermis byla původně vyvinuta jako podklad pro kultivaci lidských keratinocytů („recombined human/pig skin“) [Matoušková et al., 1993; Matoušková et al., 1998]. Na rány byla aplikována v orientaci „upside-down“, tj. keratinocyty směřujícími do rány [Matoušková et al., 1997; 2001; 2002; 2006; Pokorná et al., 2001]. Ukázalo se však, že i samotná xenodermis bez lidských keratinocytů má výrazné hojivé účinky.

Pro získávání a aplikaci autologních keratinocytů na ránu byla zavedena kromě kultivace i nejmodernější technika – aplikace čerstvých kožních buněk v suspenzi. Autologní kožní buňky (především keratinocyty a melanocyty) jsou získány enzymatickou disociací malého tenkého štěpu kůže odebraného přímo v průběhu

operace a aplikovány vzápětí, bez dlouhé a náročné kultivační fáze. Systém nevyžaduje specifické vybavení kultivační laboratoře. Existují také komerční kity pro rychlou izolaci buněk - např. ReCell® nebo CellSpray® systém.

V předkládané dizertační práci byly otestovány některé kultivační techniky pro pěstování lidských primárních keratinocytů. Biologická aktivita Xe-Dermy (XD) byla charakterizována pomocí kultivace a diferenciaci keratinocytů na této bezbuněčné matrix. Byla provedena histologická a imunocytochemická analýza keratinocytů *in vitro* a *in vivo* [Zajíček et al., 2012]. V klinické praxi byla XD použita pro léčbu opařenin u dětí [Zajíček et al., 2011]. V rámci grantového projektu IGA č. NS10507-3 jehož jsem byl hlavním spoluřešitelem za KPM FNKV, byla řešena problematika hojení široce síťovaných autotransplantátů u rozsáhle popálených pacientů pomocí kombinace XD a čerstvě izolovaných autologních epidermálních buněk. Metoda kombinace Xe-Dermy a autologních keratinocytů byla aktuálně využita pro léčbu osmiletého chlapce s popáleninami na 90% těla. Rychlé a kvalitní hojení odběrových ploch umožnilo vícečetné opakované odběry z jednoho místa a vedlo ke zdárnému vyléčení dětského pacienta.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo posouzení vlivu bezbuněčné prasečí dermis Xe-Dermy na hojení termického poranění kůže. Xe-Derma je typ dehydrované sterilní bezbuněčné prasečí dermis vyvinuté na našem pracovišti. Následujícím cílem bylo studium možností využití Xe-Dermy v kombinaci s čerstvě izolovanými kožními buňkami pacienta a akceleraci epitelizace limitovaných odběrových míst u rozsáhlých kožních ztrát.

Součástí práce byla odpověď na následující otázky:

- Jakou roli hraje biologická struktura prasečí dermis v proliferaci a diferenciaci lidských keratinocytů *in vitro* a *in vivo* ve vztahu k popáleninové ráně?
- Které typy akutních ranných ploch jsou vhodné pro aplikaci bezbuněčné prasečí dermis v klinické praxi v porovnání se stávajícími metodami krytí?
- Existuje signifikantní rozdíl v hojení povrchních opařenin v dětské populaci, srovnáme-li komerčně dostupnou bezbuněčnou prasečí dermis Xe-Dermu se standardním dosud používaným dočasným syntetickým hydrokoloidním krytem?
- Je možné využít epitelializační potenciál Xe-Dermy v kombinaci s široce rozšířovanými dermoepidermálními autotransplantáty a čerstvě izolovanými autologními epidermálními buňkami k uzávěru rány u kriticky popálených pacientů?

Hypotéza

Xe-Derma stimuluje hojení ran tím, že podporuje proliferaci a diferenciaci epidermálních buněk ze zbytků adnex či můstků široce rozšířovaného autotransplantátu. Použitím autologních buněk izolovaných v průběhu operace z tenkého dermoepidermálního štěpu je stimulace hojení významnější.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Funkční a anatomické vlastnosti kůže ve vztahu k vývoji kožních náhrad

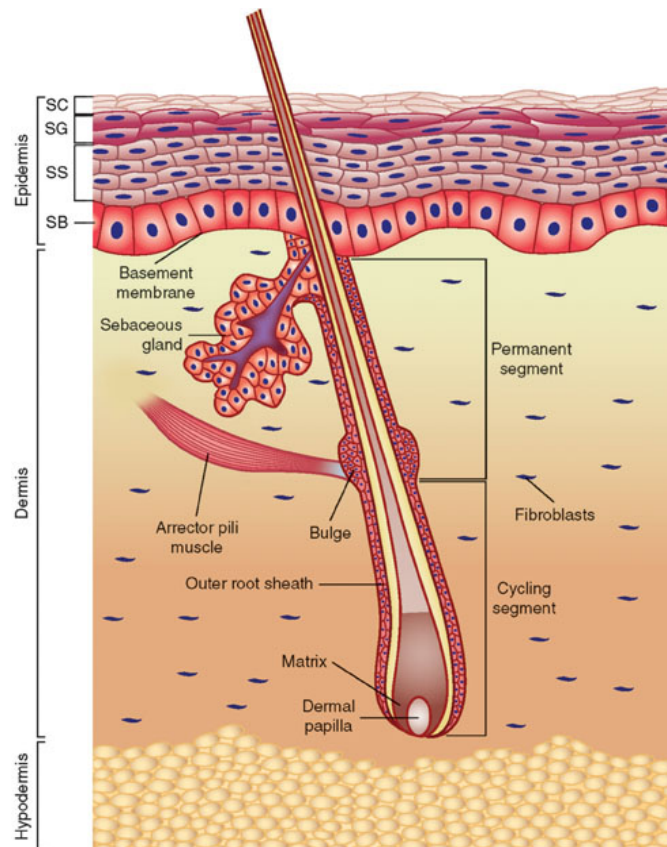
Kůže je funkčně i strukturálně složitý orgán s celou řadou důležitých funkcí nutných k udržení homeostázy organismu (Obr. 1). Ztráta kožního krytu vede ke smrti jedince. Kůže vytváří fyzikální bariéru zevnímu prostředí, ovlivňuje termoregulaci, hydrataci, je imunologicky aktivní a zapojuje se do celé řady metabolických procesů. V neposlední řadě hraje kůže důležitou roli i v sociální interaktivitě („body image“).

Kůže je strukturálně tvořena třemi základními složkami: epidermis, dermis a hypodermis.

Epidermis je stratifikována do čtyř vrstev (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum a stratum corneum). Od neuroektodermu odvozené keratinocyty tvoří více než 90% populace epidermálních buněk a jsou odpovědné za strukturální vlastnosti epidermis. Dalšími buněčnými součástmi epidermis jsou pigmentové buňky melanocyty, antigen prezentující Langerhansovy buňky a na tlak citlivé Merkelovy buňky. Hlavní funkcí epidermis je vytvoření kožní bariéry od zevního prostředí.

Mechanické vlastnosti kůže jsou podmíněny strukturou dermis. Hlavními buňkami dermis jsou od mesodermu odvozené fibroblasty. Fibroblasty prokazují v rámci organismu značnou heterogenitu [Rinn et al., 2006] a jsou zdrojem pro druhou důležitou komponentu dermis - extracelulární matrix (EM). EM je tvořena fibrilárními proteiny (kolagenními a elastickými vlákny) a glykosamino-glykany (GAG) jako je např. fibronectin. Dermis je od epidermis oddělená bazální membránou (BM). BM je složena z integrinů, lamininů, kolagenů a dalších proteinů, které hrají důležitou roli v regulaci dermoepidermální (DE) interakce. Povrchnější část dermis - papilární dermis - obsahuje mikrovaskulární a neuronální síť a svým nepravidelným průběhem zvětšuje dermoepidermální kontakt. Mazové, ekrinní i apokrinní žlázy, stejně jako vlasový folikul, prostupují z epidermis do dermis.

Hypodermis je tvořena tukovou tkání, separuje dermis od svalové fascie. Ukazuje se, že adipózní tkáň je zdrojem multipotentních mezenchymálních kmenových buněk, které se podílí na kožní regeneraci.



Obr. 1. Anatomie kůže. Kůže je tvořena třemi vrstvami: epidermis, dermis a hypodermis. Epidermis tvoří stratifikovaný squamózní epitel rozdělený do čtyř vrstev: stratum corneum (SC), stratum granulosum (SG), stratum spinosum (SS) a stratum basale (SB). Povrchní obal vlasového váčku obsahuje bazální epidermální buňky. Kmenové epidermální buňky se nacházejí v bazální vrstvě epidermis, obalu mazové žlázy, bulge vlasového folikulu, dermální papile vlasového váčku a dermis [převzato z David J. Wong, *Skin tissue engineering, StemBook, 2009*].

3.2 Princip hojení

Kůže je kontinuálně vystavena mechanickým a chemickým vlivům zevního prostředí. Pro uchování kontinuity je kůže vybavena klíčovou vlastností - schopností regenerace. Kmenová buňka kůže je schopna v intervalu přibližně čtyř týdnů realizovat svůj diferenciační program: vystoupení z buněčného cyklu, potlačení exprese jejích lamininů a integrinů, které ji vážou na bazální membránu, pohyb ze stratum basale až k stratum corneum, kde se odloučí.

Je-li kožní bariéra porušena (např. termickým traumatem), je výsledná schopnost regenerace kůže závislá na množství kmenových buněk. Hlavními zdroji jsou bazální buňky lokalizované na bazální membráně a epiteliálními buňkami vystlaná kožní adnexa (mazové a potní žlázy, vlasový folikul). Zajímavou strukturou je tzv. bulge - nahromadění epidermálních buněk v blízkosti úponu m. arrector pili vlasového folikulu,

ze kterého se v normální situaci generují buňky vlasového folikulu. Teprve v případě poranění jsou v bulge nashromážděné kmenové buňky zapojeny do epidermální regenerace. Molekulární podklad jejich mobilizace dosud není objasněn [Taylor et al., 2000; Oshima et al., 2001; Ito et al., 2005]. Druhým klíčovým momentem je v případě rány zasahující do hlubších struktur kůže regenerace vláknité složky dermis. Kůže není schopna přestavět zásadně postiženou dermis do původní podoby. Novotvořená fibrózní tkáň má jiné kvalitativní i kvantitativní složení a vytváří se jizva. Epidermální hojení (reepitelizace) je výsledkem aktivace folikulárních a epidermálních progenitorů keratinocytů, stimulovaných změněnou expresí kaskády cytokinů a růstových faktorů, především IL1-beta, IL-6, TGF-alfa, TGF-beta1, a KGF (keratinocyte growth factor). Prvních 24hod je charakterizováno zvýšenou expresí IL1-beta a IL-6 v epidermis; v dermis je exprimován TGF-beta1, který stimuluje kmenové a tranzitní buňky folikulů k mitóze a vysoké proliferaci. Dalších 24 hod je zvýšeně exprimován TGF alfa a IL-6 v epidermis, KGF a IL-6 v dermis. Třetí fáze je charakterizována návratem k normálu, aktivace keratinocytů v bulge je charakterizována expresí cytokeratinu 19 [Myers et al., 2007].

3.3 Kožní náhrady

3.3.1 Současný vývoj kožních náhrad

Úspěšná obnova porušeného kožního krytu pomocí kožní náhrady je závislá nejen na přítomnosti kmenových keratinocytů nutných k spontánní epitelializaci, ale i na dodání dermálních elementů.

Snahou rozvíjejícího se tkáňového inženýrství je nahradit ztracenou kůži materiálem, který by se svými funkčními i morfologickými vlastnostmi co nejvíce přiblížil tak dynamické tkáni jakou je lidská kůže. Dosud však nebyla vyrobena náhrada, která by umožnila definitivní uzávěr ztraceného kožního krytu, bez nutnosti použití autologních buněk. Vývoj kožních náhrad jednoznačně směřuje k dvojvrstevné kožní náhradě se snahou kvalitativně i kvantitativně napodobit přirozenou kožní architekturu [Van der Veen et al., 2010]. Ideální vlastnosti kožní náhrady jsou: semipermeabilita, dobrá přilnavost, nepřítomnost antigenní aktivity, absence nežádoucích zánětlivých a toxických projevů, bezpečnost vzhledem k možnému přenosu exogenní infekce, bariéra před mikroorganismy, zabránění vysychání rány, umožnění regulace tělesné teploty, snížení bolestivosti, jednoduchá aplikace, cenová dostupnost a dobrá skladovatelnost [Atiyeh et al., 2005].

3.3.2 Klasifikace kožních náhrad

Kožní náhrady je možné rozdělit podle několika kritérií, která se často vzájemně překrývají.

Podle časového faktoru dělíme kožní náhrady na

- Dočasné: slouží ke krytí rány - “wound cover“. Příkladují se často opakovaně na rány a po jejich zhojení se snášejí. Chrání dočasně lůžko rány a svými vlastnostmi přispívají ke spontánní epitelializaci.
- Trvalé: slouží k uzavěru rány - “wound closure“. Nahrazují ztrátu epidermis, dermis nebo obou. Dochází k trvalé inkorporaci součástí náhrady do lůžka rány.

Podle složení rozlišujeme dočasné kožní náhrady na:

- Biologické - využití tkáně autologní (autotransplantát), alogenní (alotransplantát, amnion), nebo xenogenní (xenotransplantát, submukóza prasečího střeva).
- Semisyntetické – kombinace umělých materiálů (silikon, polyvinyl, nylon) s biologicky aktivními komponenty dermis či epidermis nebo obou
- Syntetické – materiály sloužící k dočasnému krytí popálenin s různě vyjádřenou antibakteriální aktivitou.

Z klinického hlediska je nejčastěji používané rozdělení biologických a biosyntetických náhrad na:

- Epidermální
- Dermální
- Dermoepidermální
- Náhrady odvozené od jiných tkání než kůže (např. deriváty placenty, deriváty prasečí střevní sliznice)

3.3.3 Epidermální náhrady

Epidermální biologické náhrady spočívají v náhradě epidermálních kožních buněk, především keratinocytů, tvořících vícevrstevný dlaždicový rohovějící epitel. Kultivace a transplantace lidských keratinocytů patří k milníkům léčby rozsáhlých ztrát kožního krytu [Rheinwald a Green, 1975; Gallico et al., 1984; Cuono et al., 1986].

Dodání epidermálních buněk na ranou plochu se ukázalo být efektivní léčbou pro popáleniny i jiné typy ran. V polovině sedmdesátých let 20. století byla Rheinwaldem a

Greenem vyvinuta v USA metodika pro přípravu kultivovaných epidermálních štěpů, která se s různými obměnami používá dodnes [Rheinwald a Green, 1975; Green et al., 1979]. O'Connor et al. (1981) jako první úspěšně použili kultivované epidermální štěpy pro léčbu popálenin. Od té doby byly vyvinuty i další metody, v jaké formě a jakým způsobem dodat buňky na ránu.

Základní techniky aplikace buněk na ránu jsou:

- Kultivované epidermální štěpy (cultured epidermal sheets, kultivované keratinocyty)
- Epidermální buňky kultivované na membránovém substrátu (composite skin, tissue-engineered skin)
- Kožní buňky aplikované v suspenzi (kultivované keratinocyty v suspenzi nebo čerstvě izolovaná směs kožních buněk)

Autologní keratinocyty se mohou trvale připojit, jedním z hlavních mechanismů jejich účinku je však stimulace proliferace vlastních keratinocytů ze zbytků adnex nebo z můstků síťovaného autotransplantátu [Braye et al., 2000; Horch et al., 1998]. Dodané epidermální buňky přispívají k uzávěru rány a přinášejí růstové faktory, které se s aktivním metabolismem buněk průběžně obnovují a tvoří prostředí vhodné k reepitelizaci. Přihojení a účinnost keratinocytů jsou vysoce závislé na technice jejich získání a přenosu na ránu.

Metody a formy aplikace epidermálních buněk na ránu

• *Kultivované epidermální štěpy (cultured epidermal sheets)*

Nejrozšířenější kultivační technikou je kultivace keratinocytů na vrstvě letálně ozářených myších fibroblastů 3T3 (3T3 feeder layer technique) [Rheinwald a Green, 1975; Green et al., 1979]. Z malého vzorku kůže 1 cm² je možné získat až 1 m² kultivované epidermis (konfluentní porost keratinocytů, zvětšení plochy až 10 000x) v časovém intervalu 3-4 týdnů [Green et al., 1979]. Tenký odběr kůže 1-4 cm² je rozvolněn pomocí trypsinu na jednotlivé buňky. Epidermální buňky jsou nasazeny na vrstvu ozářených 3T3 buněk a kultivovány v mediu obohaceném EGF a dalšími růstovými faktory [Green et al., 1979; Barrandon a Green, 1987]. Podpůrné mezenchymální 3T3 buňky se nedělí, ale produkují řadu růstových faktorů, které podporují růst keratinocytů a zabraňují přerůstání lidských fibroblastů. Keratinocyty tvoří kolonie, které postupně splynou. V konečné fázi je souvislý několikavrstevný porost keratinocytů

pomocí enzymu dispázy odvolněn jako celek ode dna kultivační nádoby a na vhodném nosiči (mastný tyl) je možné jej aplikovat na ránu. Hlavními nevýhodami této metody je doba trvání kultivace, složitá příprava před operací, fragilita získaného porostu, vysoká senzitivita k infekci a špatná přilnavost k lůžku rány. Enzymatické uvolnění od kultivačního povrchu dispázou vede k částečné ztrátě některých integrinů a proteinů basální membrány důležitých pro buněčnou adhezivitu, tedy nutných k úspěšnému uchycení buněk do rány [Chester et al., 2004, Putland et al., 1995; Marchisio et al., 1991]. Klinická aplikace vykazuje kolísavou, většinou nízkou úspěšnost přihojení (15% - 85%), která závisí na charakteru lůžka rány. Kultivované keratinocyty po dosažení konfluentního porostu ztrácejí svůj proliferativní potenciál [Chester et al., 2004]. V neposlední řadě je za sporný klinický výsledek odpovědná absence vláknité složky dermis. I přes sporné klinické výsledky byly kultivované autologní epidermální štěpy využity v celé řadě indikací jak termických, tak i netermických ztrát kožního krytu, např. chronických ran, junkční bulózní epidermolýzy apod. [Atiyeh et al., 2005]. Komerčně dostupný produkt na evropském i americkém trhu je Epicell® (Genzyme Corp.), což jsou kultivované epidermální autologní štěpy (cultured epidermal autografts) připravované individuálně z malých odběrů pacientovy kůže pomocí 3T3 feeder layer techniky.

K léčbě pacientů lze také využít kultivovaný epitel alogenního původu. Alogenní kultivované štěpy podporují hojení, neboť kultivované keratinocyty produkují spektrum růstových faktorů, které stimulují dělení pacientových kožních buněk a působí příznivě na hojení ranné plochy. Využívají se při hojení hlubokých dermálních popálenin a chronických ran [Braye et al., 2000]. Alogenní buňky jsou však brzy nahrazeny buňkami vlastními a vymizí z rány ještě dříve než může dojít k rejekci [Pokorná et al., 2001]. Dle některých autorů jsou rozpoznávány jako antigen prezentující buňky a jsou záhy rejekovány [Lei et al., 2005; Daniels et al., 1996].

- ***Epidermální buňky na membránovém substrátu (tissue-engineered skin)***

Samotné epidermální štěpy jsou velmi tenké, fragilní a citlivé na všechny druhy stresů (mechanické, chemické, infekce). Chybějící dermální struktury značně snižují procento přihojení kultivovaných epidermálních štěpů a mohou zvyšovat i riziko jizvení zhojených ploch. Proto se další vývoj kožních krytů zabýval vývojem synteticky připravených dermálních náhrad, kožních náhrad a systémů pro přenos keratinocytů [Horch et al., 2005; Atiyeh et al., 2005; Garfein et al., 2003].

Pro překonání nedostatků 2D kultur byly vyvinuty metody kultivace na membráně. Na

KPM byly v minulosti jako substrát pro kultivaci buněk využity hydrogely [Dvořánková et al., 1998] a acelulární prasečí dermis [Matoušková et al., 1997]. Bezbuněčná xenodermis se ukázala být kvalitní dermální matricí pro růst a diferenciaci keratinocytů. Vzniklá rekombinovaná kůže (recombined human/pig skin) byla aplikována na rány v „upside-down orientaci“ [Matoušková et al., 1997; Matoušková et al., 2001]. Systémy buněk pěstovaných na podložce (substrátu) byly principiálně určeny pro přenos keratinocytů. Jejich výhodou byla větší odolnost, porost buněk nemusel být plně konfluentní, přenos buněk na ránu byl jednoduchý – bez enzymatického narušení porostu. Ve složitějších organotypických 3D systémech jsou keratinocyty kultivovány na rozhraní medium-vzduch na různých substrátech [Bannasch et al., 2003; Muhlbauer et al., 1995]. Na vzduchu pak dochází k stratifikaci a diferenciaci buněk. Substráty jsou buď devitalizovaná dermis nebo matrix z kolagenu I, která je osázená dermálními fibroblasty [Garfein et al., 2003]. Směs kolagenu s fibroblasty zhruba po týdnu kultivace kontrahuje a zpevní kolagen. Na vzniklém disku jsou pak kultivovány keratinocyty nejprve ponořené a pak vyzdvižené na povrch media (např. na nerezové mřížce). Většinou byly vyzkoušeny pouze na zvířecím modelu či malém počtu pacientů [Badiavas et al., 2002; Brem et al., 2001]. Apligraf[®] (Organogenesis, USA) byl první dvouvrstevný organotypický systém klinicky používaný pro léčbu bércových vředů a diabetické nohy. V dermální vrstvě obsahuje kombinaci kolagenu I s lidskými alogenními kožními fibroblasty, v epidermis jsou neonatální keratinocyty, které při kultivaci na vzduchu stratifikují a diferencují. Organotypické systémy jsou však velmi náročné na čas, laboratorní přípravu a laboratorní vybavení, což (kromě ceny) limituje jejich využití [Garfein et al., 2003].

- ***Aplikace epidermálních buněk v suspenzi***

Očekávání spojená s klinickými výsledky aplikace kultivovaných keratinocytů nebyla zcela naplněna [Horch et al., 2005]. Příprava kultivovaných epidermálních štěpů nebo kožních ekvivalentů trvá dlouho, což někdy přesáhne dobu, po kterou pacient může čekat. Kultivací a diferenciací in vitro ztrácí buňky proliferační potenciál a problémy jsou také s jejich přihojením [Chester et al., 2004; Poumay a Pittelkow, 1995]. To vedlo k oživení starších projektů, které navrhovaly dodávat na rány buňky v suspenzi. Tím se zkrátí doba kultivace, a nemusí být použita dispáza. Keratinocyty mohou být transportovány z laboratoře k pacientovi v ampulích, dokonce mohou být zmrazeny a transplatovány v době, kdy je lůžko rány připraveno [Gustafson a Kratz, 1999;

Fredriksson et al., 2008]. Moderní a efektivní metodou je okamžité použití suspenze autologních keratinocytů a ostatních typů buněk přítomných v kůži získaných přímo v průběhu operace. Z tenkého dermepidermálního štěpu kůže pacienta (1-5 cm²) je během 30-45 minut enzymatickým rozvolněním trypsinem nebo analogem trypsinu získána suspenze buněk v množství 2-2,5 milionu buněk z 1 cm² [Zweifel et al., 2008]. Komerčně dostupné kity pro rozvolnění a izolaci buněk jsou metody Re-Cell[®] nebo Cell-Spray[®].

Čerstvě získané kožní buňky izolované přímo v průběhu operace jsme v kombinaci s XD použili pro hojení široce síťovaných autotransplantátů v rámci řešení grantu IGA č. NS/10507-3 [Zajíček et al., 2011]. V roce 2012 byla tato technika využita v klinické praxi na KPM jako „life-saving“ metoda u dítěte s popáleninami III. st. na 90% tělesného povrchu.

