

Univerzita Karlova v Praze

**3. lékařská fakulta
Klinika popáleninové medicíny**

Autoreferát disertační práce

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

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

MUDr. Robert Zajíček

Praha 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc

Školící pracoviště: Klinika popáleninové medicíny FNKV

Autor: MUDr. Robert Zajíček

Školitel: prof. MUDr. Radana Königová, DrSc

Školitel konzultant: RNDr. Eva Matoušková, CSc

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.

kde

.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Obsah

SOUHRN	4
SUMMARY	5
ÚVOD A STRUČNÝ PŘEHLED PROBLEMATIKY	6-7
CÍL PRÁCE	7
MATERIÁL A METODY	8-9
Izolace keratinocytů z kůže	8
Kultivace keratinocytů pomocí feeder layer techniky	8
Kultivace a diferenciaci keratinocytů na XD	8
Kultivace a diferenciaci keratinocytů na Biopadu	8
Histologická a imunocytochemická vyšetření XD a kůže	8
Krytí popáleninových ran pomocí XD	9
Krytí odběrových ploch XD v kombinaci s čerstvě izolovanými keratinocyty	9
Krytí rány Flammazinem	9
Krytí ran Askinou Derm	9
VÝSLEDKY	9-14
Kultivace keratinocytů	9
Růst a diferenciaci keratinocytů in vitro a in vivo ve vztahu k hojení ran	10
Vliv epitelizačního potenciálu XD na různé typy popáleninových ran	10
Srovnání efektivity hojení povrchních opaření u dětí po aplikaci XD a hydrokoloidu	11-12
Srovnání efektivity hojení povrchních opaření u dětí po aplikaci XD a hydrokoloidu	0. 12-13
Hojení široce meshovaného autotransplantátu a odběrové plochy pomocí kombinace XD a autologních kožních buněk	0. 13-14
DISKUZE	0. 14-17
ZÁVĚR	0. 17
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	0. 18
PUBLIKAČNÍ AKTIVITA	0. 19-20

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 diferenciacie 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 diferenciacie 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.

ÚVOD A STRUČNÝ PŘEHLED PROBLEMATIKY:

Historie pražské Kliniky popáleninové medicíny je úzce spjata s vývojem a širokým využitím dočasných biologických krytů – xenotransplantátů [Dvořánková et al., 2004]. 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.

Úspěšná obnova porušeného kožního krytu pomocí kožní náhrady je závislá na přítomnosti kmenových keratinocytů nutných k spontánní epitelializaci a na dodání dermálních elementů. Vývoj kožních náhrad jednoznačně směřuje k dvojvrstevné kožní náhradě se snahou kvalitativně i kvantitativně napodobit přirozenou kožní architekturu [Van der Veen et al., 2010].

Dermální náhrady se klasifikují dle původu základní struktury, od které je matrice odvozená [Van der Veen et al., 2010]. Podle tohoto kritéria rozdělujeme dermální náhrady na biologické, kompozitní a syntetické. Xenotransplantáty jsou biologické kryty z prasečí kůže – čerstvé nebo kryoprezervované s omezenou viabilitou [Moserová a Houšková, 1988]. Po enzymatickém odstranění buněk z prasečí kůže a následné sterilizaci je možné připravit acelulární xenodermis.

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]. Základní techniky aplikace buněk na ránu jsou:

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

Moderní a efektivní metodou je okamžité použití suspenze autologních keratinocytů a ostatních typů buněk přítomných v kůži získaných přímo v průběhu operace. Z tenkého dermoepidermálního štěpu kůže pacienta je trypsinizací během 30-45 minut získána suspenze buněk v množství 2-2,5 milionu buněk z 1 cm² [Zweifel et al., 2008].

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.

V práci byly otestovány některé kultivační techniky, charakterizována biologická aktivita Xe-Dermy (XD), 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 byla řešena problematika hojení široce síťovaných autotransplantátů u rozsáhle popálených pacientů pomocí kombinace XD a čerstvě izolovaných autologních epidermálních buněk. Metoda kombinace XD a autologních keratinocytů byla aktuálně využita pro léčbu osmiletého chlapce s popáleninami na 90% těla.

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 pro akceleraci epitelizace ran a 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 rozsíťovanými dermoepidermálními autotransplantáty a čerstvě izolovanými autologními epidermálními buňkami k uzávěru rány u kriticky popálených pacientů?