3.3.4 Dermální náhrady

Hlavním kritériem klasifikace dermálních náhrad je původ základní struktury, od které je dermální matrice odvozená [Van der Veen et al., 2010]. Podle tohoto kritéria rozdělujeme dermální náhrady na:

- **Biologické**, které jsou složené z více či méně intaktní lidské či xenogenní matrix
- **Kompozitní**, kdy je základní složkou upravený kolagen s přítomností biologické komponenty jako je např. glykosaminoglykan (GAG), eventuálně obohacený o epitelální či mezenchymální buňky
- **Syntetické**, vyrobené ze syntetických materiálů, které nejsou přítomny v kůži

3.3.4.1 Biologické náhrady dermis

Biologické kryty odvozené z kůže

Xenotransplantát je kůže či orgán získaný z jedince jiného druhu, v našem případě dermoepidermální štěp z prasečí kůže – čerstvý nebo kryoprezervovaný s omezenou viabilitou [Moserová a Houšková, 1988]. Indikace užití xenotransplantátu jako dočasného biologického krytu je léčba povrchních popálenin a krytí ploch po nekrektomii, nebo jako příprava hlubokých defektů (obnažené kosti, šlachy, nervové cévní svazky) k rekonstrukci lalokovou plastikou. Mezi jeho výhody u povrchových ztrát patří výborná adherence, snížení bolestivosti po překrytí volných nervových zakončení, omezení ztrát tekutin z rány. U hlubokých dermálních postižení redukce krvácení

u tangenciálních excizií a podpora epitelizace rány ze zbytků adnex. Nevýhodou je nutnost jeho výměny se zvýšeným rizikem sekundární exogenní infekce [Bromberg et al., 1965; Königová a Bláha, 2010]. Teoreticky by mohl být xenotransplantát potenciálním zdrojem prasečích retrovirů. I když bylo používání čerstvých xenotransplantátů v ČR velmi rozšířené, byla kvůli náročné legislativě EU většina odběrů v ČR zrušena. Po odstranění buněk z prasečí kůže trypsinizací a následné sterilizaci je možné připravit acelulární xenogenní matrix. Na trhu jsou ve funkci kožních krytů dostupné:

Xe-Derma® (MEDICEM Technology, s.r.o.) – sušená, bezbuněčná, radiačně sterilizovaná prasečí dermis. Český výrobek, který byl vyvinut ve spolupráci našeho pracoviště (KPM, 3. LF UK) s Ústavem molekulární genetiky AV ČR.

Xenoderm® (SPAZIO Professionale, srl) – je lyofilizovaná prasečí dermis. Její nevýhodou je náročnější příprava.

EZ-Derm® (AM Scientifics Limited) – xenodermis, která se dodává ve vlhkém prostředí. Dle našich mikroskopických pozorování obsahuje zbytky epidermis. Na KPM FNKV s její aplikací nemáme klinickou zkušenost.

Alotransplantát je dermoepidermální štěp získaný buď z živého dárce, obvykle rodinného příslušníka, nebo z kadaveru po úpravě glycerolizací. Hlavní výhodou alotransplantace je přenesení dvouvrstevné, strukturálně identické tkáně do lůžka rány, kde dochází k přechodné inkorporaci štěpu a vytvoření pevného napojení kapilár lůžka rány a alodermis. Vaskularizovaný alotransplantát plní dočasně funkce autotransplantátu. Po přibližně třech až čtyřech týdnech však dochází k rejekci – deskvamaci epidermis štěpu. V klinické praxi slouží aloštěp buď jako dočasný uzávěr rozsáhlých ploch po nekrektomii dokud není dostupný autologní štěp nebo k překrytí široce síťovaných autotransplantátů (umožní rychlejší epitelizaci perforací mezi můstky široce meshované kůže). Mezi nevýhody patří rejekce epidermis s v intervalu 3-4 týdnů od aplikace, riziko přenosu infekce dárce, dostupnost a cena. De-epidermizace a decelularizace alotransplantátu vede k vytvoření čistě dermální kadaverózní náhrady. Na trhu je dostupný **Alloderm®** (LifeCell, Woodlands, Texas, USA). Jeho aplikace vyžaduje dodání epidermální komponenty pacienta. Přihojení štěpů je ale procentuálně nižší než u středně silných dermoepidermálních štěpů [Wainwright, 1995]. Nejmodernějším z kadaverů derivovaným preparátem z produkce Euro Skin Bank je **Glyaderm®** (Euro-SKIN BANK), u kterého je nutná vaskularizace před dodáním epidermální komponenty a nutnost druhé operace (two-step procedure).

Biologické kryty odvozené z jiné tkáně než kůže

Oasis® Wound Matrix (Healthpoint LTD, Sant Antonio) - submukóza prasečího tenkého střeva (přírodní kolagenní matrix obsahující kolagen a bioaktivní prasečí proteiny). V intervalu 7 dnů dochází k inkorporaci do lůžka rány a stimulaci epitelizace. Efektivní je na terapii chronických ran pro přítomnost bioaktivních prasečích proteinů [Niezgoda et al., 2005]. Používá se též pro hojení odběrových ploch. V ČR je nedostupný.

Amnion - lidská amniotická membrána. Výhodou je dobrá adherence, jednoduchá aplikace a transparentnost. Nevýhodou zůstává nedostupnost, obtížná skladovatelnost, nutnost výměn a potenciální riziko přenosu infekcí (CM, HIV) [Gajiwala a Gajiwala, 2004].

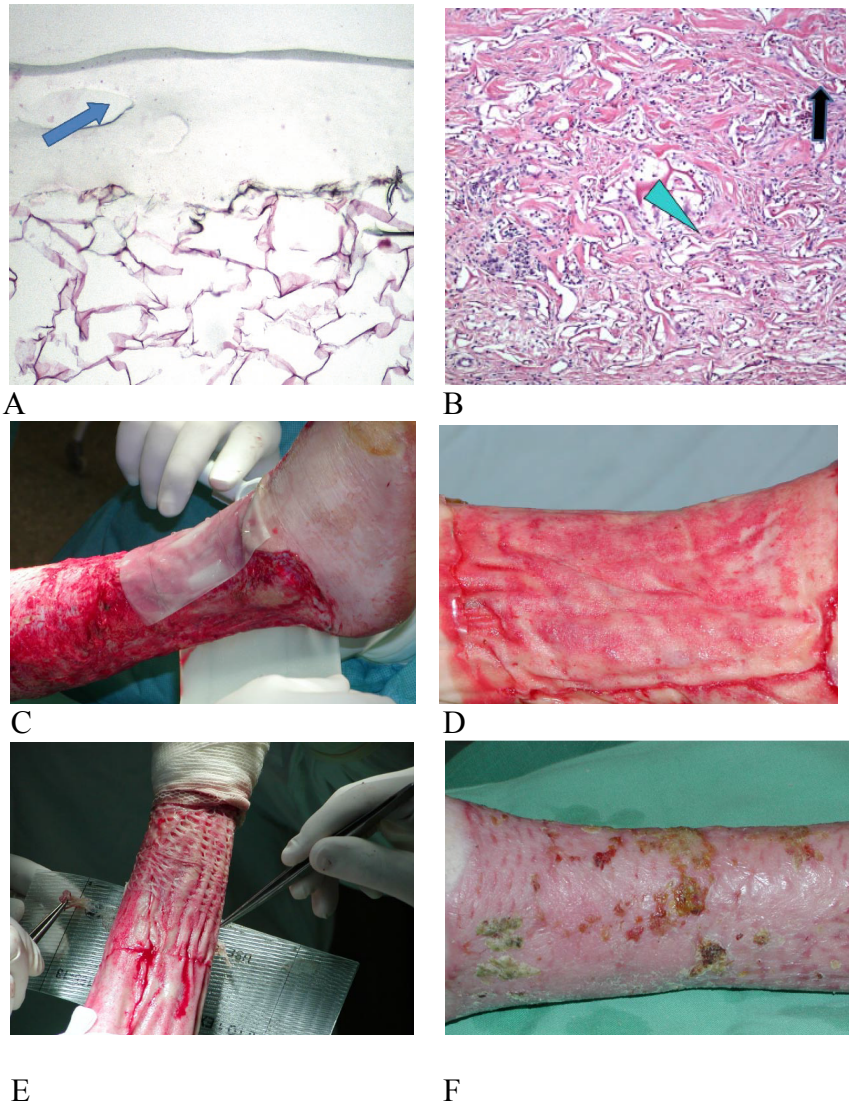
3.3.4.2 Kompozitní náhrady dermis

Základem kompozitních náhrad je vytvoření definované 3D matrix z purifikovaných přírodních struktur jako je např. kolagen či elastin doplněných glykosaminoglykany. Použití purifikovaných kožních komponent omezuje nežádoucí imunologické reakce. Vytvoření 3D sítě zvyšuje rezistenci struktury vůči degradujícím kolagenázám jako je metalloproteináza [De Vries et al., 1993]. Přidání glykosaminoglykanů jako chondroitin-6-sulfát podporuje mechanickou stabilizaci dermální matrice, která se postupně degraduje v intervalu několika týdnů po osídlení pacientovými fibroblasty, tvořícími vlastní kolagen [Yannas et al., 1980]. Další možností je přidání alogenních buněk, nejčastěji neonatálních fibroblastů, které svými růstovými faktory stimulují proces hojení [Lee et al., 2005].

Příklady komerčně dostupných kompozitních dermálních náhrad:

Integra® (Integra Life Science Corp, USA) má v klinické praxi největší celosvětové užití od roku 1985, kdy byla v USA poprvé aplikována [Burke, 1987; Moiemmen et al., 2011]. Integra je dvouvrstevná kožní náhrada, tvořená trojrozměrnou sítí bovinních kolagenních vláken s glykosaminoglykanem (náhrada dermis) a tenkou silikonovou vrstvou (náhrada epidermis). Po aplikaci Integry dochází k mikrovaskularizaci matrice, poté k prorůstání fibroblastů do kolagenní matrix a degradaci původní kolagenní struktury (obr. 2). Po vaskularizaci, která trvá 3-4 týdny, musí být vrchní silikonová vrstva nahrazena tenkým autologním dermoepidermálním štěpem. Nevýhody jsou doba

nutná k revaskularizaci, vysoké riziko hematomu a infekčních komplikací, ev. cena [Unglaub et al., 2005]. Integra je u kriticky popálených pacientů používána na našem pracovišti.



Obr. 2. Integra® - struktura a aplikace **A.** Integra - dermální strana je tvořena purifikovaným bovinním kolagenem a chondroitin-6-sulfátem, epidermální část je nahrazena semipermeabilní silikonovou membránou (šipka.) **B.** V intervalu tří týdnů dochází k vaskularizaci a přestavbě původní kolagenní struktury. Fibroblasty ze spodiny rány migrují a prolifерují po síti hovězího kolagenu, který se postupně degraduje (černá šipka) a vytváří vlastní kolagení vlákna (modrá šipka). **C.** Přiložení Integry na lůžko rány. **D.** Plně vaskularizovaná neodermis připravená k transplantaci tenkého dermoepidermálního štěpu. Obrázek ukazuje stav po snesení silikonové fólie. **E.** Meshovaný autotransplantát přiložen na vaskularizovanou neodermis Integry po pětítýdenní maturaci. **F.** Tři týdny po přiložení je kožní autotransplantát přiložen k neodermis. (foto histologie MUDr. Eva Sticová, Ústav patologie, 3.LF UK)

Biobrane™ (Mylan Bertek Pharmaceuticals Inc., Sugar Land, TX, USA) je dvouvrstevná dočasná náhrada. Zevní epidermální složka je tvořena tenkým silikonovým filmem s podobnými bariérovými vlastnostmi jako epidermis. Vnitřní dermální komponenta je tvořena sítí nylonových vláken, na které jsou navázány peptidy prasečího kolagenu I (umožňuje ideální adheenci a podporuje fibrovaskulární růst). Po přiložení plní podobnou funkci jako xenotransplantát, kolagenní peptidy stimulují epitelizaci rány, pokud jsou zachována rezidua adnex.

Transcyte® (Advanced Tissue Science Inc., La Jolla, CA, USA) - epidermální složka je tvořena silikonovou membránou a dermální složka nylonovými vlákny s navázanými kryoprezervovanými neonatálními fibroblasty, které produkují kolagen typu I, fibronectin, glykosaminoglykan a růstové faktory. Po přiložení na lůžko rány silikonová vrstva působí jako bariéra, za adheenci dermální komponenty je odpovědný nylon, aktivovanými fibroblasty produkované proteiny stimulují hojení rány [Hansbrough et al., 1989].

Matriderm® (Dr.Suewlack Skin Care Comp.) je složen z bovinního dermálního kolagenu a elastinu. Jako jediný dostupný umožňuje transplantaci dermální náhrady a epidermálního štěpu současně. Vložený elastin působí stimulačně na angiogenezi [Atherton et al., 2010; Ryssel et al., 2008].

3.3.4.3 Syntetické náhrady dermis

Plně syntetická příprava struktury sice umožňuje exaktní matici, problematičtější však zůstává buněčná adheence, migrace a celková stabilita produktu. Syntetická matrix bývá obohacena o alogenní fibroblasty. Komerčně dostupné přípravky jsou např.:

Dermagraft® (Advanced Tissue Science Inc., La Jolla, CA, USA) je dermální analog tvořený polymerním nosičem (Dexon, Vicryl) obohaceným kultivovanými alogenními neonatálními fibroblasty. Demagraft podporuje hojení stimulací fibrovaskulární tkáně lůžka rány metabolicky aktivními produkty alogenních fibroblastů a reepitelizaci rány z okrajů [Purdue et al., 1997].

Polyactive® (Octoplus Inc., USA) je složen z polyetylenoxidu a polybutyltereftalátu, jeho raritní klinické využití je v reparaci kostní chrupavky [Nandakumar et al., 2010].

3.3.5 Dermoepidermální náhrady kůže s kultivovanými buňkami

Dermoepidermální náhrady kůže obsahující kombinaci epidermálních a dermálních buněk na dermální plně biodegradabilní matrix představují nejsofistikovanější produkty kožního tkáňového inženýrství. Jsou to organotypické systémy, ve kterých jsou kultivovány fibroblasty v dermální vrstvě a keratinocyty v epidermální vrstvě na absorbovatelném dermálním nosiči. V ČR jsou nedostupné. Představitelé této skupiny jsou např.:

Apligraf[®] (Organogenesis Inc., Novartis). Epidermální složka je tvořena neonatálními alogenními keratinocyty, dermální složka pak prasečím kolagenem I s vitálními neonatálními alogenními fibroblasty. Používá se pro chronické kožní léze, nehojící se rány, často je používán též jako kryt široce meshovaného autotransplantátu [Bell et al., 1981].

OrCel[®] (Forticell Bioscience, USA) - je tvořen alogenními fibroblasty a kultivovanými keratinocyty umístěnými na protilehlých okrajích kolagenní matrix, která je tvořena bovinním kolagenem [Medalie a Morgan, 1999]. OrCel[®] je možné využít jako náhradu autotransplantátů při operacích kontraktur prstů u dystrofické epidermolysis bulosa, [Eisenberg a Llewelyn, 1998] převážně u kongenitálního typu epidermolysis.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Izolace keratinocytů z kůže

Vzorek kůže (1-5 cm², síla 0,2-0,4 mm) byl inkubován 2 hod při 37°C v 15 ml 0,25% trypsinu v PBS. V kapce media byla oddělena epidermis od dermis pomocí dvou jehel, čímž se enzymaticky rozvolněné keratinocyty uvolní do media. Výsledná buněčná suspenze byla naředěna médiem a nasazena do kultivačních lahvíček pro tkáňové kultury (TK) o povrchu 25 cm².

4.2 Kultivace keratinocytů pomocí feeder layer techniky

Základem metody byla kultivace keratinocytů na porostu pomocných letálně ozářených (100Gy) myších fibroblastů 3T3 nasazených v hustotě 25 000 buněk/cm² (feeder layer) na lahvičku či misku pro tkáňové kultury (TK). Ozářené buňky mohou být uchovávány zmrazené v ampulích v tekutém dusíku. Vrstva mezenchymálních buněk slouží jako nedělící se, ale metabolicky aktivní podklad pro epiteliální buňky - keratinocyty. Buňky feeder layeru produkují řadu růstových faktorů potřebných pro proliferaci epiteliálních buněk. Keratinocyty byly v 1. pasáži pěstovány v polystyrénových lahvíčkách pro TK. Kultivace probíhala v termostatu v 3,5% atmosféře CO₂ při 37°C. Standardní kultivační médium používané pro kultivaci fibroblastů 3T3 bylo H-MEM (Eaglovo minimální médium v Hanksově pufru) doplněné o všechny neesenciální aminokyseliny, pyruvát sodný 0,12 g/l, NaHCO₃ 1 g/l, 10% bovinního séra, penicilin 200 U/ml a streptomycin 100 µg/ml. Médium pro kultivaci keratinocytů (epiteliální médium) bylo navíc obohaceno o 2 % fetálního bovinního séra (Lonza), hydrokortizon 0,5 µg/ml, cholera toxin 10⁻¹⁰ M, epidermální růstový faktor EGF 5 ng/ml (vše Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a inzulin 0,3 ml/100 ml media (Actrapid 100 U/ml, Novo Nordisk, Dánsko). Buňky získané ze vzorku kůže byly resuspendovány v epiteliálním kultivačním médiu a nasazeny do kultivační lahvičky (NUNC, 25 cm²) obsahující předem nasazené 3T3 buňky.

4.3 Kultivace a diferenciaci keratinocytů na XD

Příprava XD: Den před předpokládaným nasazením buněk byla XD vložena do 60 mm Petriho misky pro TK obsahující standardní medium a inkubována přes noc v 3,5% atmosféře CO₂ v termostatu při 37°C.

Kultivace: Druhý den bylo vyměněno médium za epitelianí, na XD nasazeny ozářené 3T3 buňky ($1,3 \times 10^6$) a poté keratinocyty v množství $1-3 \times 10^6$. Médium měněno po 2-3 dnech.

Diferenciace: Po dosažení souvislého porostu (6-10 dnů) byla XD nastříhána na kousky cca 1 cm^2 a na nerezové mřížce pokryté sterilním mulem vyzdvižena na rozhraní médium-vzduch. Kultivace probíhala další týden, výměna media po 2-3 dnech. Podle potřeby mohly být v průběhu kultivace přidány 3T3 buňky.

4.4 Kultivace a diferenciace keratinocytů na Biopadu

Jako kontrola byl pro kultivaci keratinocytů použit jako substrát (3D matrix) koňský kolagen Biopad[®], což je lyofilizovaný 3D kolagen typu I s vláknitou strukturou. Pro kultivaci a diferenciaci byla použita stejná metoda jako pro XD.

4.5 Kultivace keratinocytů v bezsérovém médiu KGM

Po rozvolnění buněk ze vzorku kůže trypsinem byla aktivita trypsinu blokována promytím buněčné suspenze v médiu s 20 % séra. Suspenze byla promyta a resuspendována v médiu KGM (Lonza), buňky byly nasazeny do kultivační lahve 25 cm^2 s filtrem a kultivovány v termostatu v 5% atmosféře CO_2 při 37°C .

4.6 Histologická a imunocytochemická vyšetření XD a kůže

Vzorky XD (s kultivovanými keratinocyty či bez nich) a kůže byly fixovány ve 4% formaldehydu v PBS. Ve spolupráci s Ústavem patologie 3. LF UK a FNKV byly vzorky analyzovány pomocí histologických metod. Parafínové řezy o síle $5 \mu\text{m}$ byly montovány na podložní sklíčka a barveny pomocí hematoxylin-eozinu, dále testovány na přítomnost kolagenu pomocí trichromu a na přítomnost elastických vláken pomocí Gieson/orceinu. Některé vzorky byly barveny imunocytochemicky za pomoci protilátek proti vysokomolekulárním cytokeratinům HMW CK (klon CD34b12, Dako, Dánsko), nukleárními antigeny p63 (Ab-1, klon 4A4, NeoMarkers, Fremont, CA, USA), CD29 a involucrinu (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK).

4.7 Krytí popáleninových ran pomocí XD

Povrchní popáleniny: Suchá XD je hydratována 2-5 minut ve fyziologickém roztoku. Vlhká plocha rány je po snesení povrchu buly kryta XD, která slouží jako náhrada ztracené epidermis a umožní spontánní epitelizaci plochy. Po aplikaci XD obvykle

během 24 hodin zaschne a je ponechána na ráně do úplného zahojení. Pak lze snadno XD sloupnout nebo odpadne sama.

Povrchní popáleniny II. st. (IIa): spodina rány je dobře prokrvena, kožní ztráta zasahuje celou epidermis a nepatrnou část dermis. Edém se formuje mezi odlučující se epidermis a spodinou rány. Okolí plochy bylo desinfikováno roztokem polyvidonjodu, rána omyta borovou vodou, sneseny zbytky epidermis z protrhaných bul. XD po 2-5 minutové hydrataci ve fyziologickém roztoku byla přiložena na plochu, kryta mastným tylem a gázou navlhčenou v 3% borové vodě. Převaz vrchní části mulu byl prováděn po 2-3 dnech od aplikace.

Hluboké dermální popáleniny (popálení stupně IIb): Spodina rány je hůře prokrvena, bez kapilárního návratu vlivem edému a mikrotrombotizace, doba hojení takové rány je protrahována, je vyšší riziko infekce a konverze plochy v ztrátu kůže v celé síle. Epitelizace probíhá z kmenových keratinocytů z oblasti zbytků kožních adnex.

Pro krytí *hlubokých dermálních popálenin* XD musí být ranná plocha dobře připravena. Z rány je odstraněna nekrotická vrstva – je provedeno debridement a to buď a) opatrnou tangenciální excizí, tak aby zbytky adnex zůstaly zachovány; nebo b) dermabrazi do roviny plošného kapilárního krvácení - dermabrazi usnadňuje předchozí aplikace antibakteriálního krému (SSD), který urychluje rozpouštění tenké nekrotické vrstvy. c) Dobrý výsledek při hojení hlubokých dermálních popálenin II. stupně lze docílit i přiložením XD při prvním nebo druhém ošetření na omytou plochu (bez provedení excize či dermbraze) po dezinfekci okolí rány.

Krytí odběrových ploch XD: Odběrová plocha je rána, kde byl odebrán kožní štěp. Jedná se o ztrátu kůže v síle 0,2 – 0,25 mm, kde je odebrána celá epidermis s malou částí dermis (záleží na síle štěpu a lokalizaci). Hojení odběrových ploch je modelem pro hojení dobře prokrvené rány definované hloubky, která vznikla netermicky odběrem štěpu elektrickým dermatomem. XD byla použita jednak v meshované podobě u rozsáhlé odběrové plochy na zádech (síťování umožní evakuaci případného hematomu) a jednak v podobě nemeshované. Srovnávacím krytem byl mastný tyl se suchým čtvercem mulu.

Krytí odběrových ploch XD je výhodné u pacientů, kde se předpokládá zdlouhavé hojení (gerontologičtí pacient s atrofickou kůží, diabetici, apod.) nebo v případech, kde očekáváme komplikace hojení, např. při opakovaných odběrech u rozsáhle popálených pacientů. Zaslou XD je lépe ponechat na ráně až do samovolného sloupnutí, aby se nově vytvořená epidermis nezatrhlá.

4.8 Krytí odběrových ploch XD v kombinaci s čerstvě izolovanými keratinocyty

Odběr kůže a izolace keratinocytů

Na začátku operace byl pacientovi s rozsáhlými popáleninami odebrán tenký dermo-epidermální štěp kůže (síla 0,15 - 0,30 mm; velikost 2-4 cm²).

Varianta a) Kůže byla vložena do trypsinu v ReCell[®] systému (Obr. 20) a inkubována 30-40 min ve 37°C. Po vyjmutí z trypsinu byla kůže opláchnuta v SCL (sodium compound lactate, součást kitu ReCell[®]) a poté oddělena epidermis od dermis, čímž se uvolnily bazální buňky. Rozvolnění kůže bylo dokončeno seškrabáním zbytků buněk z kůže.

Varianta b) Kůže byla vložena do směsi 10 ml 0,5% trypsinu (Life Technologies) a 2 ml 0,02% EDTA v centrifugační zkumavce se šroubovacím uzávěrem a inkubována 30-40 min ve 37°C. Po vyjmutí z trypsinu byla kůže přenesena do zkumavky s 3-4 ml média a silně protřepána. Tím byla oddělena epidermis od dermis a uvolnily se bazální buňky.

Aplikace buněk

Výtěžek buněk byl v obou variantách mezi 2,2-2,7x10⁶ buněk z 1 cm² kůže. Buňky získané z 1 cm² kůže byly aplikovány na cca 140 cm² ranné plochy. Způsoby aplikace: nakapání suspenze buněk na ránu a krytí XD; nebo nakapání buněk na XD a jejím prostřednictvím přenos na ránu. Doba potřebné přípravy byla 35-50 min od odběru vzorku v závislosti na tloušťce odebrané kůže.

4.9 Krytí rány Flammazinem

Jako kontrola byl ke krytí ran st. IIb použit Flammazine (SSD), který je považován za standard v léčbě hlubokých dermálních popálenin. Převazy byly indikovány v pravidelných intervalech 48-36 hodin.

4.10 Krytí ran Askinou Derm

XD byla u některých pacientů srovnávána se syntetickým krytem na krytí popálenin Askina Derm, což je tenká, transparentní polyuretanová fólie, na povrchu krytá semipermeabilní membranou s výbornou celoplošnou adhezí k ráně a snadnou monitorací sekretu.

5 VÝSLEDKY

5.1 Růst a diferenciacie keratinocytů *in vitro* a *in vivo* ve vztahu k hojení ran

5.1.1 Kultivace keratinocytů

Pro dosažení růstu a stratifikace buněk *in vitro* na XD byla nejprve otestována řada technik kultivace primárních lidských keratinocytů (Obr. 3). Vzorek kůže o velikosti 0,5 cm² o síle 0,2-0,3 mm byl inkubován v 0,25% trypsinu v PBS 3 hod při 37°C. Pinzetou a jehlou byla na misce oddělena epidermis od dermis a tkáň protřepána, čímž se rozvolnily buňky. Výsledná buněčná suspenze byla naředěna médiem a centrifugována 10 min při 800 g. Peleta buněk byla resuspendována v příslušném médiu a nasazena na kultivační misky nebo lahvičky.

5.1.1.1 Kultivace keratinocytů feeder layer technikou

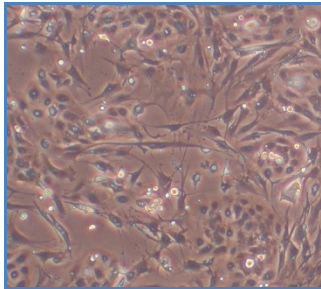
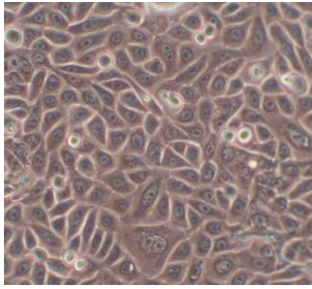
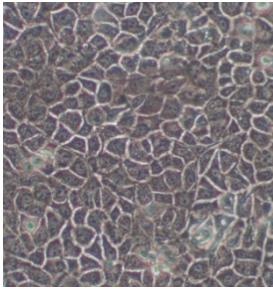
Kultivace keratinocytů probíhala na vrstvě letálně ozářených 3T3 buněk v epiteliálním médiu H-MEM obohaceném sérem, EGF, hydrokortizonem, cholera toxinem a inzulinem. Buňky byly pěstovány v polystyrénových lahvičkách nebo Petriho miskách s povrchem upraveným pro tkáňové kultury. Kultivace probíhala v termostatu v 3,5% atmosféře CO₂ při 37°C. Standardní kultivační médium bylo použito pro kultivaci fibroblastů 3T3. Epiteliální médium bylo použito pro kultivaci keratinocytů. Na obr. 3A jsou lidské keratinocyty spolu s 3T3 buňkami - rostoucí kolonie keratinocytů vytěsňují 3T3 buňky, které se nedělí, ale metabolizují.

Diferenciacie keratinocytů na XD: Po dosažení konfluencie byla XD s buňkami vyzdvižena na rozhraní medium-vzduch a kultivována další týden. Keratinocyty vytvořily několik vrstev epidermis (Obr. 8, str. 31). Pouze keratinocyty kultivované feeder layer technikou na XD v médiu se sérem byly schopné stratifikovat a diferencovat.

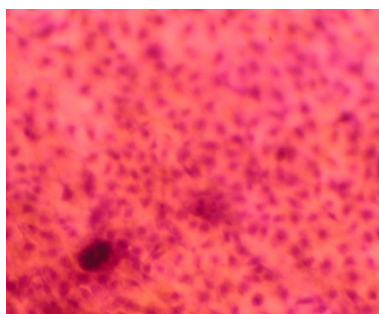
5.1.1.2 Kultivace keratinocytů v bezsérových médiích

Byly otestovány metodiky kultivace keratinocytů v bezsérových médiích KGM (Lonza), KGM Gold (Obr. 3B), a KGM-2 (ev. s přidavkem fetálního telecího séra – Obr. 3C); dále v mediu Panserin 801 (Pan-Biotech) a v médiu Keratinocyte SFM (Gibco). Kultivační techniky v bezsérových médiích jsou dosti odlišné od standardních (se sérem), buňky jsou daleko citlivější na manipulaci a prostředí. Jako nejlepší byla vytipována média

KGM-2 a KGM-Gold od firmy Lonza. Přidání séra do KGM médií stabilizuje buňky ve smyslu vyšší adherence k povrchu, ale omezuje jejich proliferaci, neboť buňky rychle terminálně diferencují v monolayeru. V bezsérových médiích keratinocyty nestratifikovaly, ale rostly pouze v jedné vrstvě (obr. 4).

<p>A</p> 	<p>B</p> 	<p>C</p> 
<p>Buňky kultivované pomocí feeder layer techniky</p>	<p>Buňky kultivované v bezsérovém médiu KGM-Gold (Lonza)</p>	<p>Buňky kultivované v bezsérovém médiu KGM 2 (Lonza) s přidáním 4%FCS</p>

Obr. 3. *Keratinocyty kultivované pomocí feeder layer techniky (A) a v bezsérových médiích (B, C).*



Obr. 4. *Keratinocyty kultivované v bezsérovém médiu KGM-2 na XD. Buňky rostly pouze v monolayeru. XD bylo nutno před nasazením buněk lavážovat přes noc ve standardním médiu se sérem (barveno May-Grünwald a Giemsa Romanowski).*

5.1.2 Růst a diferenciaci lidských keratinocytů na Xe-Dermě ve vztahu k hojení ran

Publikováno v The Scientific World Journal [Zajíček et al., 2012].

V současnosti se v moderní chirurgii používá řada biomateriálů odvozených ze zvířecích tkání. XD je sušená bezbuněčná prasečí dermis vyvinutá ve spolupráci s Klinikou popálenin, která má výrazný hojivý účinek na popáleniny i jiné typy ran. Cílem této části

práce bylo dokázat, že přírodní biologická struktura XD hraje důležitou roli ve tvorbě epidermis a epidermální architektury *in vitro* i *in vivo*. Bioaktivita XD byla studována pomocí organotypických tkáňových kultur, kdy keratinocyty byly pěstovány na XD na rozhraní medium-vzduch, tj. v podmínkách napodobujících podmínky *in vivo*. Pomocí histologických a imunohistochemických metod byl analyzován růst a diferenciaci lidských keratinocytů na XD a výsledek porovnán s tvorbou epidermis v hluboké popálenině kryté XD. Keratinocyty kultivované ponořené v médiu tvořily na XD 1-2 vrstvy. Po vyzvednutí této konfluentní kultury na rozhraní médium-vzduch (na nerezové mřížce) začaly keratinocyty stratifikovat a diferencovat, vytvářely vícevrstevnou diferencovanou epidermis. Výsledky ukazují, že přirozená struktura XD podporuje proliferaci a diferenciaci lidských keratinocytů, tím urychluje hojení ran a předchází jejich komplikacím.

5.1.2.1 Biomechanické vlastnosti a struktura XD

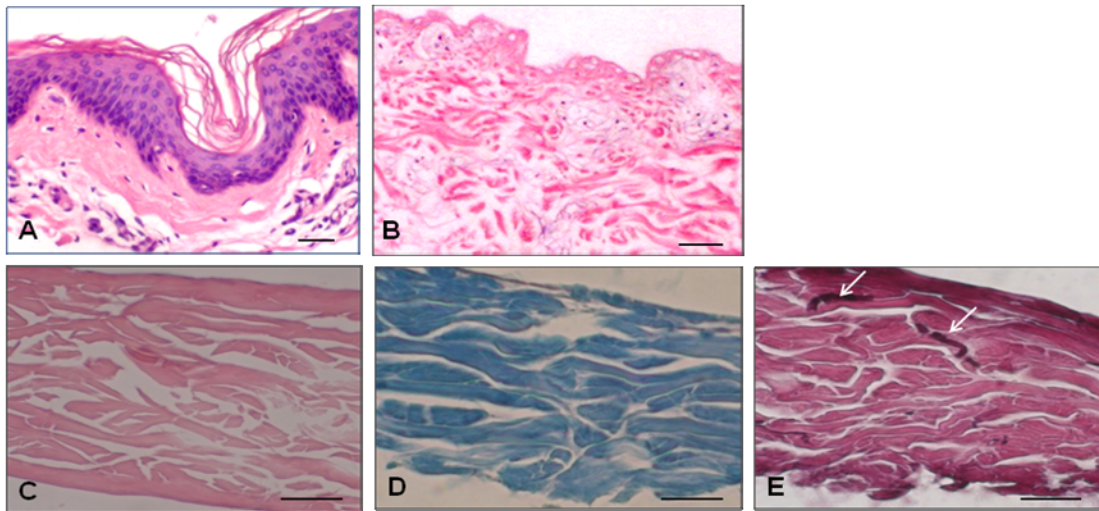
Po namočení ve vodě nebo v médiu jsou biomechanické vlastnosti XD (elasticita, adherence, hemostatický efekt) podobné normální kůži (Obr. 5). Síla hydratované XD je 0,25–0,35 mm. Pevnost v tahu je $6,6 \pm 1,2$ MPa.



Obr. 5. Bezbuňčná prasečí dermis Xe-Derma. Hydratovaná XD vykazuje vlastnosti podobné normální lidské kůži.

5.1.2.2 Histologické výsledky

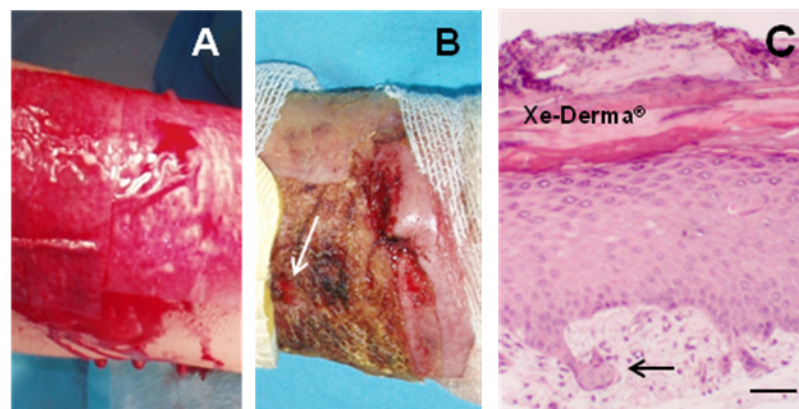
Histologické řezy ukázaly, že XD je 3D-matrix tvořená sítí kolagenních vláken a fragmentů elastických vláken (Obr. 6).



Obr. 6. Struktura XD. Histologické řezy: A) Prasečí kůže. B) Bezbuněčná xenodermis bezprostředně po odstranění epidermis a ostatních buněk. C) XD obarvená hematoxylin a eosinem. D) XD barvená trichromem ukazuje, že XD je složena převážně z kolagenních vláken (modrá). E) XD barvená van Gieson/orceinem ukazuje fragmenty elastických vláken (šipky). Měřítko – 30 μm .

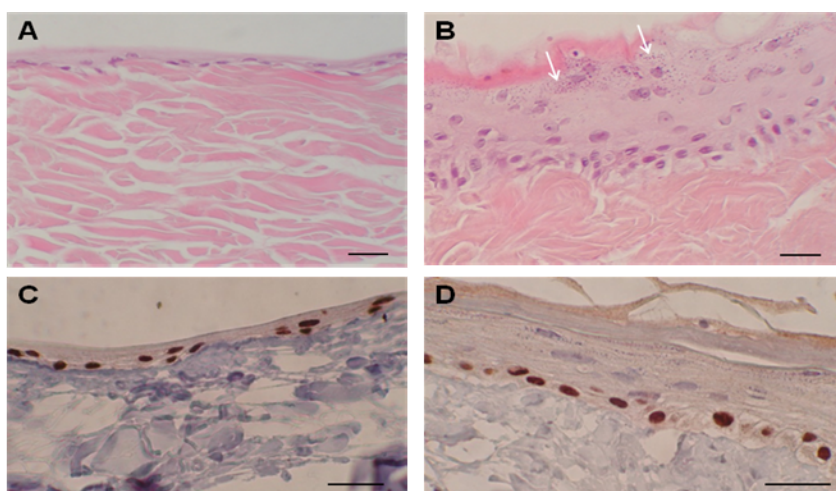
5.1.2.3 Růst keratinocytů *in vivo* a *in vitro*

Růst keratinocytů in vivo: V hlubokých popáleninách (hlubokých dermálních ztrátách kůže mezi II.-III. st.) krytých XD ukázaly histologické studie týden po aplikaci XD neoepidermis bez vyvinutých adnex (rete ridges). XD stále ještě lnula k ráně (Obr. 7). V analogických popáleninách krytých Grassolindem[®] nebyla patrná epitelizace.



Obr. 7. Růst keratinocytů pod krytem XD – hojení hluboké popáleniny. XD byla použita ke krytí plochy po nekrektomii pro přípravu rány k autotransplantaci. A. Dočasné krytí plochy po nekrektomii popáleniny III. stupně. XD okamžitě přilne k povrchu a ihned zastaví krvácení. B. XD ztvrdlá díky absorpci fibrinu (šipka – místo biopsie odebrané 8.den po aplikaci XD). C. Histologie odebraná 8. den ukazuje plně diferencovanou epidermis (pod XD) s málo vyvinutými epidermálními výběžky - rete ridges (šipka). XD stále ještě adhezuje k povrchu rány. Měřítko 50 μm .

Růst keratinocytů in vitro: Keratinocyty pro stratifikaci a diferenciaci byly kultivovány na XD pomocí 3T3 feeder layer techniky. Keratinocyty kultivované ponořené v mediu tvořily na XD 1–2 buněčné vrstvy (Obr. 8A, C). Po vyzdvižení na rozhraní medium-vzduch začala epidermis stratifikovat a vytvořila během týdne 5–15 buněčných vrstev (Obr. 8B, D). Tato vícevrstevná struktura výrazně připomíná diferencovanou epidermis *in vivo* - je složena z bazální, spinální, granulární a rohové vrstvy.



Obr. 8. Kultivace a diferenciacie keratinocytů na XD. A) Keratinocyty rostoucí ponořené v mediu tvoří na XD 1-2 vrstvy. B) Keratinocyty rostoucí na rozhraní medium-vzduch tvoří bazální, spinální a granulární vrstvu, částečně i stratum corneum. V granulární vrstvě jsou patrná keratohyalinová granula (šipky). C) Keratinocyty rostoucí ponořené v mediu imunocytochemicky barvené na p63 (nukleární protein p63 je exprimován v bazálních buňkách). D) Keratinocyty rostoucí na rozhraní medium-vzduch barvené na p63 (p63 exprimován pouze v bazálních buňkách). Měřítka – 30 μm .

5.1.2.4 Exprese a distribuce diferenciačních markerů keratinocytů *in vitro* a *in vivo*

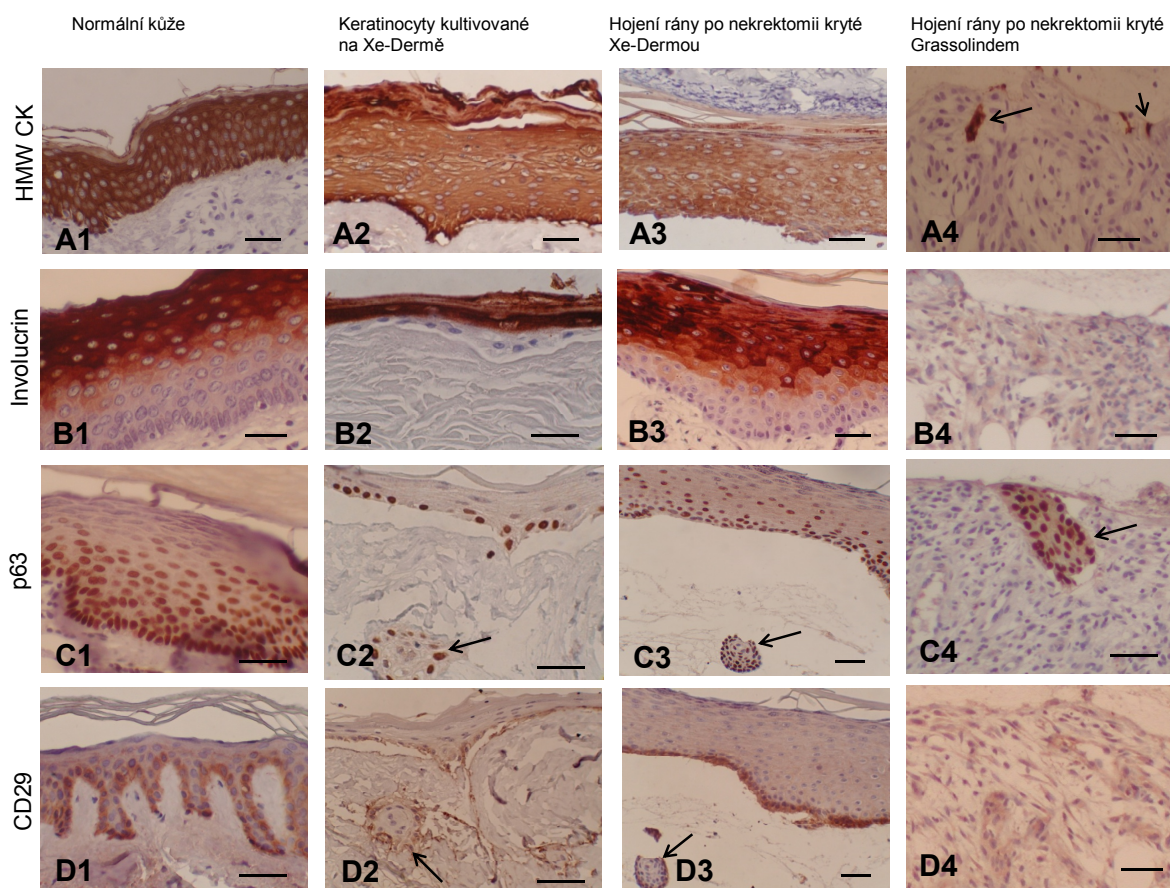
Parafínové řezy z normální kůže, rekombinované kůže (keratinocyty kultivované na XD) a epidermis z rány kryté XD nebo Grassolindem[®] (mastný tyl = kontrola) byly analyzovány pomocí protilátek detekujících markery diferenciacie keratinocytů. Reakce protilátek v kultivovaných keratinocytech a v hojící se kůži je ukázána v Tab. 1.

Imunohistochemické barvení pomocí protilátek proti cytokeratinům HMW CK (high molecular weight cytokeratins), involucrinu, p63 a CD29 v rekombinované kůži ukázalo, že organizace a diferenciacie keratinocytů *in vitro* na XD je podobná jako u normální epidermis (Obr. 9). Keratiny HMW CK byly silně exprimovány ve všech keratinocytech kultivovaných na XD (Obr. 9/A2). Involucrin byl exprimován v granulární a rohové vrstvě (Obr. 9/B2). CD29 byl pozitivní v bazální vrstvě keratinocytů (Obr. 9/D2). Podobné rozložení diferenciačních markerů bylo pozorováno v nově vytvořené epidermis

po krytí XD (Obr. 9/A3, B3, D3). Rána krytá Grassolindem® neepitelizovala, přestože v biopsii byly identifikovány zbytky adnex či jednotlivých keratinocytů (Obr. 9/A4 - D4). Jaderný protein p63 byl exprimován *in vitro* ve všech keratinocytech ponořené kultury (Obr. 8C) a v bazální vrstvě kultur pěstovaných na rozhraní medium-vzduch (Obr. 8D a 9/C2). *In vivo* byl antigen p63 exprimován nejen v bazální vrstvě, ale i v subpopulaci suprabazálních buněk (Obr. 9/C3). Keratinocyty *in vitro* vyjimečně migrovaly do matrix XD a vytvářely v ní ostrůvky buněk, které připomínaly jednoduché žlázy (Obr. 9/C2, D2; srovnej s 9/C3, D3).

Protilátka proti	Reakce s keratinocyty na XD	Obr. č.	Reakce s čerstvě hojícím se kožním epitelem	Obr. č.
HMW CK	Všechny keratinocyty	9/A2	Všechny keratinocyty	9/A3
Involukrin	Granulární a rohová vrstva	9/B2	Granulární a rohová vrstva	9/B3
p63	Bazální keratinocyty a ostrůvky uvnitř matrix XD	9/C2	Bazální a suprabazální keratinocyty, zbytky adnex	9/C3
CD29	Bazální buňky a ostrůvky uvnitř matrix XD	9/D2	Bazální buňky, zbytky adnex	9/D3

Tab. 1. *Diferenciace keratinocytů in vitro a in vivo. Imunocytochemické markery diferenciace keratinocytů u keratinocytů kultivovaných na XD osm dní po vyzvednutí na rozhraní medium-vzduch a u čerstvě se hojící hluboké dermální popáleniny osm dní po zahájení léčby pomocí XD.*

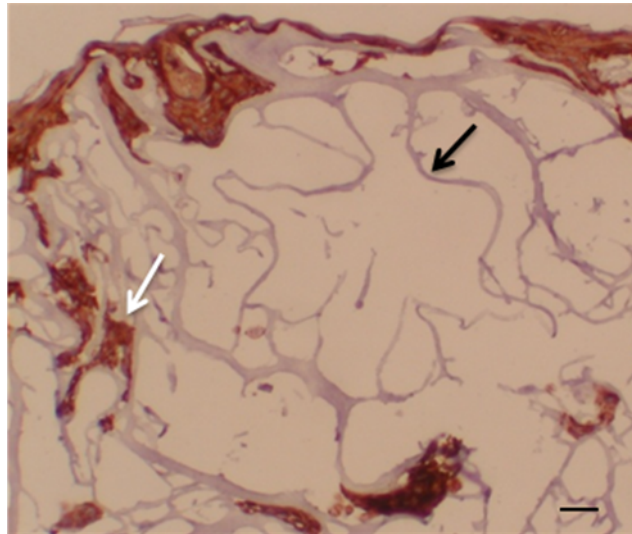


Obr. 9. Expres diferenciačních markerů v keratinocytech kultivovaných 8 dní na rozhraní médium-vzduch (A2, B2, C2, D2) ve srovnání s normální kůží (A1, B1, C1, D1), s čerstvě se hojící ránou po nekrektomii ošetřené pomocí XD (A3, B3, C3, D3) a s čtvrtě se hojící ránou po nekrektomii ošetřené pomocí Grassolindu® - kontrola (A4, B4, C4, D4). Rány po nekrektomii byly kryty XD (sloupec 3) nebo mastným tylem Grassolindem® (sloupec 4). Osmý den po zahájení léčby byly provedeny biopsie. Expres diferenciačních markerů HMW CK (řada A), involucrinu (řada B), p63 (řada C) a CD29 (řada D) byla porovnána v normální kůži (sloupec 1), v keratinocytech kultivovaných na XD (sloupec 2), v ráně ošetřené XD (sloupec 3) a v ráně ošetřené Grassolindem® pro kontrolu (sloupec 4). Obrázky ukazují, že růst a diferenciaci keratinocytů *in vitro* na XD (sloupec 2) a *in vivo* epitelizace pod XD (sloupec 3) jsou podobné, a že rány kryté XD tvoří epidermis během jednoho týdne (sloupec 3), zatímco rána krytá Grassolindem® neepitelizuje (sloupec 4), ačkoli jsou v dermis zřetelné zbytky keratinocytů (A4, šipka) nebo adnex (C4, šipka). Za povšimnutí stojí, že buňky migrující *in vitro* do XD tvoří ostrůvky vytvářející kolonie připomínající jednoduché žlázy (C2, D2 – šipky); střed těchto struktur je p63- a okraje kolonií jsou p63+ (srovnej s fragmenty žlázek na C3 a D3 – šipky). Měřítka – 50 μm .