MATERIÁL A METODY

Izolace keratinocytů z kůže

Vzorek kůže byl inkubován 2 hod při 37°C v 15 ml 0,25% trypsinu v PBS. V kapce media byla oddělena epidermis od dermis, čímž se enzymaticky rozvolněné keratinocyty uvolní do media. Výsledná buněčná suspenze byla nasazena do kultivačních lahvíček pro tkáňové kultury.

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.

Kultivace a diferenciaci keratinocytů na XD

Příprava XD: Den před předpokládaným nasazením buněk byla XD vložena do 60 mm Petriho misky s médiem a inkubována přes noc při 37°C.

Kultivace: Na XD byly nasazeny ozářené 3T3 buňky (1,3x10⁶) a poté keratinocyty v množství 1-3x10⁶. Médium bylo měněno po 2-3 dnech.

Diferenciaci: Po dosažení souvislého porostu byla XD nastříhána na kousky cca 1 cm² a na nerezové mřížce vyzdvižena na rozhraní médium-vzduch. Kultivace probíhala další týden.

Kultivace a diferenciaci keratinocytů na Biopadu

Jako kontrola byl pro kultivaci keratinocytů použit jako substrát koňský kolagen Biopad[®], což je lyofilizovaný 3D kolagen typu I s vláknitou strukturou.

Histologická a imunocytochemická vyšetření XD a kůže

Vzorky XD (s kultivovanými keratinocyty či bez nich) a kůže byly fixovány ve 4% formaldehydu v PBS. Parafínové řezy o síle 5 μm 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, nukleárnímu antigenu p63, CD29 a involucrinu.

Krytí popáleninových ran pomocí XD

XD byla využita jako dočasná biologická náhrada na povrchní popáleniny II.st., hluboké dermální popáleniny a na krytí odběrových ploch.

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) Kožní buňky byly rozvolněny pomocí kitu ReCell[®].

Varianta b) Kůže byla vložena do směsi trypsinu/EDTA 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 kožní 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.

Krytí rány Flammazinem[®]

Jako kontrola byl ke krytí ran st. IIb byl použit antibakteriální krém Flammazine (silversulfadiazin stříbra)

Krytí ran Askinou Derm[®]

XD byla u některých pacientů srovnávána se syntetickým krytem na krytí popálenin Askina Derm.

VÝSLEDKY:

Kultivace keratinocytů

Kultivace keratinocytů feeder layer technikou

Kultivace keratinocytů probíhala na vrstvě letálně ozářených 3T3 buněk v epiteliálním médiu. *Diferenciace keratinocytů na XD:* Po dosažení konfluencie byla XD s buňkami vyzdvižena na rozhraní medium-vzduch a kultivována další týden. Keratinocyty vytvořily několik vrstev epidermis. Keratinocyty kultivované feeder layer technikou na XD v médiu se sérem byly schopné stratifikovat a diferencovat.

Kultivace keratinocytů v bezsérových médiích

V bezsérových médiích keratinocyty nestratifikovaly, rostly pouze v jedné vrstvě

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

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

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. Diferenciaci 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.

Vliv epitelizačního potenciálu XD na různé typy popáleninových ran

V této části práce bylo dokladováno použití XD jako provizorního krytu při léčbě povrchní popáleniny druhého stupně, při léčbě hluboké dermální popáleniny, pro krytí malých hlubokých defektů po odstranění nekrózy a jako dočasný biologický kryt nekrektomovaných ploch před autotransplantací. Bylo prokázáno, že v kombinaci s široce expandovaným transplantátem je vhodné XD použít pro krytí rozsáhlých popálenin. Další oblasti použití - prokázali jsme, že XD je vhodná pro 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 [Zajíček et al., 2008]

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 kožného 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 retrospektivní srovnávací studii byla porovnána efektivita syntetického hydrokoloidního krytu Askina s dočasným biologickým krytem XD v léčbě opaření II. st. u dětí.

Xe-Derma je vysušená acelulární prasečí dermis, která po hydrataci získává biomechanické vlastnosti podobné lidské kůži. Askina je ultratenký hydrogelový kryt s vysokou absorpční aktivitou, složený ze dvou vrstev: vnitřní hydrogelové a zevní semipermeabilní vrstvy.

Do studie bylo zařazeno celkem 86 dětských pacientů (5 měsíců až 7 let), s povrchními opařeními na 1-35% povrchu těla. Pacienti 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). Sledovali jsme data týkající se rozsahu ran, doby hojení, úplné nebo částečné konverze (prohloubení) ran, infekční komplikace, počet re aplikací jednotlivých krytů, počet cm² potřebných pro zhojení 1% povrchu těla (BSA).