5.1.2.5 Růst keratinocytů *in vitro* na Biopadu®

Pro kontrolu *in vitro* byly keratinocyty kultivovány na čistém kolagenu Biopad®. Po dvou týdnech kultivace (týden ponořené v médiu, týden na rozhraní médium-vzduch), byly růst, distribuce a diferenciaci buněk chaotické. Buňky migrovaly do struktury

Biopadu® tvořené fragilními kolagenními vlákny. Uvnitř této matrix/struktury buňky terminálně diferencovaly, což je prezentováno imunobarvením na involukrin (Obr. 10).



Obr. 10. Keratinocyty kultivované na Biopadu® (čistý rekonstituovaný koňský kolagen). Za povšimnutí stojí křehká kolagenní vlákna (černá šipka) a chaotické rozmístění nepravidelných skupin keratinocytů. Imunohistologické barvení na přítomnost involukrinu ukazuje terminálně diferencované keratinocyty ve vnitřní struktuře Biopadu® (bílá šipka). Měřítko – 30 μ m.

Shrnutí výsledků

Bioaktivita XD byla studována kultivačním testem, prokazujícím růst, stratifikaci a diferenciaci keratinocytů na XD. Analyzovali jsme růst lidských primárních keratinocytů *in vitro* na XD a srovnali výsledky s tvorbou neoepidermis u hlubokých dermálních popálenin léčených XD. Keratinocyty kultivované na XD ponořené v mediu vytvořily souvislý porost za 7-10 dní. Po vyzvednutí na rozhraní medium-vzduch keratinocyty začaly stratifikovat a diferencovat. Během týdne vytvořily na XD vícevrstevnou epidermis (5-10 vrstev) s bazální, spinální, granulární a rohovou vrstvou. Imunohistochemická analýza na vysokomolekulární cytokeratiny (HMW CK), CD29, nukleární antigen p63 a involukrin prokázala podobnou organizaci kultivovaných epidermálních buněk na XD jako u normální epidermis. Diferenciace keratinocytů byla porovnána s tvorbou epidermis na hluboké popálenině II.-III. st. po nekrektomii léčené XD. Morphologie epidermis *in vitro* byla velmi podobná neoepidermis, která vznikla na popálenině *in vivo* ze zbytků kožních adnex. Výsledky ukázaly, že přírodní pevná struktura XD (na rozdíl od čistého kolagenu Biopad) hraje důležitou roli při proliferaci a

diferenciaci keratinocytů a tvorbě epidermální architektury *in vitro* i *in vivo* a má pozitivní vliv na hojení ran.

5.2 Vliv epitelializačního potenciálu XD na různé typy popáleninových ran

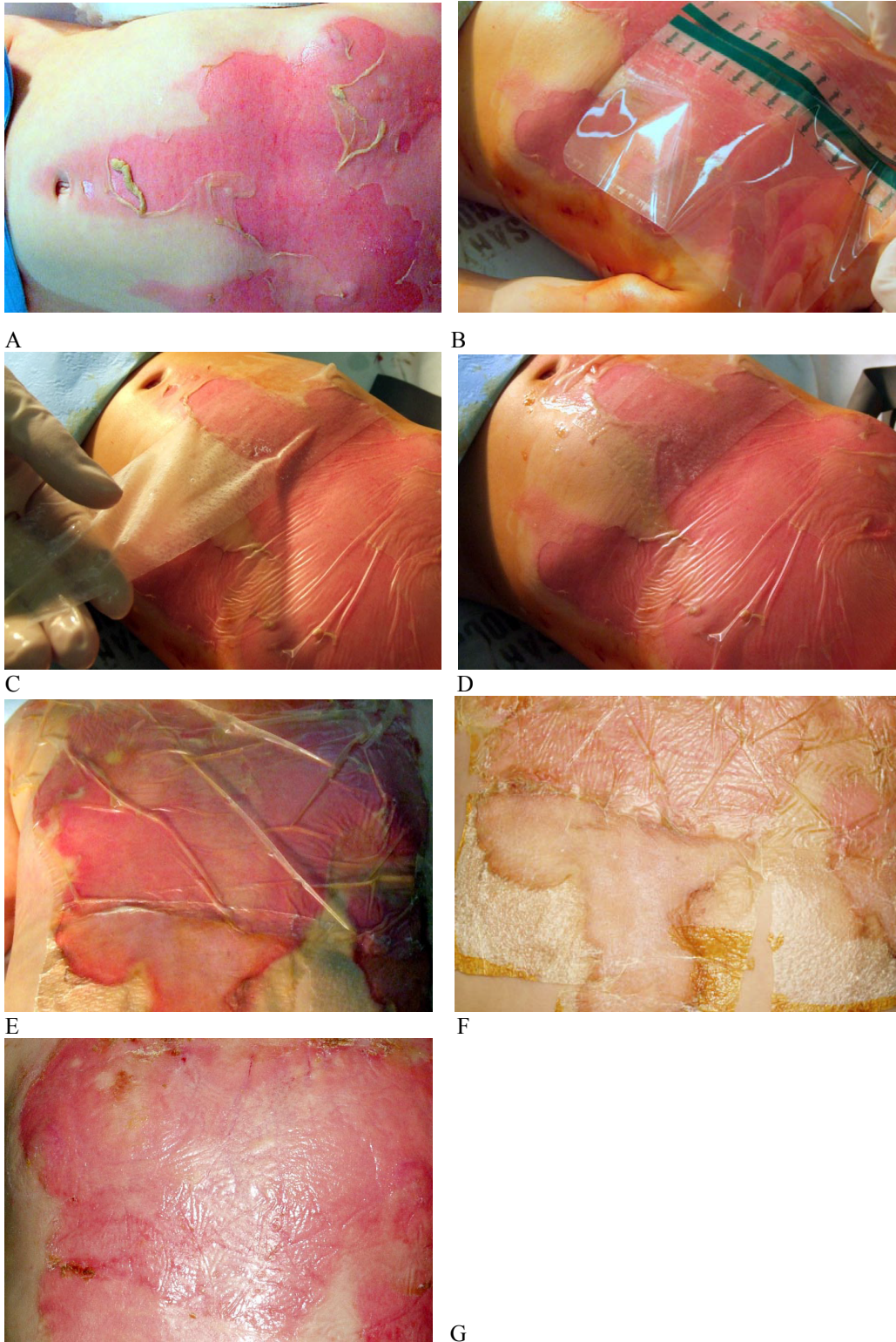
V popáleninové medicíně může být XD použita jako provizorní kryt v léčbě povrchní popáleniny druhého stupně, hluboké dermální popáleniny, pro krytí malých hlubokých defektů po odstranění nekrózy a jako dočasný biologický kryt nekrektomovaných ploch před autotransplantací. V kombinaci s široce expandovaným transplantátem je vhodné XD použít pro krytí rozsáhlých popálenin. Dalšími oblastmi použití jsou krytí odběrových ploch u problematických pacientů a krytí chronických defektů, jako jsou bérkové vředy a diabetická noha. XD lze velmi dobře využít i pro léčbu rozsáhlých odřenin a jiných plošných kožních ztrát akutních poranění.

5.2.1 Aplikace XD na povrchní opaření II. stupně

Opaření horkou vodou jsou nejčastějším mechanismem termického úrazu u dětí v nejmladší věkové kategorii. Ve velké většině případů se jedná primárně o plochy II. st. s dobrou prognózou ke spontánnímu zhojení v intervalu do 14 dnů. Použitý kryt by měl ránu chránit před mechanickým poškozením, infekcí a vysycháním. Mezi další důležitá kritéria pro úspěšnou léčbu m.j. patří redukce bolestivosti, frekvence převazů, manipulace s plochou a cena.

Dvouletá holčička přijata na KPM s opařením na hrudníku horkou vodou. Plocha lokalizována na přední části trupu o rozsahu 13% povrchu těla. Plochy ohodnoceny jako povrchní druhý stupeň místy s drobnými petechiemi na spodině. Na kraniální část plochy aplikován syntetický kryt - Askina Derm, kaudální část kryta biologickým krytem XD. Na oba kryty použito standardní svrchní krytí - tylexol a obklad s 3% borovou vodou.

První převaz na sále proveden 48 hodin od úrazu. Plocha krytá Xe-Dermou klidná, XD pevně lpí k lůžku rány, bez infekce. Plocha krytá syntetickým krytem vykazuje akumulaci sekretu pod krytem s nutností re aplikace krytu na dobře prokrvenou spodinu. Při dalším převazu oba kryty pevně lpí ke spodině, epitelizace ploch dobrá. Po deseti dnech došlo ke spontánnímu zhojení. Dítě propuštěno do domácí péče (Obr. 11).



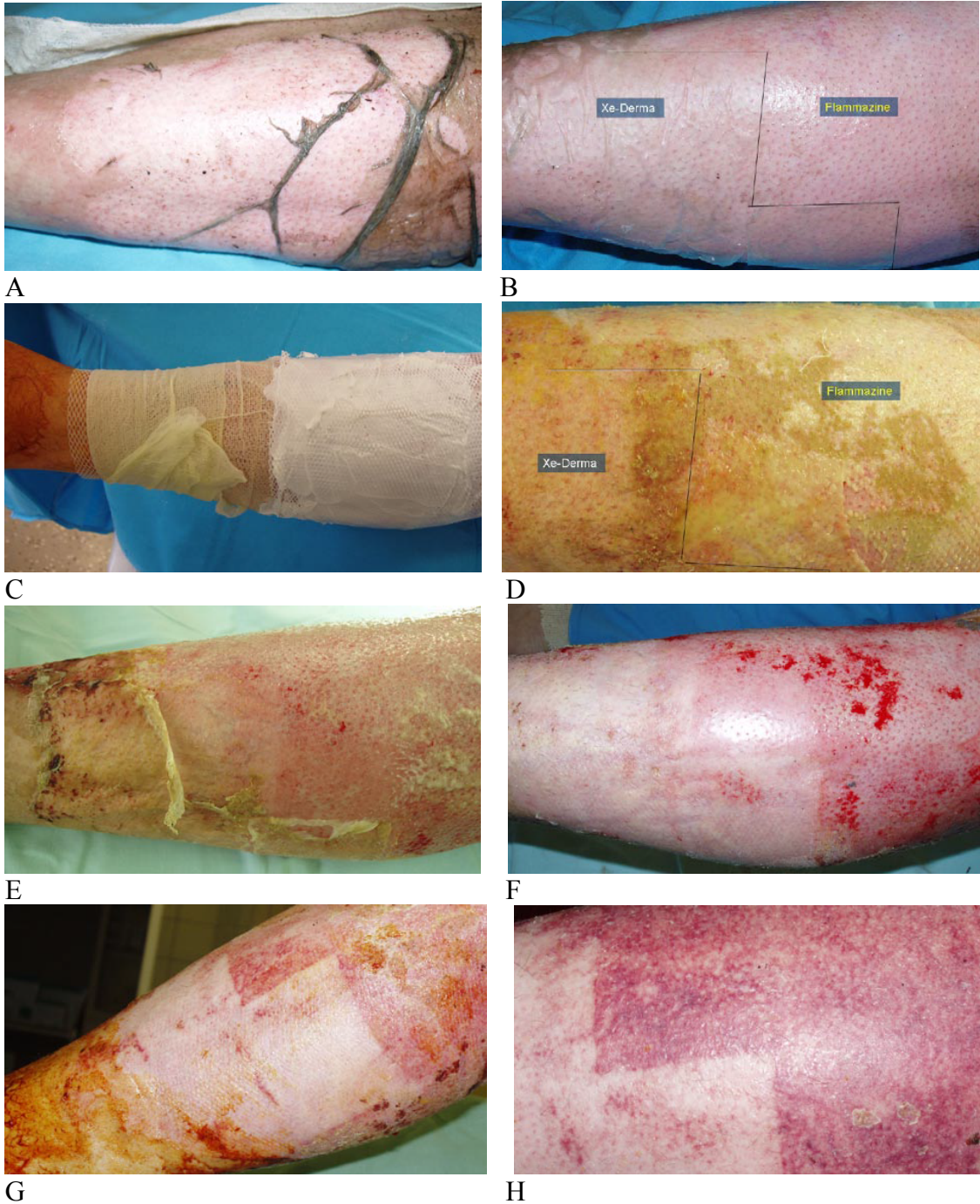
Obr. 11. Srovnání hojivého účinku XD a Askina Derm na povrchní opaření II. stupně
A) Příjem: Dvouleté dítě opařené horkou vodou na 13% povrchu těla, II. stupeň. **B)** Kraniální část opařené plochy je kryta syntetickým krytem Askina Derm **C)** Kaudální část plochy je kryta XD. **D)** Jako svrchní krytí rozdělených ploch je použit tyl a obklad s borovou vodou **E) 48 hodin po příjmu:** XD v kaudální části plochy pevně lpí ke spodině rány, není nutná její reaplikace. Kraniální část plochy se syntetickým krytem se komplikuje akumulací sekretu rány pod krytem. Plocha je omyta a kryt je reaplikován. **F) 7. den od příjmu:** Oba kryty pevně lpí k ráně, dochází ke spontánní epitelizaci. **G) 9. den od příjmu:** Obě části plochy jsou kryty epitelem, dítě je propuštěno do domácí péče.

5.2.2 Aplikace XD na hluboké dermální popálení

Hluboké dermální postižení - popálení II.B stupně patří z hlediska hojení k nejkomplicovanějšímu druhu popáleninové rány. Perfúze postižené tkáně je značně limitovaná, dochází k rozsáhlému intersticiálnímu edému, rána je náchylnější k infekci a sekundárnímu prohloubení. Antibakteriální krém Flammazine (SSD) je stále na KPM FNKV standardní metodou léčby.

48 letý pacient přijat na popáleninové centrum s popálením na 29% povrchu těla II.B - III. stupně po explozi acetonových par při svařování. Plocha lokalizovaná na levém bérce při primárním ošetření ohodnocena jako hluboké dermální popálení II. stupně (II.B). Rána při příjmu omyta roztokem povidonu jodu (Betadine) a po snesení zbytků nekrotické epidermis rozdělena na dvě identické části. Na proximální část aplikován antibakteriální krém Flammazine. Plocha distálně byla kryta XD (Obr. 12). Jako svrchní krytí na XD byl použit mastný tyl a obklad s roztokem Furantoinu. Pacient pravidelně převazován na operačním sále. Xe-Derma pevně lpěla k spodině rány, nebyla nutná její re aplikace, jen výměna svrchního antiseptického krytí. Antibakteriální krém byl v pravidelných intervalech po 24 - 48 hodinách vyměňován. Po devíti dnech došlo u distální plochy kryté Xe-Dermou k úplnému spontánnímu zhojení. Proximální část plochy sice prokazovala známky spontánní epitelizace, ale k definitivnímu souvislému překrytí plochy došlo až 18. poúrazový den. Antibakteriální krém byl ve vrstvě 5 mm aplikován celkem 8x, XD pouze jednou.

XD je vhodná alternativa k SSD léčbě hlubokého dermálního postižení. Svými unikátními biologickými vlastnostmi vytváří optimální prostředí k migraci a proliferaci keratinocytů v ráně. Ve srovnání se standardním krytem používaným k léčbě popálenin II.B st. – silversulfadiazinem - nebylo nutno XD měnit. Doba hojení byla signifikantně kratší. Plocha po zahojení vykazovala dobrou mechanickou odolnost a ve srovnání s plochou léčenou antibakteriálním krémem i lepší kosmetický vzhled (Obr. 12H).



Obr. 12. Srovnání hojivého účinku XD a Flammazinu u hlubokého dermálního popálení.

A) Příjem na KPM: Plocha na levém bérce hodnocena při příjmu jako hluboké dermální popálení - II.B. **B)** Rozdělení plochy: distální část - plocha kryta XD, proximální část - plocha určená pro ošetření antibakteriálním krémem. **C)** Na plochu krytou XD jako svrchní kryt použit tyl a obklad s Furantoinem, plocha proximální kryta vrstvou antibakteriálního krému Flammazine. **D)** Hojení po 5 dnech: Xe-Derma pevně lpí ke spodině, není ji nutné měnit, na proximální ploše pravidelně vyměňován antibakteriální krém. **E)** Hojení po 9 dnech: Plocha krytá XD zhojena, XD se spontánně odlučuje od spodiny rány. Plocha krytá Flammazinem dosud nezhojena, ale se známkami epitelizace. **F)** Hojení po 9 dnech: Po snesení Xe-Dermy plocha kryta křehkým epitelem, plocha po aplikaci Flammazinu dosud nezhojena. **G)** 18. den po úrazu: Obě části původní plochy zhojeny spontánní epitelizací. Jasně viditelné okraje v místech, kde byla aplikována XD. **H)** Propuštění z nemocnice 35. den od úrazu - detail kosmetického výsledku v místě původního kontaktu XD a Flammazinu.

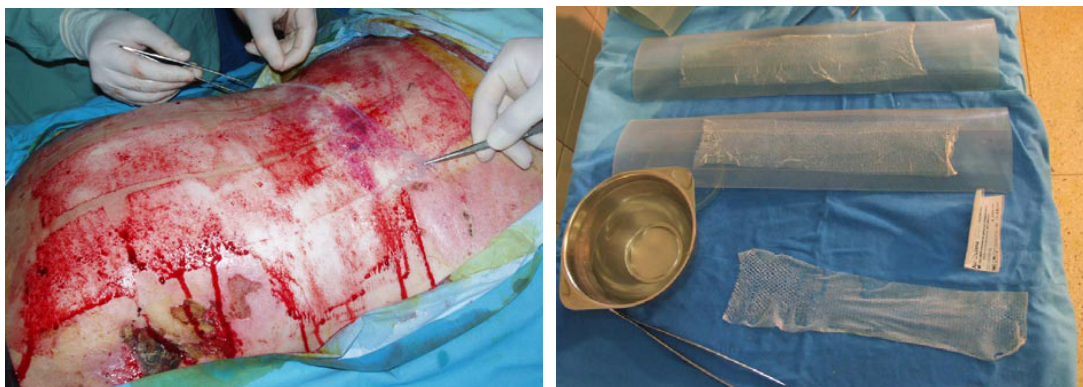
5.2.3 Aplikace XD na odběrovou plochu

Jednoznačně pozitivní vliv acelulární prasečí dermis na proliferaci a migraci keratinocytů jsme v praxi využili v léčbě komplikovaných ran jako je odběrová plocha u polymorbidní gerontologické pacientky s rozsáhlým termickým traumatem.

78 letá pacientka byla přijata s rozsáhlým opařením II. stupně na 30% povrchu těla na dolních končetinách. Pacientka se léčila s ischemickou chorobou srdeční, hypertenzí, diabetem II. typu, hypercholesterolémií, Parkinsonovou nemocí a artrózou nosných kloubů. Chirurgický postup byl zvolen vzhledem k polymorbiditě jako konzervativní. Na plochy byly aplikovány syntetické kryty a antibakteriální krémy. Po 17 dnech od příjmu byly plochy v rozsahu 18% povrchu zhojeny, 12% ploch však bylo prohloubeno na III. st. s nutností chemické nekrektomie a následné autotransplantace. Jako odběrová plocha zvolena vzhledem k lokalizaci a rozsahu dorsální část trupu. Z důvodu očekávaného komplikovaného hojení odběrů byla na odběrovou plochu použita meshovaná XD, pod kterou došlo během tří týdnů k bezproblémovému zhojení rozsáhlé ranné plochy po odběru dermoepidermálního štěpu na zádech (Obr. 13).

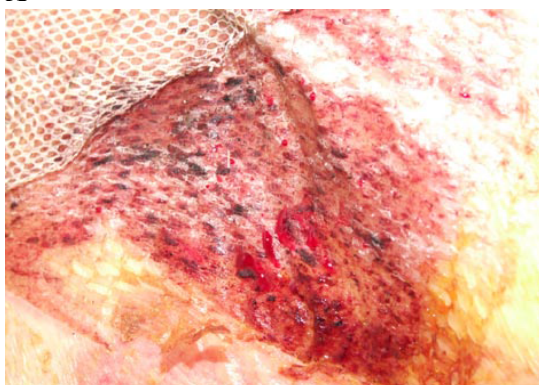
Uspokojivé a rychlé hojení místa odběru dermoepidermálního štěpu je základním předpokladem zdárné kožní transplantace. Odběrové místo je rána definovaná rozsahem a hloubkou, primárně bez přítomnosti infektu. Ošetřování odběrové plochy však celosvětově není jednotné, neexistuje jednoznačná preference použitého materiálu a každé pracoviště má svůj vlastní protokol. XD má na hojení odběrových ploch několik prokazatelných výhod, kterých využíváme zvláště u potenciálně rizikových skupin pacientů jako jsou např. gerontologičtí pacienti, diabetici, pacienti léčení kortikoidy aj.

Kožní adnexa u pacientů ve vysokém věku neobsahují dostatečné množství zárodečných keratinocytů nutných k obnově epitelu a odběrové plochy mají tendenci k sekundární infekci. Hojení je dlouhodobé a komplikované, zvláště je-li epitelizační potence inhibována přítomným diabetem. Uzávěr rány Xe-Dermou kterou jsme z důvodu expanze a prevence hematomů meshovali, nám umožnilo bezproblémové a rychlé zhojení rozsáhlé odběrové plochy (Obr. 13E).



A

B



C

D



E

Obr. 13. Hojení odběrové plochy síťovanou XD. **A)** Aplikace: Rozsáhlá ranná plocha po odběru středně silných dermoepidermálních štěpů ze zad (0-2 mm). Při krytí použita meshovaná XD. **B)** Meshování: XD má po namočení podobné biomechanické vlastnosti jako je lidská kůže a dá se standardně síťovat. Meshování zabrání vzniku hematomu a umožní pokrytí větší plochy. XD síťována v poměru 1:1,5; jako sekundární kryt použít mastný tyl a obklad s 3% borovou vodou. **C)** 7. den po aplikaci: XD pevně lpí ke spodině rány, bez hematomů, sekrece. **D)** 14. den po aplikaci: Plocha se hojí spontánní epitelizací, XD se spontánně odlučuje od lůžka rány **E)** Propuštění: Odběrová plocha v celém rozsahu zhojena do tří týdnů od odběru.

5.3 Srovnání efektivity hojení povrchních opaření u dětí po aplikaci XD a hydrokoloidu

Publikováno v Burns [Zajíček et al., 2011]

Povrchní opaření jsou nejčastějším typem úrazu, se kterým se v dětské populaci setkáváme. Ačkoli máme jasně definovanou léčebnou strategii pro popáleniny I. a III. stupně, v případě popálenin II. stupně je terapie nejasná a kontroverzní.

Konverze povrchní ztráty kožního krytu v hluboké dermální poranění může nastat z mnoha důvodů. Z lokálních faktorů se jedná o vyschnutí plochy, lokální infekci, mechanické či chemické iritace, vytvoření exudátu, lokální edém nebo místní poruchu prokrvení (kompartment syndrom). Z celkových faktorů prohloubení ovlivňuje komorbidita, např. sepse, diabetes, ateroskleróza. Efektivní, adekvátní a rychlé ošetření popálené plochy a její dočasný uzávěr syntetickým či biologickým krytem snižuje riziko konverze a zvyšuje pravděpodobnost spontánního zhojení. V následující retrospektivní srovnávací studii porovnááme efektivitu syntetického hydrokoloidního krytu Askina s dočasným biologickým krytem XD v léčbě opaření II. st. u dětí.

5.3.1 Kritéria zařazení do studie

Do studie byly zařazené děti, které utrpěly opaření II. st. a byly léčeny v období od října 2007 do července 2009 na KPM FNKV v Praze. Věk: 5 měsíců až 7 let; mechanismus úrazu: opaření horkou vodou; hloubka postižení: opaření II. stupně; rozsah postižení: 1% - 35% povrchu těla (BSA).

5.3.2 Charakteristika souboru pacientů

Kritéria zařazení do studie splnilo celkem 86 pacientů, kteří byli rozděleni do dvou stejných skupin. Skupinu pacientů, kde byl k dočasnému uzávěru ploch použit kryt XD, tvořilo 43 dětí (15 děvčat a 28 chlapců). Skupina dětí, u kterých byl aplikován kryt Askina byla také 43členná se stejným rozložením pohlaví (15 děvčat a 28 chlapců).

5.3.3 Charakteristika materiálů

Xe-Derma je vysušená acelulární prasečí dermis, která byla vyvinuta z dermopidermálních prasečích štěpů. Po hydrataci XD získává biomechanické vlastnosti podobné lidské kůži, a proto může být použita jako dočasná kožní náhrada. Od roku 2007 byla XD použita v celé řadě indikací v léčbě akutních i chronických ran.

Askina je ultratenký hydrogelový kryt s vysokou absorpční aktivitou a vynikající adhezivitou. Askina se skládá ze dvou vrstev: vnitřní hydrogelové vrstvy s vysokou

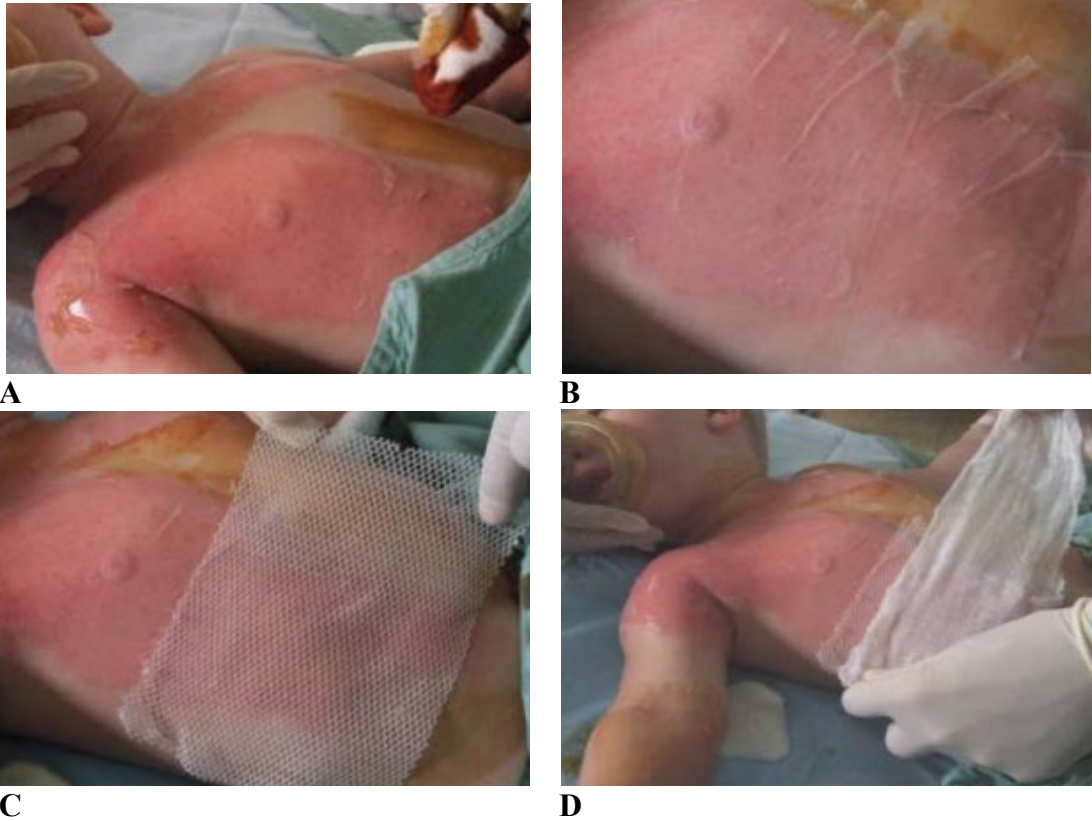
absorbční kapacitou a zevní semipermeabilní vrstvy. Indikací pro použití Askiny jsou popáleniny a chronické rány.

5.3.4 Léčebný protokol

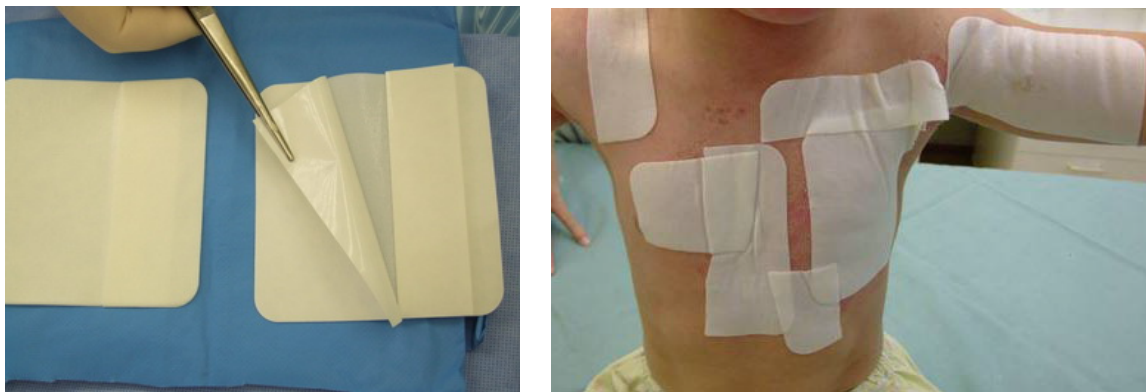
Každá rána byla mechanicky očištěna od zbytků odloučené epidermis, okolí bylo dezinfikováno roztokem povidon jodu a z rány byl odebrán stěr na mikrobiologické vyšetření.

Léčebný protokol XD (Obr. 14): XD byla hydratována v sterilní vodě po dobu 2-5 minut a aplikována na plochu. Jako povrchní kryt byl použit mastný tyl, další vrstvu tvořil antiseptický obklad s borovou vodou a jako nejsvrchnější vrstva byl použit mulový čtverec, fixovaný mulovým obinadlem. Povrchní čtverce jsme měnili v intervalu 2-3 dnů od přiložení. Pokud XD pevně lpěla ke spodině, nebylo nutné ji měnit a byl vyměněn jen povrchní krycí materiál. V okamžiku, kdy se začala XD spontánně odlučovat od spodiny, docházelo ke spontánní epitelizaci a XD byla jemně snesena z plochy, která byla z 95% kryta novým epitelem. Pokud XD nelpěla ke spodině a došlo k akumulaci tekutiny pod krytem, byl odebrán vzorek na mikrobiologické vyšetření a plocha byla kryta po snesení XD jiným přípravkem s antibakteriální složkou stříbra (nejčastěji SSD).

Léčebný protokol Askina (Obr. 15): Askina byla přiložena na očištěnou plochu hydrogelem k ráně a jako povrchní kryt byl použit suchý mulový čtverec, fixovaný mulovým obinadlem. Pokud Askina lpěla k ráně, nebylo nutno ji měnit a proběhla pouze výměna povrchního čtverce. Byla-li Askina prosáklá a nelpěla ke spodině, která se neprohloubila, byla Askina reaplikována. V případě, že spodina rány byla prohloubena (konvertována) na hluboký II. stupeň, byla Askina vyměněna za jiný kryt.



Obr. 14. Léčebný protokol XD. A) Okolí rány omyto povidon jodem. B) Aplikována XD. C) Na XD přiložen mastný tyl. D) Jako antiseptické krytí použit obklad s 3% roztokem kyseliny borité.



Obr. 15. Léčebný protokol Askina. A) Z krytu je odstraněna povrchová fólie (foto převzato z firemní dokumentace firmy B. Braun). B) Kryt je aplikován na plochu s mírným přesahem. Jako povrchová vrstva je použit suchý mul.

5.3.5 Data

Ve studii byla u obou skupin srovnávána následující data: Procento povrchu těla kryté syntetickým či biologickým materiálem, počet dětí, u kterých došlo ke konverzi z povrchní na hlubokou opařeninu v celém rozsahu, procento konvertované plochy z celkového rozsahu, doba zhojení, přítomnost infekčních komplikací, počet pacientů u kterých byla nutná reaplikace a počet cm² nutných k zahojení 1% povrchu těla

(parametr počtu re aplikací). Doba zhojení byla definována jako 95% epitelizace plochy posouzená dvěma specialisty. Jedno procento povrchu těla bylo v této věkové skupině dětí stanoveno na 57 cm² plochy.

5.3.6 Statistické zhodnocení

Pro statistickou analýzu byl použit program Statistica 8 (Statsoft). Spojitá data byla testována na normalitu rozložení pomocí Shapiro-Wilk testu. Většina dat byla nenormálně rozložena ($p \leq 0.05$), a proto jsou udána ve formátu: medián (dolní, horní kvartil) např. 25(15,39).

5.3.7 Výsledky srovnání hojení

Věk, rozsah postižení a rozsah plochy kryté syntetickým či biologickým krytem

V obou skupinách nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi věkem, pohlavím dětí, rozsahem kryté plochy. Ve skupině dětí s krytem XD bylo signifikantně vyšší procento popálené plochy (Tab. 2).

Tab. 2 *Věk, rozsah postižení a rozsah plochy kryté biologickým či syntetickým krytem*

	Xe-Derma (n=43)	Askina (n=43)	p-value
Věk (měsíce)	19 (15,26) ^a	21 (15,29)	p 0.63
Rozsah (% BSA)	10 (6,13)	7 (4,10)	p 0.028 ^b
BSA krytý testovaným materiálem (%)	8 (5,11)	6 (4,10)	p 0.16

^a čísla před závorkou značí medián, čísla v závorce horní a dolní kvartil

^b statisticky signifikantní hodnota - % popálení je signifikantně větší u pacientů krytých XD BSA – body surface area (celkový povrch těla)

Doba epitelizace

Nebyl shledán statisticky signifikantní rozdíl v době epitelizace mezi skupinou XD a Askina (Tab. 3).

Tab. 3 Srovnání hojení po aplikaci XD nebo Askiny

	Xe-Derma	Askina	p-value
Doba hojení (dny)	8(5,10)	7(3,10)	p 0.147
Konverze ve 100 % (počet pacientů)	1	4	p 0.18
Částečná konverze (% konvertované plochy)	0 (0,7)	5(0,30)	p 0.13
Infekce (počet pacientů)	6	10	p 0.2
Počet výměn krytu	0	17	p < 0.01^b
Cm ² krytu na 1% BSA	57(57,57)	57(57,114)	p 0.002^b

^aČísla v závorkách značí horní a dolní kvartil

^bStatisticky signifikantní hodnota

Konverze ve 100 %: konverze (prohloubení) celé kryté plochy

Částečná konverze: konverze méně než 100% kryté plochy

Popis hojení

XD: U pacientů, u kterých byl použit kryt XD, nebylo nutné kryt měnit až do doby, kdy začala plocha spontánně epitelizovat (6. – 15. den od aplikace) (Obr. 16). V případě, že došlo ke konverzi plochy (obvykle při lokální infekci), byla konvertovaná plocha kryta jiným krytem (nejčastěji SSD) a v případě dalšího prohloubení na III. st. anebo v případě protrahovaného hojení nad 14 dnů byla plocha následně řešena excizí či exkochleací a autotransplantací.

Askina: U dětí ve skupině Askina v 60% případů nebylo nutné Askinu měnit. Ve 40% (což odpovídá 17 pacientům ze 43) byla nutná re aplikace krytu, což bylo způsobeno překročením absorpční kapacity hydrogelu množstvím exudátu (Obr. 17, 18). Re aplikace byla nutná v 10 případech 2x, v 6 případech 3x a v jednom případě 4x. Hojení probíhalo v intervalu 6 - 15 dnů, bez signifikantního rozdílu doby hojení v porovnání s krytem XD. V případě konverze plochy byl další postup stejný jako v případě skupiny XD.



A



B

Obr. 16. Hojení plochy po aplikaci XD. A) Není-li v ráně přítomna infekce, dojde k pevné vazbě mezi kolagenem XD a lůžkem rány, XD pevně lpí ke spodině, rána spontánně epitelizuje. B) V intervalu přibližně do deseti dnů od úrazu dochází k spontánnímu odloučení zbytků suché Xe-Dermy od lůžka rány, které je kryto epitelem.



A



B

Obr. 17. Hojení plochy po aplikaci Askiny. A) V případě, že je překročena absorpční kapacita hydroloidního krytu dochází k akumulaci sekretu z rány pod Askinou. B) Je-li pod krytem nahromaděn sekret, musí se Askina na plochu reaplikovat. Reaplikace nemusí být spojena s konverzí povrchní rány na ránu hlubší.

Konverze ve 100% kryté plochy

Ve skupině dětí s XD došlo ke konverzi plochy ve 100% rozsahu jen u jednoho dítěte s popálenou plochou na 1% povrchu těla (příčinou konverze byla infekce). Ve skupině Askina došlo ke konverzi u 4 dětí. Rozdíl mezi skupinami nebyl statisticky významný.

Částečná konverze (menší než 100% kryté plochy)

Ve skupině Xe-Derma byla plocha částečně konvertována u 16 dětí, ve skupině Askina se jednalo o 18 případů. Rozdíl nenabyl statistické významnosti.

Infekce

Během léčby jsme v případě dětí s krytem XD zaznamenali infekci plochy v 6 případech, u skupiny Askina v 10 případech. Nejčastějším patogenem skupiny XD byl stafylokokus aureus ve dvou případech, streptokokus agalactiae v jednom případě a acinetobacter baumannii také v jednom případě. Ve skupině dětí s Askinou byl nejčastější patogen stafylokokus aureus (5 případů), následovala stenotrophomonas mantophilia (1 případ), enterokokus fecalis (1 případ), klebsiella oxytoca (2 případy), proteus mirabilis (1 případ). Mezi skupinami jsme nenašli statisticky významný rozdíl.



Obr. 18. Akumulace tekutiny pod Xe-Dermou - infekce rány stafylokokus aureus

Počet re aplikací a počet cm² krytu nutných k zahojení 1% plochy

Jediným signifikantním rozdílem v obou skupinách byl počet výměn krytu - počet re aplikací. V případě Askina skupiny byla nutná re aplikace v 17 případech, u XD nebyla re aplikace nutná. V případě krytu Askina byla re aplikace nutná z důvodu akumulace sekretu rány pod krytem při překročení absorpční kapacity krytu.

Signifikantně zvýšen byl také počet cm² Askiny nutných na zahojení 1% plochy BSA (57 cm²) v porovnání se skupinou XD. Tento parametr odráží nutnost několikanásobné výměny krytu.

5.4 Hojení široce meshovaného autotransplantátu a odběrové plochy pomocí kombinace XD a autologních kožních buněk.

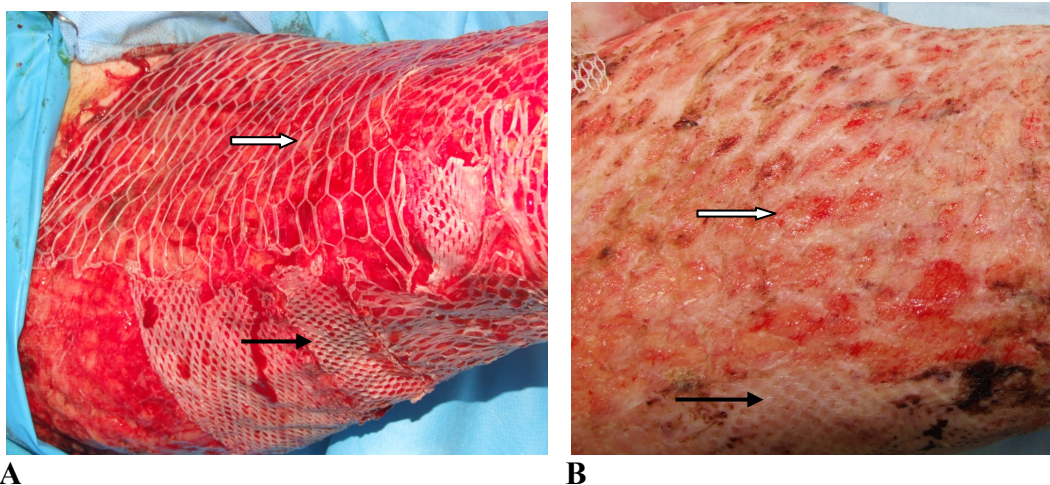
Částečně publikováno v Hojení ran [Zajíček et al., 2012]

Metody kožní expanze a využití sendvičových metod

U rozsáhle popálených pacientů je základem chirurgického přístupu v léčbě co nejrychlejší uzávěr ranné plochy. Čím dříve dojde k uzávěru popálených míst

definitivním krytem - autotransplantátem, tím je prognóza přežití pacienta příznivější, redukuje se extrémní hypermetabolický stav, funkční i estetické následky úrazu se signifikantně snižují, klesají finanční náklady na léčbu. Převyšuje-li kožní ztráta 60% povrchu těla pacienta, je uzávěr defektu vzhledem k nedostatečnému rozsahu odběrových míst značně komplikován.

I přes pokroky v moderní léčbě a tkáňovém inženýrství je stále nutno k plnohodnotnému uzávěru „ztraceného“ kožního krytu použít pacientovu autologní kožní tkáň. Při aplikaci autoštěpů na lůžko rány používáme široké síťování (mesh-grafting) v poměru 1 : 3 až 1 : 6, abychom štěpem pokryli co největší rannou plochu. Epidermální buňky z okrajů můstků kožního transplantátu musí pak svým růstem, proliferací a migrací zaplnit mezery (oka, okénka) autotransplantátu. Užití vysokých poměrů expanze (více než 1 : 3) nám sice umožní pokrytí větší plochy, ale za cenu nárůstu komplikací při hojení okének mezi můstky štěpu. Buňky musí překonat větší vzdálenost k vyplnění defektu, hojení se tak prodlužuje za cenu vyššího rizika infekce a tvorby nepříznivé granulační tkáně uprostřed okének. Výsledný kožní kryt je nekvalitní, má tendenci k spontánnímu rozpadu, vytváření reziduálních granulačních plošek, které mohou vést k sekundární infekci (Obr. 19). Dlouhodobé hojení takto komplikovaných ran vede sekundárně k hypertrofickému hojení a rozvoji jizevnatých kontraktur.



Obr. 19. Meshování v poměru 1:6 – nevýhody. A) Použití široce expandovaného štěpu 1 : 6 (bílá šipka), dolní část rány kryta meshem v poměru 1:2 (černá šipka). B) Stejná rána tři týdny po transplantaci. Bílá šipka ukazuje na dosud nezhojená fragilní místa mezi můstky u široce meshovaného štěpu, černá šipka ukazuje na zhojená místa v místech meshe 1 : 1,5.

U kriticky popálených pacientů s nedostatečným rozsahem odběrových ploch je nutné odebírat kožní transplantáty opakovaně. I v případech použití moderních dermálních náhrad jako je např. Integra musíme epidermální vrstvu nahradit tenkým autologním štěpem. Odběrové místo tenkého dermoepidermálního štěpu síly 0,1-0,15 mm se hojí standardně v intervalu 10-14 dnů. U opakovaných odběrů jsme nuceni čekat několik dalších týdnů na zpevnění krytu, které umožní další odběr. Při několikanásobných odběrech je znovuvytvořená tkáň velice fragilní, má zvýšenou tendenci k spontánnímu rozpadu a opakování odběru je spojeno s vysokým rizikem infekčních komplikací. Velmi obtížné je hojení v místech s tenkou kůží a minimem kožních adnex jako je např. dorsum nohy.

Naše strategie uzávěru extenzivních poranění je postavena na využití umělých kožních náhrad, rychlém a efektivním hojení odběrových ploch a co možná největší expanzi kožních transplantátů s využitím sendvičových metod.

Sendvičové metody jsou založeny na kombinaci několika vrstev biologických krytů, které se synergicky doplňují a urychlují hojení [Herndon et al., 2007] V naší praxi jsme již v minulosti použili v kombinacích s autotransplantáty kultivované lidské keratinocyty, nativní xenotransplantáty i čerstvé alotransplantáty.

Cílem této části předkládané dizertační práce bylo hojení rozsáhle popálených pacientů pomocí kombinace autologních kožních buněk s acelulární prasečí dermis. Tuto metodu jsme použili:

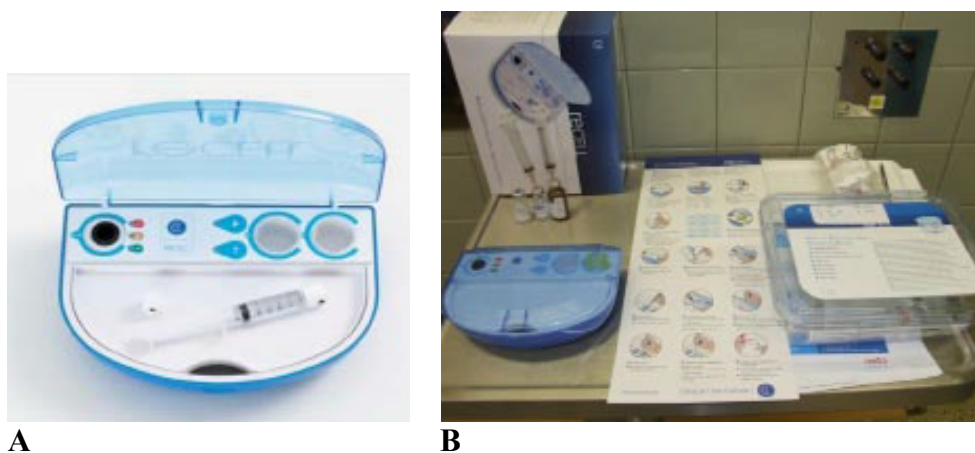
- a) pro stimulaci epidermální regenerace mezi můstky široce expandovaného dermoepidermálního štěpu. Byla použita sendvičová technika tří různých biologických krytů: široce expandovaného autotransplantátu, suspenze autologních kožních buněk a acelulární prasečí dermis.
- b) pro hojení opakovaně odebírané odběrové plochy nepříznivé lokalizace u kriticky popáleného pacienta, při které byla použita kombinace autologních buněk s acelulární prasečí dermis

Kultivované keratinocyty se sice využívají k hojení popálenin již od r. 1981, avšak kultivace trvá 2-3 týdny a získaná epidermis je velmi křehká a nestabilní. V poslední době se objevily nové možnosti izolace a aplikace kožních buněk přímo v průběhu operace. ReCell[®] (Avita Medical, UK) je komerční kit pro rychlou (30-45 min) izolaci autologních buněk z malého dermoepidermálního štěpu kůže a jejich aplikaci na rannou plochu. Podobným způsobem je možné enzymaticky rozvolnit buňky v laboratorních podmínkách standardní trypsinizací. Získaná suspenze buněk je naspřejována či

nakapána na ránu. Jako doplnění buněčné součásti biologického krytu jsme v naší modifikaci metody použili pro krytí aplikované buněčné suspenze bezbuněčnou xenodermis XD, která má sama o sobě hojivé a stimulační účinky na rány.

Odběr kůže a izolace keratinocytů

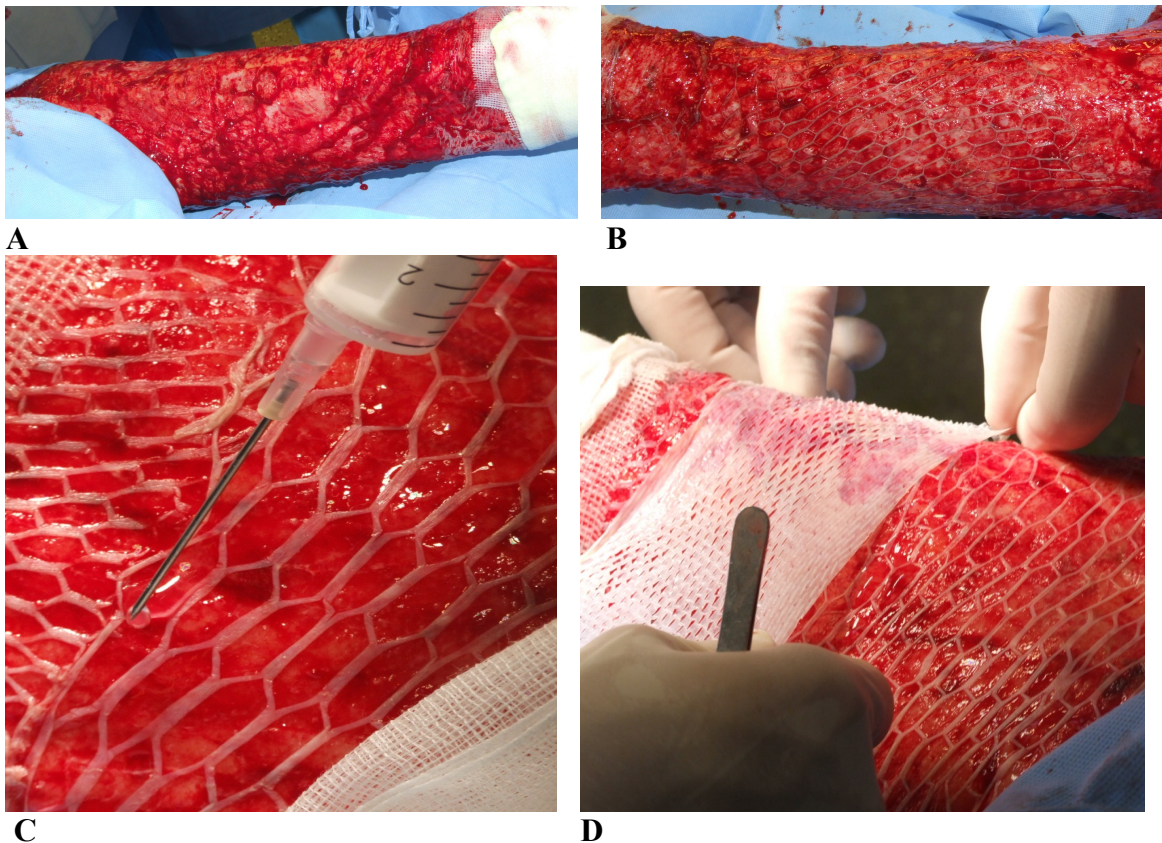
Na začátku operace byl pacientovi s rozsáhlými popáleninami odebrán tenký dermoepidermální štěp kůže (síla 0,15-0,30 mm; velikost 2-4 cm²). Kůže byla vložena do trypsinu v ReCell[®] systému (Obr. 20) v uzavřené zkumavce a inkubována 30-40 min ve 37°C. Po vyjmutí z trypsinu byla kůže opláchnuta v SCL (sodium compound lactate, součást kitu ReCell[®]) a poté oddělena epidermis od dermis, čímž se uvolnily bazální buňky. Rozvolnění kůže bylo dokončeno seškrabáním zbytků buněk z kůže nebo roztřepáním v minitřepačce (vortexu). Výtěžek buněk byl mezi 2,2 - 2,7x10⁶ buněk z 1 cm² kůže. Buňky získané z 1 cm² kůže byly aplikovány na 80 cm² ranné plochy. Doba potřebné přípravy nepřesahovala 45 min od odběru vzorku.



Obr. 20. ReCell systém. A) Systém jamek se zahříváním, enzymy, roztoky. Do 1. jamky s trypsinem se vloží malý vzorek kůže na 30-40 min při 37°C. Oddělíme epidermis od dermis (rozvolnění bazálních buněk), sneseme z dermis zbytky buněk. Suspenzi zfiltrujeme přes sítko, naředíme v SCL (sodium lactate solution) a nasprejujeme či nakapeme na ránu. B) Hlavní výhodou je příprava suspenze autologních buněk v průběhu operace na operačním sále.

Sendvičové krytí široce síťovaného autotransplantátu

Pacientovi byl odebrán dermoepidermální kožní štěp o síle 0,2–0,3 mm a síťován 1:3 (8 pacientů) nebo 1:6 (6 pacientů). Na jednu část ranné plochy byla aplikována buněčná suspenze nakapáním přibližně 3x10⁴ buněk/cm² do ok autotransplantátu (Obr. 21) a plocha kryta XD (Obr. 22) meshovanou v poměru 1:1,5 (skupina buňky+XD). Druhá část plochy byla kryta pouze úzce meshovanou XD (skupina XD). Třetí část ranné plochy byla kryta standardním postupem - mastným tylem Grassolind[®].



Obr. 21. Krytí široce meshovaného autotransplantátu XD a buňkami. A) lůžko rány po tangenciální nekrektomii. B) Rána je kryta dermoepidermálním autoštěpem meshovaným v poměru 1 : 6. C) Aplikace suspenze buněk do ok široce síťovaného autotransplantátu. Na snímku je patrný rozdíl v poměru expanze 1:3 (levá strana) a 1:6 (pravá strana). D) XD (mesh 1:1,5) přiložená na autotransplantát (mesh 1:6).

Výsledky hojení

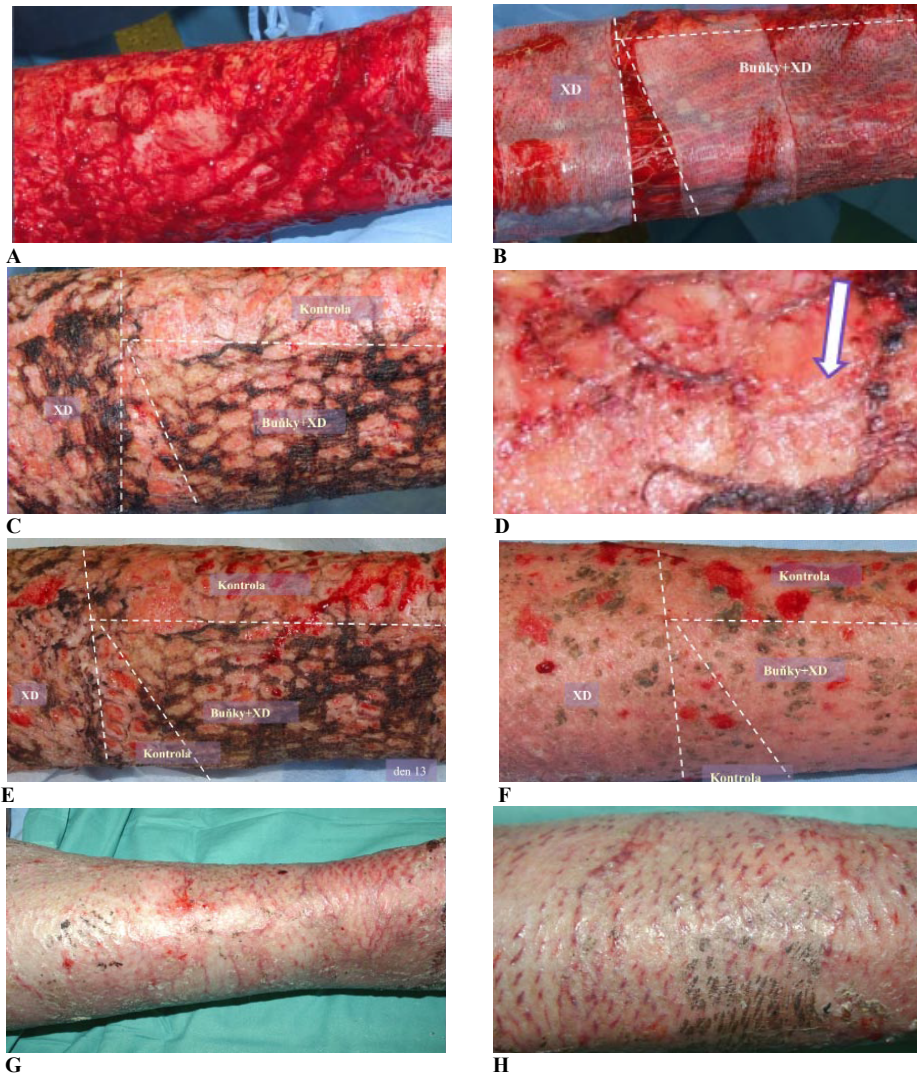
Hojení autoštěpu expanze 1 : 3 Rány kryté autoštěpem síťovaným 1 : 3 se pod všemi testovanými kryty (*buňky+XD*, *XD*, *kontrola*) zahojily do 9 dnů. Relativně malá expanze nedovolovala exaktnější diferenciaci v hojení pod všemi testovanými kryty. Hojení ploch krytých XD s buňkami i bez buněk bylo dle orientačního vyhodnocení rychlejší než hojení kontroly.

Hojení autoštěpu expanze 1 : 6 Signifikantní rozdíly bylo možné sledovat až u vyšší expanze 1 : 6. Z celkem 6 ošetřených pacientů byla u jednoho pacienta plocha infikovaná (*staf. aureus*) a došlo ke ztrátě štěpů v celém rozsahu plochy, jeden pacient zemřel. V tabulce č. 4 jsou uvedeny výsledky transplantace u čtyř pacientů pod jednotlivými kryty. Nejrychlejší reepitelizace byla makroskopicky pozorována u skupiny, kde do ok štěpu byla aplikována buněčná suspenze a kryta XD (skupina *buňky + XD*)

(Obr. 22). Delší doba epitelizace byla u skupiny, kde autotransplantát byl kryt pouze XD (skupina XD). Obě skupiny kryté XD vykazovaly tvorbu pevné epidermis. U skupiny kryté Grassolindem® (kontrola) byla epitelizace pomalá, mezery mezi můstky štěpu se zcela nezhojily a kvalita nově vytvořeného epidermálního krytu byla nízká. Nově vzniklá epidermis byla křehká, snadno se mechanicky lamelovitě odlučovala od lůžka rány, sekundárně se místy infikovala (Obr. 22).

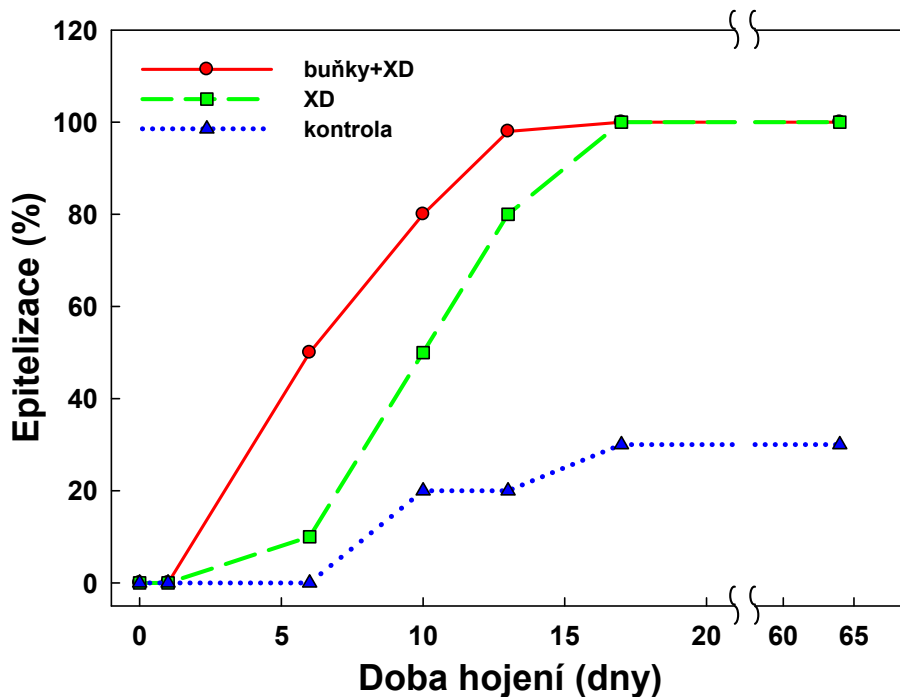
Tab. 4. Epitelizace široce síťovaného transplantátu 1:6 pod jednotlivými kryty (buňky+XD, XD, kontrola Grassolind®), popáleniny III. stupně

pac.	pohlaví	věk	%BSA	úraz	operace	kryt	% zhoj. plochy/den zhojení	kvalita epidermis
1.	muž	42	56	výbuch	19. den	buňky+XD XD kontrola	100%/ 9. den 100%/12. den 50%/20. den	pevná pevná křehká, rozpadá se
2.	žena	47	45	hoření	24.den	buňky+XD XD kontrola	100%/12. den 100%/14. den 40%/20. den	pevná pevná křehká, rozpadá se
3.	žena	50	30	hoření	20.den	buňky+XD XD kontrola	100%/11. den 100%/13. den 40%/20. den	pevná pevná křehká, rozpadá se
4.	muž	61	61	výbuch	22.den	buňky+XD XD kontrola	100%/14. den 100%/17. den 30% /20. den	pevná pevná křehká, rozpadá se



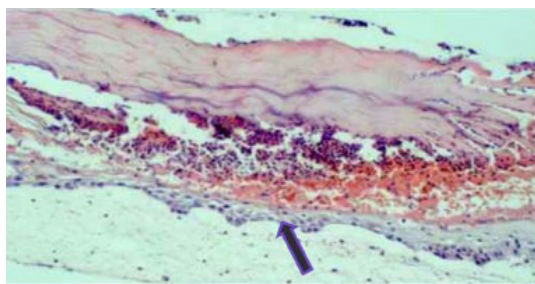
Obr. 22. Hojení široce síťovaného autotransplantátu na popálenině III. st.

Pacient 61 let byl popálen při výbuchu propanbutanové láhve, popáleniny II.- III. stupně na 61 % povrchu těla. Stav komplikován následnou infekcí, léčba antibiotiky. Tři týdny po úrazu provedena autotransplantace plochy na stehnu. Po snesení granulační tkáně rána kryta středně silným štěpem síťovaným 1:6 na 3 % tělesného povrchu. **A)** Den 0 - lůžko rány po epifasciální nekrektomii připraveno k autotransplantaci. **B)** Den 0 - autotransplantace: Plocha rozdělena nad kolenem přibližně na třetiny, v pravé části aplikovány rozvolněné buňky ve formě suspenze, kryto dvěma pláty úzce meshované XD (buňky+XD); vlevo krytí pouze meshovanou XD; zbytek plochy kryt pouze Grassolindem® (K - kontrola) a obklady s Furantoinem. Jako povrchní kryt celé plochy byl použit mastný tyl Grassolind®, převaz gázou. **C)** Den 3: Plocha krytá Grassolindem®. Při odklopení tylu je vidět mesh 1:6 na kontrolní ploše. Rána čistá, bez známek infekce. **D)** Den 10: V místě kde byly aplikovány buňky+XD je patrný celistvější kryt, ale i v místech, kde byla aplikována pouze XD, je patrná epitelizace výraznější než v kontrolní oblasti s Grassolindem®. **E)** Den 13: celkový pohled na ránu s jasně viditelnou hranicí hojení všech tří ploch. Místo, kde byly buňky (buňky+XD), je prakticky na 98 % zhojeno. Místo, kde byla XD (XD) je zhojeno z 80 %. Kontrolní plocha krytá Grassolindem® (K) je nezhojena, četné zbytkové plochy v místě meshe. **F)** Den 64: Kvalitně zhojená plocha v případech, kde byla použita XD s buňkami i XD bez buněk; klinicky není patrný rozdíl. Jizevnatá tkáň je relativně pevná, s minimem zbytkových ploch tam, kde nebylo dokonalé zakrytí XD. Kontrolní oblast, kde byl mesh 1:6 kryt pouze Grassolindem® (K), je fragilní, s dosud nezhojenými povrchními defekty, s tendencí k zatrhávání a rizikem sekundární infekce plochy. **G)** 78. den po úrazu – plochy zhojeny. **H)** 78. den po úrazu - detail plochy. Makroskopicky není znatelný rozdíl mezi místy s rozdílnými kryty,



Graf 1. Průběh epitelizace široce síťovaného transplantátu (1:6) pod sledovanými kryty u pacienta č. 4 s popáleninami II.-III. st. na 61% povrchu těla. Všechny 3 kryty byly aplikovány na plochu s popáleninami III. st. po nekrektomii.

Histologie hojení krytu XD+buňky je zobrazena na Obr. 23



Obr. 23. Histologie hojení po aplikaci buňky+XD. V biopsii odebrané 7. den po aplikaci buněk + XD (odběr uprostřed oka autotransplantátu síťovaného 1: 6) je vidět tvořící se epidermis s 2–5 vrstvami keratinocytů (šipka). Hematoxylin-eosin.

5.5 Opakované hojení odběrové plochy u rozsáhle popáleného pacienta

Devítiletý pacient přijat v březnu 2012 na KPM FNKV s popálením na 90% povrchu těla III. st. (Obr. 24 - 29) Odběrová plocha byla limitována na vlasatou část hlavy (Obr. 27), obě nohy (Obr. 25, 26), skrotum a hýždí. Provedeny nekrektomie ploch a k uzávěru plochy v rozsahu cca 50% povrchu těla (končetiny, záda) byla použita umělé kůže Integra (obr. 2).

V technice uzávěru rány byla použita metoda mikrograftingu v poměrech expanze 1:6 a 1:9 a meshování v širokých expanzích (1:4-1:6) v kombinaci se směsí autologních buněk.

Odběrové plochy na nohou, skrotu, hýždí a hlavě (Obr. 27) byly opakovaně odebírány. Například kůže na dorsu nohou byla odebírána celkově 6x (Obr. 26). Úspěšné a rychlé hojení odběrů bylo klíčovým momentem ve strategii kožní transplantace a umožňovalo nám intenzifikovat kožní transplantace. Akceleraci hojení limitovaných odběrových ploch jsme dosáhli kombinací Xe-Dermy a směsí autologních buněk, získaných během operačního výkonu metodou Re-Cell či v laboratorních podmínkách standardní trypsinizací. V průběhu léčby nedošlo k infekci odběrových ploch, opakovaná re-epitelizace v rizikových místech jako např. dorsum nohy probíhala bez komplikací. Kombinace jednotlivých metod hojení široce meshovaných transplantátů i akcelerace hojení odběrů kombinací směsí autologních buněk a acelulární prasečí dermis vedly k zahojení dítěte s extrémním rozsahem hlubokých popálenin (Obr. 28, 29).



Obr. 24. *Devítiletý chlapec popálen po neopatrné manipulaci s ředidlem na 90 % povrchu těla, popáleniny III. stupně.*



A



B



C



D

Obr. 25. *Odběr dermoepidermálního štěpu - aplikace směsi buněk a Xe-Dermy. A) Air-dermatomem je odebrán tenký dermoepidermální štěp z nožičky. B) Po důkladné hemostáze je odběrová plocha připravena k přiložení krytu. C) Aplikace směsi autologních buněk získaných modifikovanou metodou ReCell na odběrovou plochu. D) Plocha je po aplikaci kryta Xe-Dermou, jako další kryt použit mastný tyl a obklad s Prontosanem.*



A



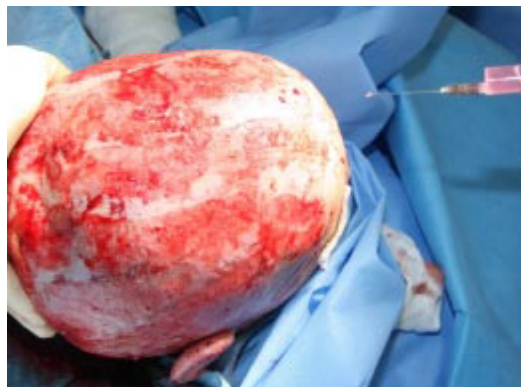
B



Obr. 26. Hojení odběrové plochy. *A) 7 dnů po odběru štěpu: XD se spontánně odlučuje od spodiny rány, která je kryta epitelem. B) 10 dnů od odběru štěpu: Plocha je připravena k dalšímu odběru.*



A



B



C



D

Obr. 27. Odběr transplantátu z vlasaté části hlavy. *A) Po tumescenci odběrové plochy roztokem epinefrinu proveden air-dermatomem odběr štěpu z vlasaté části hlavy. B) Na odběrovou plochu je stříkačkou aplikována směs buněk. C) Odběrová plocha je po aplikaci směsi buněk kryta XD. D) 12 dnů po odběru je plocha zhojena křehkým epitelem.*



A



B

Obr. 28. Kombinace Xe-Dermy, směsi autologních buněk a meshovaných transplantátů na krku a obličeji. A) Aplikace buněk na plochu krku a obličeje 5. den po přiložení meshovaného štěpu. Meshovaný štěp byl na komunikativní partii použit z důvodu kritické absence odběrových ploch. B) XD přiložena na plochu po aplikaci buněk.



A



B

Obr. 29. Pacient v průběhu rehabilitace na dětském oddělení

A) Plochy v rozsahu 90% povrchu těla transplantovány. Na oddělení zahájena časná rehabilitace k minimalizaci následků úrazu - na fotografii první samostatné krůčky na převazovně 4,5 měsíce po úrazu. B) Po 6 měsících chlapec propuštěn z nemocnice do ambulantní péče. Fotodokumentace použita se svolením rodičů pacienta.

6 DISKUZE

Používání štěpů prasečí kůže - xenotransplantátů je úzce spjato s historií Kliniky popáleninové medicíny FNKV [Königová, 1996; Klein et al., 1995]. Metodika pro odběr, zpracování a skladování xenotransplantátů z vepřových kruponů byla vyvinuta již v roce 1973 v kožní bance popáleninového centra v Legerově ulici v Praze založeného v r. 1953 [Moserová et al., 1974; Moserová a Houšková, 1988]. Nativní xenotransplantáty byly v dalších dekádách úspěšně použity u tisíců pacientů na různé druhy akutních i chronických ran na KPM 3. LF UK a FNKV [Dvořánková et al., 2004].

V roce 2005 byly odběry xenotransplantátů ukončeny vzhledem ke změně legislativy EU pro nakládání se zdravotními prostředky zvířecího původu. K dočasnému krytí popálených ploch se nyní používá celé spektrum syntetických materiálů (hydrokoloidů, alginátů, polymerů, silikonů atd.) Ani jedna z této skupiny dočasných syntetických krytů nevykazuje biologickou aktivitu, jejich indikace jsou často limitovány a lze je jen obtížně srovnávat s biologicky aktivními xenoštěpy [Jones et al., 2002].

Cílem předkládané dizertační práce bylo posouzení vlivu bezbuněčné prasečí dermis Xe-Dermy na hojení popálenin. Bezbuněčná prasečí xenodermis byla původně vyvinuta ve spolupráci 3. LF UK s Ústavem molekulární genetiky AV ČR jako podklad pro pěstování lidských keratinocytů. Xenodermis měla sloužit jako matrix pro bilaminární kožní náhradu, skládající se z prasečí dermis a lidských keratinocytů [Matoušková et al., 1993]. Hlavním smyslem bylo vyvinout kompozitní kožní náhradu („recombined human/pig skin“, RK), obsahující nejen epidermální, ale i dermální složku. Lepší manipulovatelnost, adhezivita a stabilita bilaminární náhrady měla přinést lepší klinické výsledky v porovnání s aplikací samotného epidermálního kultivovaného porostu. S rekombinovanou kůží (RK) bylo dosaženo velmi dobrých klinických výsledků při aplikaci v orientaci buňkami směřujícími do rány („upside-down“) [Matoušková et al., 1997; 2001; 2006]. V posledních letech použití RK bránila náročná legislativa EU.

Ukázalo se však, že i xenodermis bez lidských keratinocytů má vynikající hojivé účinky [Matoušková et al., 2002; Brychta et al., 2007]. Od roku 2008 je bezbuněčné sterilní xenodermis vyráběna a dodávána na trh pod firemním názvem Xe-Derma[®].

Pro osvětlení hojivého účinku a bioaktivity XD jsme zjišťovali, zda XD podporuje růst a stratifikaci keratinocytů stejně jako její laboratorní předchůdce „cell-free pig dermis“ [Matoušková et al., 1993] a jakou roli pro tvorbu epidermis hraje přírodní struktura XD.

Stratifikace a morfologická diferenciacie keratinocytů může být dosažena *in vitro* v organotypických kultivačních systémech na různých dermálních substrátech pěstovaných na rozhraní médium-vzduch [Prunieras et al., 1983]. Bioaktivita XD *in vitro* byla studována organotypickým kultivačním testem. Po vyzvednutí xenodermis, porostlé monolayerem epiteliálních buněk, na rozhraní médium-vzduch začaly keratinocyty stratifikovat a diferencovat. Během týdne vytvořily na XD vícevrstevnou epidermis (5-15 vrstev) s bazální, spinální, granulární a částečně i rohovou vrstvou. Ve vzniklém modelu kůže (lidské keratinocyty na XD) byla studována přítomnost a distribuce vybraných markerů diferenciacie keratinocytů. Expresie a distribuce diferenciačních markerů HMW CK, CD29, involucrinu a p63 *in vitro* byla porovnána s expresí *in vivo*, konkrétně s neoepidermis na hojící se hluboké dermální popálenině, která byla po odstranění nekrotické tkáně krytá XD a u níž zbytky kožních adnex v retikulární části kůžní sítě zůstaly zachovány. Expresie a distribuce HMW CK, CD29 a involucrinu *in vitro* odpovídala jejich expresi *in vivo* (v normální kůži i v neoepidermis). Protein p63 byl *in vivo* exprimován ve vrstvě bazálních a ve frakci suprabazálních buněk, zatímco *in vitro* byl přítomen jen u bazálních buněk. Protein p63 je markerem progenitorových a tranzitních buněk, které jsou důležité pro proliferaci a potenciál stratifikovaných epitelů [Koster a Ropp 2004]. Morphologie epidermis *in vitro* (na XD) byla velmi podobná neoepidermis (pod XD), která vznikla na popálenině *in vivo* ze zbytků kožních adnex. Kontrolní plocha - rána, která byla kryta pouze bavlněnou, impregnovanou tkaninou Grassolind, nejevila (na rozdíl od plochy kryté XD) známky neoepitelizace, ačkoli jsme histologicky prokázali v lůžku rány část adnex.

Na některých biologických materiálech odvozených od xenogenní či alogenní dermis jsou kultivované keratinocyty schopné proliferovat, stratifikovat a diferencovat. Tato schopnost je závislá i na konkrétní struktuře biologické matrix dané její přípravou (způsobem sterilizace, skladování, přítomností elastických vláken, přítomností cizorodých chemických látek, porozitou, antigenicitou atd.). Epiteliální buňky stratifikují i na matrix tvořené kolagenem s fibroblasty (Apligraf, OrCel). Na většině syntetických materiálů, které jsme orientačně testovali (jako např. Grassolind, Viacell, Askina) nemohou buňky růst, neboť se na tyto materiály nemohou přichytit (adherovat). Ze syntetických materiálů jsou buňky schopny do jisté míry růst, ale nikoli stratifikovat, na Suprathelu (biodegradibilní D-L-lactát caprolakton) [Nolte et al., 2007] a semisyntetickém krytu Biobrane, který obsahuje kolagen [Kopp et al. 1996]. Na lyofilizované prasečí dermis

Xenoderm [Hosseini et al., 2007] epidermální buňky rostou i stratifikují, ale vzhledem k rozvolnění vláken kolagenu po lyofilizaci migrují také do vnitřních struktur dermální matrix.

Vysoce organizovaný růst keratinocytů na XD oproti chaotickému růstu buněk na čistém 3D kolagenu (Biopad) s terminální diferenciací keratinocytů uvnitř equinní kolagenní matrix potvrzuje naši domněnku, že přírodní biologická struktura dermis hraje významnou roli ve formování epidermální architektury. Signály z podpůrné mezodermální tkáně jsou důležitým spouštěčem epidermální diferenciaci a regenerace [Koster et al. 2004]. Naše výsledky jsou v souladu s výsledky Feng a kol., kteří ve své práci dokazují, že acelulární prasečí dermální matrix svou strukturou vytváří ideální prostředí pro akceleraci regenerace epiteliálních kmenových buněk přítomných v reziduu kožních adnex u hlubokých dermálních popálenin, což vede k urychlení hojení s pozitivním vlivem na nežádoucí hypertrofii jizev [Feng et al., 2006].

Experimentálně prokázaný pozitivní vliv acelulární prasečí dermis na proliferaci a diferenciaci kožních buněk jsme v klinické praxi vyzkoušeli na širokém spektru ran různé etiologie.

Nejčastějším typem rány, se kterou se pravidelně setkáváme převážně u dětských pacientů, povrchní kožní ztráta (popálenina II.A stupně) vzniká opařením. Vlivem termické noxy dochází ke ztrátě epidermis a nejpovrchnější části dermis. Spodina je dobře prokrvena, test kapilárního návratu je pozitivní ("capillary return test"). Pokud nedojde ke konverzi, rána se hojí do 14 dnů ad integrum bez vytvoření jizvy [Herndon, 2007]. Cílem léčebné strategie je ochrana rány před příčinami konverze jak místními, tak celkovými. Z místních se jedná hlavně o vysychání, infekci (Staphylococcus aureus v prvních 3-4 dnech), kolaterální edém a mechanickou traumatizaci. Z celkových faktorů, které proces hojení ovlivňují jsou hlavní porucha mikrocirkulace v rámci šoku a generalizovaného edému, přítomnost komorbidity, sepse a podávání léků s negativním vlivem na imunologickou odpověď pacienta (např. kortikoidy). Povrchní popálení II. stupně je velice bolestivé. Aferentní bolestivá signalizace z obnažených volných nervových zakončení je velice intenzivní a může zhoršovat celkový stav pacienta přetrvávající aktivací stresové osy HPA [Königová et al., 2010]. XD splňuje celou řadu výhod moderního dočasného krytu: bezproblémové skladování, rychlou přípravu, výbornou adhezivitu, semipermeabilitu pro tekutiny a plyny, transparentnost, jež umožňuje sledovat vznik a vývoj změn popálené plochy pod krytem [Zajíček et al., 2008].

Po aplikaci XD na ránu dojde k pevné vazbě kolagenu matrix a lůžka rány. Překrytí

obnažených nervových zakončení vede k signifikantnímu snížení bolestivosti plochy a zmírnění stresové odpovědi na úraz. XD pevně lpí ke spodině a není nutné ji měnit, dokud nedojde k jejímu spontánnímu odloučení od zhojené ranné plochy.

Právě snížení bolestivosti plochy bez nutnosti re aplikace favorizuje XD při jejím použití u malých dětí. Moderní syntetické kryty také vykazují celou řadu pozitivních vlastností na hojení popáleninové rány. V klinické praxi je často používaná skupina hydrogelových krytů. Hlavními výhodami této skupiny syntetických materiálů je vedle vysoké absorpční kapacity i dobrá hydratace rány a snížení bolestivosti po aplikaci [Eisenbud et al., 2003; Thomas a Hay, 1996]. V naší každodenní klinické praxi stojíme před otázkou volby mezi dvěma srovnatelnými skupinami krytů: syntetických a biologických. V naší studii jsme porovnali představitele moderních hydrokoloidních krytů Askinu a acelulární prasečí dermis Xe-Dermu v retrospektivní studii u dětských pacientů léčených na KPM FNKV v Praze.

Vyhodnotili jsme důležité parametry hojení u dvou srovnatelných skupin dětí. Skupina 43 dětských pacientů byla léčena pomocí Askiny, druhá skupina byla léčena pomocí XD. Skupina dětí léčených XD měla větší rozsah popálené plochy. Mezi hodnocené parametry patřila doba celkové epitelizace, množství infekčních ranných komplikací, rozsah konverze na hluboké dermální ztráty a nutnost re aplikací. Hodnocení bolestivosti jsme vzhledem k nepřesnému kvalitativnímu hodnocení bolesti v této nízké věkové skupině (průměrný věk byl 19 měsíců) neprováděli.

Při vyhodnocení sledovaných parametrů obou skupin jsme nenašli statisticky významný rozdíl v době hojení, konverzi a incidenci infekčních komplikací, ačkoli děti léčené XD byly opařeny na statisticky významně větší ploše povrchu těla. Statisticky signifikantní rozdíl byl zjištěn v počtu re aplikací. U skupiny pacientů léčených syntetickým hydrokoloidem Askina byla nutná k úplné epitelizaci opakovaná re aplikace, což si vysvětlujeme přesáhnutím absorpční kapacity hydrokoloidu s nutnou výměnou. U dětí léčených XD došlo k pevné vazbě kolagenu prasečí dermis a fibrinu lůžka rány.

Pokud se předešlo infekci, nebylo nutno XD měnit a v intervalu průměrně 8 dnů došlo k spontánnímu bezbolestnému odloučení XD od již zhojené plochy. Každá výměna krytu je spojena nejen s bolestivostí, ale i s vyšším rizikem infekce rány. Infekční komplikace byly u skupiny s hydrokoloidem častější (při power analýze vyšší než 31%), ale bez statistické významnosti. Přesnější vyhodnocení tohoto parametru by znamenalo amplifikaci dat. Hosseini prezentoval ve svém souboru opařených dětí dobré výsledky hojení při použití komerčně dostupné lyofilizované prasečí dermis Xenoderm [Hosseini

et al., 2007, Choukairi et al., 2008]. Dle našich zkušeností je nutná výrazně delší příprava produktu imerzí (30-60 min) před vlastní aplikací. XD vyžaduje dvou až třímínutové namočení. Po aplikaci na ránu se Xenoderm během několika dnů spontánně rozpadá a je nezbytná jeho výměna, což si vysvětlujeme rozvolněním kolagenních vláken při lyofilizaci. V porovnání s XD je Xenoderm méně transparentní.

Hluboká dermální ztráta - popálenina stupně II.B, patří k nejkomplicovanějším typům popáleninové rány. Na rozdíl od povrchní ztráty kůže extenduje poranění až do hluboké retikulární části dermis. Spodina rány je ischemizovaná trombózou subpapilárních kožních plexů. Edém se na rozdíl od povrchní opařeniny vytváří převážně v intersticiu dermis a zhoršuje mikrocirkulaci. Rána je náchylná k infekci a konverzi na ztrátu kůže v celé tloušťce. Hojení hlubokého dermálního popálení trvá 3-5 týdnů. Epitelializace takového typu rány je možná ze zachovalých kmenových buněk kožních adnex, ale za cenu jizevnatého zhojení.

Zlatým standardem v terapii ploch II.B stupně je aplikace SSD [Miller et al., 2010; Atiyeh et al. 2005; White 2005]. K jeho výhodám patří antibakteriální aktivita proti širokému spektru gr.+ i gr- bakteriím, snadná relativně bezbolestná aplikovatelnost, nízká absorpce. Jeho použití je u 5-15% pacientů spojeno s tranzitorní leukopenií, systémový účinek sulfonamidu může vyjimečně způsobit krystalurii a methemoglobinemii. Popisována je i bolestivost, pálení a hypersenzitivita [Fisher et al., 2003; Agarwal a Gawkrödger, 2002]. Může vzniknout i rezistence některých bakterií [Bridges a Lowbury, 1977]. U povrchních popálenin SSD brzdí epitelizaci [Poon a Burd, 2004], nelze ho použít u dětí mladších tří měsíců. Pro udržení antibakteriální aktivity se doporučuje krém 2x denně měnit. V porovnání s XD jsou náklady na léčbu vyšší. XD po aplikaci na plochu pevně lpěla k lůžku rány, nebyla nutná její výměna. Pacienti udávali v porovnání s aplikací SSD sníženou bolestivost. Výsledky však nelze vzhledem k malému souboru pacientů lépe verifikovat. Hlavní nevýhodou XD v hojení je absence antibakteriální aktivity. V případě, že je na ploše přítomna infekce, po překrytí plochy dojde k rychlému pomnožení bakterií a tím i sekundární konverzi rány. Úspěšné zhojení plochy II.B stupně pomocí XD je dle našich zkušeností možné především u čerstvých, neinfikovaných ran.

Plocha po *odběru dermoepidermálního štěpu* je aseptická rána definované hloubky. Hojení odběrové plochy je také multifaktoriální. Z místních faktorů je to kromě druhu aplikovaného krytu přísně aseptická péče. Svou roli hraje i lokalizace odběru. Nejvýhodnější odběrovou plochou jsou místa se silnou dermis a velkým množstvím vlasových folikulů jako např. vlasatá část hlavy [Khalid et al., 2008]. Hojení odběrového

místa štěpu v místech mechanické traumatizace s tenkou dermis a redukováným množstvím adnex bývá zatíženo komplikovanějším hojením. Mezi rizikové skupiny pacientů s očekávaným prolongovaným a komplikovaným hojením odběrů patří polymorbidní gerontologičtí pacienti. Epitelizační schopnost atrofické kůže s redukovánými adnexy je snížena. Hojení bývá alterováno i přítomností jiných systémových onemocnění jako např. DM. Použití XD ke krytí odběrových ploch zvláště u potenciálně rizikových skupin má pozitivní efekt na hemostázu, biologicky aktivní tkáň prasečí matrix dodá do rány dermální prvky, poskytuje substrát pro adhezi a proliferaci buněk a vytváří ochranný kryt, pod kterým vzniká vhodné prostředí pro spontánní epitelizaci rány. Xe-Derma se pevně přichytí k lůžku rány, není nutné ji měnit a umožňuje časnou rehabilitaci pacienta. V případě kritických popáleninových úrazů je nutné odběrové místo využít i několikrát a odběry jsou prováděny často několik týdnů či měsíců po traumatu. Pacienti jsou v této akutní fázi popáleninového úrazu pod vlivem extrémního hypermetabolismu, organismus je často osídlen rezistentními mikroorganismy a potenciál hojení povrchních ran, vzniklých opakovaným odběrem štěpů je výrazně oslaben.

Moderní metody pro hojení ran zahrnují léčbu pomocí buněčné terapie – keratinocytů nebo složených biologických krytů obsahujících i více druhů buněk. Buňky jsou většinou kultivované, což je časově náročné [O'Connor et al. 1981; Braye et al. 2000]. Některé studie z posledních let ukázaly, že i nekultivované buňky mohou být využity k hojení ran různé etiologie [Navarro et al., 2000; Van Geel et al., 2001; Gravante et al., 2007; Wood et al. 2007] nebo pro repigmentaci ploch u vitiliga [Mulekar et al., 2008].

V posledních letech se začaly pro terapii využívat i buňky čerstvě izolované z kůže pacienta [Gravante et al. 2007; Wood et al. 2007]. Byly vyvinuty i komerční kity pro disociaci buněk kůže, např. ReCell[®] (má CE značku) – jednorázový kit pro získání buněk z malého štěpu kůže a okamžitou aplikaci buněk na ránu. Zpracování a rozvolnění tkáně se děje v průběhu operace bez nutnosti specializované kultivační laboratoře. Tím se urychlí použití buněk bez dlouhé a náročné fáze kultivace keratinocytů. Autologní čerstvě izolované buňky jsou směsí keratinocytů, fibroblastů, melanocytů, Langerhansových buněk i krevních elementů, jejichž růstové faktory vedou ke stimulaci hojení různých typů ran. Byla prokázána i schopnost těchto buněk se v ráně uchytit a proliferovat [Navarro et al., 2000]. Princip metody je jednoduchý, trypsinizací se rozvolní vzorek kůže na jednotlivé buňky a suspenze se nakape nebo naspřejuje na ránu.

Na kazuistickém případě dětského pacienta s popáleninami III. stupně na 90%

povrchu těla jsme využili kombinaci acelulární prasečí dermis se suspenzí buněk získaných metodou ReCell[®]/trypsinizací v průběhu operace z malého tenkého odběru kůže pacienta. Hlavní praktickou výhodou kombinace XD a směsi kožních buněk aplikovaných ve formě kapek suspenze přímo na operačním sále byla možnost okamžitého použití. Čas přípravy buněčné suspenze nepřesáhnul 50 minut. Hojení odběrových ploch při použití této techniky umožnilo častější opakování odběrů. Dodání samotné suspenze kožních buněk na odběrovou plochu se nám jevilo neefektivní vzhledem k rychlé absorpci roztoku do povrchního mulového obvazu. Xe-Derma svými biomechanickými vlastnosti vytváří ideální kryt, který udrží suspenzi buněk na ráně a svými unikátními biologickými vlastnostmi podpoří proliferaci a migraci dodaných keratinocytů i dalších buněčných elementů na ráně. Důležité bylo, že opakovaným rychlým hojením odběrových ploch bylo umožněno odebírat autologní štěpy pro transplataci hlubokých popálenin III. st. a krytí vaskularizované náhrady dermis Integrity (aplikované před 3- 5 týdny). Výsledkem bylo zahojení pacienta během 5 měsíců, což je vzácný případ i ve světovém měřítku.

Další modifikací této metody je využití kombinace dvou kvalitních biologických krytů - suspenze autologních kožních buněk a acelulární prasečí dermis XD pro podporu hojení ploch mezi můstky široce expandovaného autotransplantátu u kriticky popálených pacientů. Pro studii jsme použili meshování v poměru 1:6, kde byly výsledky dobře patrné. Vyšší poměry expanze jako např. 1:9 v praxi nepoužíváme vzhledem k obtížné aplikaci na lůžko rány. Ultratenké a dlouhé můstky štěpu mají tendenci k rolování a nepřilnou tak na lůžko rány. Expanze kůže v poměru 1:3 neumožnila signifikantní posouzení epitelizace

Makroskopické i histologické výsledky naší studie u rozsáhle popálených pacientů ukázaly, že nejlépe probíhalo hojení po aplikaci suspenze epidermálních buněk krytých XD, ale překvapivě dobrou stimulaci (a kvalitu kůže) navodila i samotná XD, což potvrzuje naše předchozí závěry o pozitivním vlivu acelulární prasečí dermální matrix na růst, stratifikaci a proliferaci epidermálních buněk, pokud jsou v ranné ploše zachovány i nepatrné zbytky adnex. XD vytváří v sendvičovém krytu matrix pro buněčné elementy, které jsou kolagenními a elastickými vlákny tohoto biologického krytu stimulovány k proliferační aktivitě. XD také slouží jako mechanická ochrana rány před vysycháním. Předpokládáme, že XD vytvořené mikroprostředí zvyšuje pravděpodobnost uchycení frakce rozvolněných buněk na lůžko rány - pacientovy buňky se po ukotvení nejen samy dělí, ale svými růstovými faktory přispívají k rychlejší proliferaci epidermálních buněk

migrujících z můstků sítě dermoepidermálního štěpu.

Problematická byla zpočátku aplikace buněčné suspenze na ránu. Při použití ručního spreje (injekční stříkačka se sprejovacím nástavcem) docházelo k velkému rozptylu aerosolu buněk a aplikace do prostorů mezi můstky štěpu byla nepřesná. Aplikace suspenze stříkačkou s jehlou je sice přesnější, ale v případě konvexních ploch suspenze buněk částečně stékala mimo aplikovaný prostor. Nejlépe se nám osvědčilo nakapat suspenzi přímo na rozprostřenou Xe-Dermu, kterou jsme pak aplikovali buňkami do rány (otočili „upside down“). Na hydrofilním povrchu XD se kapky suspenze krátkodobě udržely. Výtěžek z odběru 1 cm² (cca 2,5 milionů buněk) jsme aplikovali na 80 cm² rány, později u odběrových ploch kriticky popáleného chlapce a u sendvičové techniky jsme pokryli z 1 cm² rozsáhlejší rannou plochu (až 200 cm²). Výhodná by mohla být i kombinace buněk s fibrinovým lepidlem, která by kromě hemostatického efektu mohla vést i k zlepšení ukotvení buněk na lůžko rány v některých rizikových lokalitách. Dle literatury není však v uchycení buněk na ránu s fibrinovým lepidlem nebo bez jeho použití rozdíl [Currie et al., 2003].

Autotransplantát zůstává i přes pokroky v tkáňovém inženýrství jedinou možností pro definitivní uzávěr popáleninové rány. U kriticky popálených pacientů s odběrovou plochou větší než 60% povrch těla je nutné kožní transplantáty odebírat z nepopálených partií opakovaně [Loss et al., 2000]. Rychlá a nekomplikovaná epitelizace odběrové plochy umožňuje opakování odběru. Po každém opakovaném odběru však kvalita čerstvě reepitelizované plochy klesá a je nutné čekat delší dobu k zpevnění krytu umožňující další odběr. Jako kryt odběrové plochy jsme v naší klinické praxi použili celou řadu syntetických i biologických materiálů. U dítěte s kritickým popálením na 90% povrchu těla jsme použili ke krytí odběrových ploch kombinaci XD a směsi autologních buněk. Využití biologického potenciálu acelulární prasečí dermis a růstových faktorů produkovaných směsí čerstvých autologních buněk získaných během operace vedlo k rychlé a kvalitní epitelizaci odběrové plochy i u opakovaných odběrů z kritických lokalit (dorsum nohy).

V další klinické práci na KPM FNKV bychom se rádi zaměřili na akceleraci hojení odběrové plochy s využitím zmíněné metody u rozsáhle popálených pacientů.

7 ZÁVĚR

Acelulární prasečí dermis Xe-Derma je dočasný biologický kryt s výrazným epitelializačním potenciálem vhodným k léčbě termického poranění kůže. Přírodní biologická struktura xenomatrix podporuje proliferaci a diferenciaci lidských keratinocytů, a tím urychluje spontánní epitelizaci termicky poškozeného kožního krytu do úrovně hluboké dermální. V kombinaci s čerstvě izolovanými autologními buňkami má potenciál léčit kriticky popálené pacienty opakovanou adekvátní léčbou odběrových ploch a krytím široce síťovaných autotransplantátů.

8 SOUHRN

Cílem předkládané dizertační práce bylo posouzení vlivu bezbuněčné prasečí dermis na hojení popálenin. Bezbuněčná xenodermis byla vyvinuta na našem pracovišti a pod názvem Xe-Derma[®] je vyráběna českou firmou.

V předkládané dizertační práci byly otestovány některé kultivační techniky pro pěstování lidských primárních keratinocytů. Biologická aktivita Xe-Dermy (XD) byla studována pomocí kultivace a diferenciaci keratinocytů na této matrix v organotypické kultuře na rozhraní médium-vzduch. Histologickou a imunocytochemickou analýzou keratinocytů *in vitro* a *in vivo* bylo prokázáno, že růst a diferenciaci keratinocytů pěstovaných na XD (*in vitro*) a tvorba nové epidermis v hluboké dermální popálenině kryté XD (*in vivo*) jsou velmi podobné. Schopnost stimulovat růst a diferenciaci keratinocytů prokazuje bioaktivitu XD. Její přírodní struktura a pevnost daná třírozměrnou matrix složenou z kolagenních a elastických vláken a s povrchem odpovídajícím bazální membráně umožňuje adhezi, proliferaci, migraci a diferenciaci epidermálních buněk.

V klinické praxi byla XD použita pro léčbu opařenin u dětí. V rámci grantového projektu IGA byla řešena problematika hojení široce síťovaných autotransplantátů u rozsáhle popálených pacientů pomocí kombinace XD a čerstvě izolovaných autologních epidermálních buněk. Metoda kombinace Xe-Dermy a autologních keratinocytů byla aktuálně využita pro léčbu osmiletého chlapce s popáleninami na 90% těla. Rychlé a kvalitní hojení odběrových ploch umožnilo vícečetné opakované odběry z jednoho místa a vedlo ke zdárnému vyléčení dětského pacienta.

Z výsledků vyplývá, že acelulární prasečí dermis Xe-Derma je dočasný biologický kryt s výrazným epitelializačním potenciálem vhodným k léčbě termického poranění kůže. Přírodní biologická struktura xenomatrix podporuje proliferaci a diferenciaci lidských keratinocytů, a tím urychluje spontánní epitelizaci termicky poškozeného kožního krytu do úrovně hluboké dermální. V kombinaci s čerstvě izolovanými autologními buňkami má potenciál léčit kriticky popálené pacienty opakovanou adekvátní léčbou odběrových ploch a krytím široce síťovaných autotransplantátů. Rychlejší epitelizace mezi můstky meshovaného štěpu a zkrácení doby hojení odběrových ploch vede k redukci časných i pozdních komplikací hojení ran u kriticky popálených pacientů.

SUMMARY

The submitted dissertation addresses the issue of acellular pig dermis in healing burn wound. The acellular xenodermis Xe-Derma[®] (XD) has been developed in our department (Prague Burn Centrum) in cooperation with the Czech Academy of Sciences and has been produced by a Czech company.

Several culture techniques for cultivation of human primary keratinocytes were tested. The bioactivity of XD was studied by a cell culture assay in an organotypic culture system at the air-liquid interface. We compared keratinocyte proliferation and formation of epidermis *in vitro* with formation of neo-epidermis in the deep dermal wounds treated with XD (*in vivo*). Morphological and immunohistochemical analysis of keratinocytes confirmed the similarity of organization and differentiation of the cultured epidermal cells to the normal epidermis. Ability to stimulate growth and differentiation of keratinocytes connote bioactivity of XD. The natural structure and firmness of XD (composed of collagen and elastic fibres with the surface responding to the basement membrane) enables adhesion, proliferation, migration and differentiation of epidermal cells.

In the clinical use XD appertains to temporary covers in burn treatment, particularly on scalds in children. In the frame of grant project IGA there has been investigated healing of widely meshed autografts in extensive burns with limited donor areas. Freshly isolated autologous epidermal cells applied into the “windows” of the autograft were covered with XD and thus protected. This combination has been used recently in the treatment of a 8-years-old boy who had sustained deep burn 90% of the T.B.S.A. Rapid and solid healing of the donor sites covered with XD allowed manifold crops from the same area. The surgical task to close the necrectomized burn was successfully accomplished by support of XD covering widely meshed autografts and protecting new epithelia in all donor sites.

9 POUŽITÁ LITERATURA

Agarwal S, Gawkrödger DJ. Occupational allergic contact dermatitis to silver and colophonium in a jeweler. *Am J Contact Derm* 2002; 13(2): 74.

Atherton DD, Tang R, Jones I, Jawad M. Early excision and application of matriderm with simultaneous autologous skin grafting in facial burns. *Plast Reconstr Surg*. 2010; 125(2): 60e-61e.

Atiyeh BS, Hayek SN, Gunn SW. New technologies for burn wound closure and healing-review of the literature. *Burns* 2005; 31(8): 944–956.

Badiavas EV, Paquette D, Carson P, Falanga V. Human chronic wounds treated with bioengineered skin: histologic evidence of host-graft interactions. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46(4): 524–530.

Bannasch H, Föhn M, Unterberg T, Bach AD, Weyand B, Stark GB. Skin tissue engeneering. *Clin Plast Surg* 2003; 30(4): 573–579.

Barrandon Y, Green H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 1987; 50(7): 1131–1137.

Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skinequivalent tissue of full thickness. *Science* 1981; 211(4486): 1052–1054.

Braye F, Oddou L, Bertin-Maghit M, Belgacem S, Damour O, Spitalier P, Guillot M, Bouchard C, Gueugniaud PY, Goudeau M, Petit P, Tissot E. Widely meshed autograft associated with cultured autologous epithelium for the treatment of major burns in children: report of 12 cases. *Eur J Pediatr Surg* 2000; 10(1): 35–40.

Braye F, Pascal P, Bertin-Maghit M, Colpart JJ, Tissot E, Damour O. Advantages of using a bank of allogenic keratinocytes for the rapid coverage of extensive and deep second degree burns. *Med Biol Eng Comput* 2000; 38(2): 248–252.

Brem H, Balledux J, Sukkarieh T, Carson P, Falanga V. Healing of venous ulcers of long duration with a bilayered living skin substitute: results from a general surgery and dermatology department. *Dermatol Surg* 2001; 27(11): 915–919.

Bridges K, Lowbury EJJ. Drug resistance in relation to use of silver sulphadiazine cream in a burns unit. *J Clin Pathol* 1977, 30(2): 160–164.

Bromberg BE, Song IC, Mohn MP. The use of pig skin as a temporary biological dressing. *Plast Reconstr Surg* 1965; 36: 80–90.

Brychta P, Brož L, Bláha J, Matoušková E, et al. Acellular porcine dermis – its characterisation and use in burn medicine. 12th EBA Congress, Budapest; 12–15 September 2007.

- Burke JF. Observations on the development and clinical use of artificial skin – an attempt to employ regeneration rather than scar formation in wound healing. *Jpn J Surg* 1987; 17(6): 431–438.
- Chester DL, Balderson DS, Papini RP. A review of keratinocyte delivery to the wound bed. *J Burn Care Rehab* 2004; 25(3): 266–275.
- Choukairi F, Hussain A, Rashid A, Moiemmen N. Re: xenoderm dressing in the treatment of second degree burns. *Burns* 2008; 34(6): 896; author reply 897. Epub 2008 Mar 28.
- Cuono C, Langdon R, McGuire J. Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. *Lancet* 1986; 17(1): 1123–1124.
- Currie LJ, Martin R, Sharpe JR, James SE. A comparison of keratinocyte cell sprays with and without fibrin glue. *Burns* 2003; 29(7): 677–685.
- Daniels JT, Kearney JN, Ingham E. Human keratinocyte isolation and cell culture: a survey of current practices in the UK. *Burns* 1996; 22(1): 35–39.
- De Vries HJ, Mekkes JR, Middelkoop E, Hinrichs WL, Wildevuur CR, Westerhof W. Dermal substitutes for full-thickness wounds in a one-stage grafting model. *Wound Repair Regen* 1993; 1 (4): 244–252.
- Dvořánková B, Brož L, Pafčuga I, Kapounková Z, Königová R. The role of skin bank in the treatment of severely burnt patients. *Acta Chir Plast* 2004; 46(2): 51–55.
- Dvořánková B, Smetana K Jr, Königová R, Singerová H, Vacík J, Jelínková M, Kapounková Z, Zahradník M. Cultivation and grafting of human keratinocytes on a poly(hydroxyethyl methacrylate) support to the wound bed: a clinical study. *Biomaterials* 1998; 19(1–3): 141–146.
- Eisenberg M, Llewelyn D. Surgical management of hands in children with recessive dystrophic epidermolysis bullosa: use of allogeneic composite cultured skin grafts. *Br J Plast Surg* 1998; 51(8): 608–613.
- Eisenbud D, Hunter H, Kessler L, Zulkowski K. Hydrogel wound dressings: Where do we stand in 2003? *Ostomy Wound Manage* 2003; 49(10): 52–57.
- Feng X, Tan J, Pan Y, Wu Q, Ruan S, Shen R, Chen X, Du Y. Control of hypertrophic scar from inception by using xenogenic (porcine) acellular dermal matrix (ADM) to cover deep second degree burn. *Burns* 2006; 32(3): 293–298.
- Fisher NM, Marsh E, Lazova R. Scar-localized argyria secondary to silver sulfadiazine cream. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49(4): 730–732.
- Fredriksson C, Kratz G, Huss F. Transplantation of cultured human keratinocytes in single cell suspension: a comparative in vitro study of different application techniques. *Burns* 2008; 34(2): 212–219.

- Gajiwala K, Gajiwala AL. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell Tissue Bank* 2004; 5(2): 73-80.
- Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311(7): 448-451.
- Garfein ES, Orgill DP, Pribaz JJ. Clinical applications of tissue engineered constructs. *Clin Plast Surg* 2003; 30(4): 485-498.
- Gravante G, Di Fede MC, Araco A, Grimaldi M, De Angelis B, Arpino A, Cervelli V, Montone A. A randomized trial comparing ReCell system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns. *Burns* 2007; 33(8): 966-972.
- Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(11): 5665-5668.
- Gustafson CJ, Kratz G. Cultured autologous keratinocytes on a cell-free dermis in the treatment of full-thickness wounds. *Burns* 1999, 25(4): 331-335.
- Hansbrough JF, Boyce ST, Cooper ML, Foreman TJ. Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate. *JAMA* 1989; 262(15): 2125-2130.
- Herndon DN. *Total Burn Care*. Saunders Elsevier, 3rd Edition; 2007: 127-136.
- Horch RE, Corbei O, Formanek-Corbei B, Brand-Saberi B, Vanscheidt W, Stark GB. Reconstitution of basement membrane after „sandwich-technique“ skin grafting for severe burns demonstrated by immunohistochemistry. *J Burn Care Rehabil* 1998; 19(3): 189-202.
- Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med* 2005; 9(3): 592-608.
- Hosseini SN, Mousavinasab SN, Fallahnezhat M. Xenoderm dressing in the treatment of second degree burns. *Burns* 2007; 33(6): 776-781.
- Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, Cotsarelis G. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* 2005, 11(12): 1351-1354.
- Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. *Br J Plast Surg* 2002; 55(3): 185-193.
- Khalid K, Tarar MN, Mahmood F, Malik FS, Mehrose MY, Ata-ul-Haq. Scalp as a donor site for split thickness skin grafts. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2008; 20(1): 66-69.

- Klein L, Mericka P, Preis J. Clinical experience with skin xenografts in burned patients. In: Masellis M, Gunn SWA, editors. *The management of burns and fire disasters: perspectives 2000*. Dordrecht 7, Kluwer Academic Publishers 1995: 337–45.
- Königová R, Bláha J, et al. *Komplexní léčba popáleninového traumatu*. Karolinum: Praha, 2010.
- Königová R. History of the Prague Burn Centre. *Ann Burns Fire Disasters* 1996; IX: 110–11.
- Kopp J, Bannasch H, Andree C. Keratinocyte-seeded BIOBRANE for grafting of full thickness wounds. *Publications Biomedical Engineering Conference 1996; Proceedings: 545–547*.
- Koster MI, Roop DR. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J Dermatol Sci* 2004; 34(1): 3–9.
- Lee SB, Kim YH, Chong MS, Hong SH, Lee YM. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials* 2005; 26(14): 1961–1968.
- Lei J, Cheng J, Li Y, Li S, Zhang L. CD80, but not CD86, express on cultured murine keratinocyte stem cells. *Transplant Proc* 2005; 37(1): 289–291.
- Loss M, Wedler V, Künzi W, Meuli-Simmen C, Meyer VE. Artificial skin, split-thickness autograft and cultured autologous keratinocytes combined to treat a severe burn injury of 93 % of TBSA. *Burns* 2000; 26(7): 644–652.
- Marchisio PC, Bondanza S, Cremona O, Cancedda R, De Luca M. Polarized expression of integrin receptors (alpha 6 beta 4, alpha 2 beta 1, alpha 3 beta 1, and alpha v beta 5) and their relationship with the cytoskeleton and basement membrane matrix in cultured human keratinocytes. *J Cell Biol* 1991; 112(4): 761–773.
- Matoušková E, Vogtová D, Königová R. A recombined skin composed of human keratinocytes cultured on cell-free pig dermis. *Burns* 1993; 19(2): 118–123.
- Matoušková E, Buček S, Vogtová D, Veselý P, Chaloupková A, Brož L, Singernová H, Pavlíková, Königová R. Treatment of burns and donor sites with human allogeneic keratinocytes grown on acellular pig dermis. *Br J Dermatol* 1997; 136(6): 901–907.
- Matoušková E, McKay C, Povysil C, Königová R, Chaloupková A, Veselý P. Characterization of the differentiated phenotype of an organotypic model of skin derived from human keratinocytes and dried porcine dermis. *Folia Biol* 1998; 44(2): 59–66.
- Matoušková E, Brož L, Veselý P, et al. Use of allogeneic human keratinocytes cultured on dried porcine dermis in the treatment of burns. In: *Cultured human keratinocytes and tissue engineered skin substitutes*. Eds: Horch RE, Munster AM, Achauer BM, Thieme G. Verlag 2001; Stuttgart; Germany: 230–238.

Matoušková E, Brož L, Pokorná E, Königová R. Prevention of burn wound conversion by allogeneic keratinocytes cultured on acellular xenodermis. *Cell Tissue Bank* 2002; 3(1): 29–35.

Matoušková E, Brož L, Štolbová V, Klein L, Königová R, Veselý P. Human allogeneic keratinocytes cultured on acellular xenodermis: the use in healing of burns and other skin defects. *Biomed Mater Eng* 2006; 16(4): S63–S71.

Medalie DA, Morgan JR. Preparation and transplantation of a composite graft of epidermal keratinocytes on acellular dermis. *Methods Mol Med* 1999; 18: 407–21.

Miller AC, Rashid RM, Falzon L, Elamin EM, Zehtabchi S. Silver sulfadiazine for the treatment of partial-thickness burns and venous stasis ulcers. *J Am Acad Dermatol* 2012; 66(5), e159–165.

Moiemen N, Yarrow J, Hodgson E, Constantinides J, Chipp E, Oakley H, Shale E, Freeth M. Long-term clinical and histological analysis of Integra dermal regeneration template. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127(3): 1149–1154.

Moserová J. et al. Metodika odběru vepřových dermo-epidermálních štěpů. *Rozhl. chir.* 1974; 53: 193.

Moserová J, Houšková E. *Kožní ztráty a jejich krytí*. Praha 1988: Avicenum.

Muhlbauer W, Henckel von Donnersmarck G, Hoefter E, Hartinger A. Keratinocyte culture and transplantation in burns. *Chirurg* 1995; 66(4): 271–276.

Mulekar SV, Ghwish B, Al Issa A, Al Eisa A. Treatment of vitiligo lesions by ReCell vs. conventional melanocyte-keratinocyte transplantation: a pilot study. *Br J Dermatol* 2008; 158(1): 45–49.

Myers SR, Leigh IM, Navsaria H. Epidermal repair results from activation of follicular and epidermal progenitor keratinocytes mediated by a growth factor cascade. *Wound Repair Regen* 2007; 15(5): 693–701.

Nandakumar A, Fernandes H, de Boer J, Moroni L, Habibovic P, van Blitterswijk CA. Fabrication of bioactive composite scaffolds by electrospinning for bone regeneration. *Macromol Biosci* 2010; 10(11): 1365–1373.

Navarro FA, Stoner ML, Park CS, Huertas JC, Lee HB, Wood FM, Orgill DP. Sprayed keratinocyte suspensions accelerate epidermal coverage in a porcine microwound model. *J Burn Care Rehabil* 2000; 21(6): 513–518.

Niezgoda JA, Van Gils CC, Frykberg RG, Hodde JP. Randomized clinical trial comparing OASIS Wound Matrix to Regranex Gel for diabetic ulcers. *Adv Skin Wound Care* 2005; 18(5 Pt 1): 258–266.

Nolte SV, Xu W, Rodemann H-P, Rennekampff H-O. Suitability of Biomaterials for Cell Delivery in Vitro. *Osteo trauma care* 2007; 15: 42–47.

O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel, et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981; 1: 75–78.

Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 2001; 104(2): 233–245.

Pokorná E, Brož L, Veselý P, Matoušková E. Y chromosome and vimentin used to trace the fate of allogeneic keratinocytes delivered to the wound by the recombined human/pig skin. *Folia Biol* 2001; 47(4): 128-34.

Poon VKM, Burd A. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns* 2004; 30(2): 140–147.

Poumay Y, Pittelkow MR. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* 1995; 104(2): 271–76.

Purdue GF, Hunt JL, Still Jr JM, Law EJ, Herndon DN, Goldfarb IW, Schiller WR, Hansbrough JF, Hickerson WL, Himel HN, Kealey GP, Twomey J, Missavage AE, Solem LD, Davis M, Totoritis M, Gentzkow GD. A multicenter clinical trial of a biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds. *J Burn Care Rehabil* 1997; 18 (1 Pt 1): 52–57.

Putland M, Snelling CF, Macdonald I, Tron VA. Histologic comparison of cultured epithelial autograft and meshed expanded split-thickness skin graft. *J Burn Care Rehabil* 1995; 16(6): 627–640.

Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6(3): 331–344.

Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet* 2006; 2(7), e119.

Ryssel H, Gazyakan E, Germann G, Ohlbauer M. The use of MatriDerm in early excision and simultaneous autologous skin grafting in burns – a pilot study. *Burns* 2008; 34(1): 93–97.

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 2000; 102(4): 451–461.

Thomas S, Hay NP. In vitro investigations of a new hydrogel dressing. *J Wound Care* 1996; 5(3): 130–131.

Unglaub F, Ulrich D, Pallua N. Reconstructive surgery using an artificial dermis (Integra): results with 19 grafts. *Zentralbl Chir* 2005; 130(2): 157–161.

Van der Veen VC, Van der Wal MB, Van Leeuwen MC, Ulrich MM, Middelkoop E. Biological background of dermal substitutes. *Burns* 2010; 36(3): 305–321.

Van Geel N, Ongenaes K, De Mil M, Naeyaert JM. Modified technique of autologous noncultured epidermal cell transplantation for repigmenting vitiligo: a pilot study. *Dermatol Surg* 2001; 27(10): 873–876.

Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns* 1995; 21(4): 243–248.

White R, Cooper R. Silver sulphadiazine: a review of the evidence. *Wounds UK* 2005; 1: 2, 51–61.

Wong DJ, Chang HY. Skin tissue engineering Program in Epithelial Biology. Stanford University, Stanford, CA 94305, stembook.org.

Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* 1980; 14(1): 65–81.

Zajíček R, Brož L, Klein L. et al. Xe-Derma: nový biologický kryt pro léčbu akutních a chronických ran. *Hojení ran* 2008; 2(2): 18–27.

Zajíček R, Mandys V, Měšťák O, Ševčík J, Königová R, Matoušková E. Human keratinocyte growth and differentiation on acellular porcine dermal matrix in relation to wound healing potential. *ScientificWorldJournal* 2012. doi:10.1100/2012/727352. Epub 2012.

Zajíček R, Pafčuga I, Šuca H, Königová R, Brož L, Matoušková E. Hojení široce síťovaných autotransplantátů pomocí autologních epidermálních buněk a bezbuněčné xenodermis Xe-Derma. *Hojení ran* 2012; 6: 12 -18.

Zajíček R, Matoušková E, Brož L, Kubok R, Waldauf P, Königova R. New biological temporary skin cover Xe-Derma® in the treatment of superficial scald burns in children. *Burns* 2011; 37(2): 333–337.

Zweifel CJ, Contaldo C, Köhler C, Jandali A, Künzi W, Giovanoli P. Initial experiences using non-cultured autologous keratinocyte suspension for burn wound closure. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61(11): e1-4.

Seznam publikací autora disertační práce

Seznam publikací se vztahem k disertaci s IF

Zajíček R, Matoušková E, Brož L, Kubok R, Waldauf P, Königova R. New biological temporary skin cover Xe-Derma® in the treatment of superficial scald burns in children. Burns 2011; 37(2): 333–337. **IF 1,978**

Zajíček R, Mandys V, Měšťák O, Ševčík J, Königová R, Matoušková E. Human keratinocyte growth and differentiation on acellular porcine dermal matrix in relation to wound healing potential. ScientificWorldJournal 2012. doi:10.1100/2012/727352. Epub 2012. **IF 1,524**

Dubský M, Kubinová S, Sirc J, Voska L, Zajíček R, Zajícová A, Lesný P, Jirkovská A, Michálek J, Munzarová M, Holáň V, Syková E. Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. J Mater Sci Mater Med. 2012; 23: 931-41. doi: 10.1007/s10856-012-4577-7. Epub 2012. **IF 2,316**

Seznam publikací se vztahem k disertaci bez IF

Zajíček R, Brož L, Klein L, Bláha J, Königová R, Jirkovská A, Dubský M, Bureš I, Matoušková E. Xe-Derma: nový biologický kryt pro léčbu akutních a chronických ran. Hojení ran 2008; 2: 18–27.

Zajíček R., Kubok R., Matoušková E., Waldauf P., Brož L.:
Léčba opaření II.stupně u dětí s využitím dočasného biologického krytu Xe-Derma.
Hojení ran, 5.ročník, 2/2011, str. 25 – 27. ISSN 1802-6400.

Zajíček R, Pafčuga I, Šuca H, Königová R, Brož L, Matoušková E. Hojení široce síťovaných autotransplantátů pomocí autologních epidermálních buněk a bezbuněčné xenodermis Xe-Derma. Hojení ran 2012; 6: 12 -18.

Seznam publikací bez vztahu k disertaci s IF

Zajicek R, Pintar D, Broz L, Suca H, Königova R. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome at the Prague Burn Centre 1998-2008. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012; 26(5):639-43. **IF 2,276**

Gaskell S.L., Cooke S., Lunke M., Shaughnessy J.O., Kazbekov M., Zajíček R.:
A Pan-European evaluation of residential burns camps for children and young people.
Burns 36 (2010) 511-521. **IF 1.978**

Seznam publikací bez vztahu k disertaci bez IF

Valová M, Königová R, Broz L, Zajíček R, Toupalík P. Early and late fatal complications of inhalation injury. *Acta Chir Plast.* 2002;44(2):51-4.

Musilová A, Zajíček R, Broz L, Königová R. Burns of the perineum and anus. *Acta Chir Plast.* 2001;43(3):91-4.

Klein, L., Douša, P., Zajíček R., Pafčuga I., Tokarik M.: Specific aspects of the Treatment of Patients with Multiple mechanical and burn injuries. *Acta Chirurgiae Plasticae*, Vol. 50, 1/2008. (ISSN 0001-5423)

Zajíček, R.: Detski lageri za izgarjanija – cvremenen opit ot Češkata republika. Sbornik ot prva nacionalna konferencija po problemite na termičnata travma i plastična chirurgija, ss. 51-53, Varna, 2007. (ISSN 978-954-579-662-3).

Zajíček R., Kripner, J., Mauer M., Kubok, R., Brož L.:
Následky rozsáhlého termického úrazu u dětí.
Pediatric pro praxi, ročník 11, 1/2010. ISSN 1213-0494.

Gaskel S., Lunke M., O'Shaughnessy J., O'Shaughnessy J., Boekelaar A., Zajicek R., Cripps C., Hendricks S., Reynders C., Wade P., Ross K., Smith H.:
How to Organise Burn Camps, Clubs and Other Support Programmes for Burn Survivors, Basic Principles. Action for Burns & Children, EBA. 2010

Šuca H., Tokarik M., Pafčuga I., Zajíček R.:
Toxická epidermální nekrolýza – naše zkušenosti s celkovou i lokální léčbou.
Hojení ran, 5.ročník, 2/2011, str. 22 – 24. ISSN 1802-6400.

Kubok R., Brož L., Zajíček R.:
Hydrogelové kryty Viacell při léčbě termických úrazů
Hojení ran, 5.ročník, 2/2011, str. 31 – 33. ISSN 1802-6400.

Zajíček R., Stonová C., Tokarik M.:
Pacientka s rozsáhlou netermickou ztrátou kožního krytu
Hojení ran, 5.ročník, 4/2011, str. 13 – 16. ISSN 1802-6400.

Zajíček R., Sticová E., Šuca H., Brož L.: Kožní náhrada Integra® v klinické praxi, *Rozhledy v chirurgii*, 2013, článek v tisku

Grant

IGA NS/10507-3 (2009-2011): Inovace léčby kriticky popálených pacientů krytím široce síťovaných autotransplantátů lidskými keratinocyty kultivovanými *in vitro* na acelulární xenomatrix. Řešitel za 3. LFUK RNDr. Eva Matoušková, CSc. Spoluřešitel za FNKV MUDr. Robert Zajíček

Příloha

Seznam příkládaných publikací :

Zajíček R, Matoušková E, Brož L, Kubok R, Waldauf P, Königova R. New biological temporary skin cover Xe-Derma® in the treatment of superficial scald burns in children. *Burns* 2011; 37(2): 333–337. **IF 1,978**

Zajíček R, Mandys V, Měšťák O, Ševčík J, Königová R, Matoušková E. Human keratinocyte growth and differentiation on acellular porcine dermal matrix in relation to wound healing potential. *ScientificWorldJournal* 2012. doi:10.1100/2012/727352. Epub 2012. **IF 1,524**

Zajíček R, Brož L, Klein L, Bláha J, Königová R, Jirkovská A, Dubský M, Bureš I, Matoušková E. Xe-Derma: nový biologický kryt pro léčbu akutních a chronických ran. *Hojení ran* 2008; 2: 18–27.

Zajíček R, Pafčuga I, Šuca H, Königová R, Brož L, Matoušková E. Hojení široce síťovaných autotransplantátů pomocí autologních epidermálních buněk a bezbuněčné xenodermis Xe-Derma. *Hojení ran* 2012; 6: 12 -18.