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. V porovnání hojení (konverze plochy, infekce, částečná konverze) nebyl mezi skupinami nalezen signifikantní rozdíl.

Důležitým signifikantním rozdílem v obou skupinách byl počet výměn krytu. XD prokázala vyšší adherenci k lůžku rány a proto nemusela být měněna. Počet re aplikací a

proto také počet cm^2 krytu potřebných pro zahojení 1% plochy BSA (57 cm^2) byl signifikantně vyšší u skupiny dětí krytých Askinou v porovnání se skupinou dětí krytých XD. Tento parametr odráží nutnost několikanásobné výměny krytu. Při použití krytu Askina byla ve 40% (17 pacientů ze 43) nutná reapplikace krytu, což bylo způsobeno překročením absorpční kapacity hydrogelu množstvím exudátu. Reapplikace byla nutná v 10 případech 2x, v 6 případech 3x a v jednom případě 4x.

Bylo prokázáno, že XD je vhodným dočasným krytem pro léčbu opařenin u dětí.

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

Publikováno v Hojení ran [Zajíček et al., 2012]

Cílem této části 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

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 standardní trypsinizací. Získaná suspenze buněk je nasprejována či nakapána na ránu. Pro krytí aplikované buněčné suspenze jsme použili XD.

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 3×10^4 buněk/ cm^2 do ok autotransplantátu a plocha kryta meshovanou XD (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[®].

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 vyhodnocení hojení.

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 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*). 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.

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	100%/ 9. den	pevná
						XD	100%/12. den	pevná
						kontrola	50%/20. den	křehká, rozpadá se
2.	žena	47	45	hoření	24.den	buňky+XD	100%/12. den	pevná
						XD	100%/14. den	pevná
						kontrola	40%/20. den	křehká, rozpadá se
3.	žena	50	30	hoření	20.den	buňky+XD	100%/11. den	pevná
						XD	100%/13. den	pevná
						kontrola	40%/20. den	křehká, rozpadá se
4.	muž	61	61	výbuch	22.den	buňky+XD	100%/14. den	pevná
						XD	100%/17. den	pevná
						kontrola	30% /20. den	křehká, rozpadá se

Opakované hojení odběrové plochy u rozsáhle popáleného pacienta

Devítiletý pacient byl přijat s popálením na 90% povrchu těla III. st. Odběrová plocha byla limitována na vlasatou část hlavy, obě nohy, skrotum a hýždí. Provedeny nekrektomie ploch a k uzavěru plochy v rozsahu cca 50% povrchu těla (končetiny, záda) byla použita umělé kůže Integra.

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 byly opakovaně odebírány. Například kůže na dorsu nohou byla odebírána celkově 6x. 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 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.

DISKUZE:

Cílem předkládané dizertační práce bylo posouzení vlivu bezbuněčné prasečí dermis Xe-Dermy na hojení popálenin. 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 diferenciaci 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 diferenciaci 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 korigální sítě zůstaly zachovány. Expresie a distribuce HMW CK, CD29 a involucrinu *in vitro* odpovídala jejich expresi *in vivo* v (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 proliferační 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 neopeitelizace, ačkoli jsme histologicky prokázali v lůžku rány část adnex.

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.

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

Po aplikaci XD na *povrchní opařeninu* 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 reapplikace 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. 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.

Při vyhodnocení sledovaných parametrů obou skupin jsme nenašli statisticky významný rozdíl v době hojení, konverzi a incidenci infekčních komplikací, ačkoli děti léčené XD byly opečeny na statisticky významně větší ploše povrchu těla. Statisticky signifikantní rozdíl byl zjištěn v počtu reapplikací. U skupiny pacientů léčených syntetickým hydrokoloidem Askina byla nutná k úplné epitelizaci opakovaná reapplikace, 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. *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. 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]. V porovnání s XD jsou náklady na léčbu vyšší. XD po aplikaci na plochu pevně přilpěla 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. 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. 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.

Moderní metody pro hojení ran zahrnují léčbu pomocí buněčné terapie – keratinocytů nebo složených biologických krytů obsahujících i více druhů buněk. Byly vyvinuty i komerční kity pro disociaci buněk kůže, např. ReCell[®] – jednorázový kit pro získání buněk z malého štěpu kůže a okamžitou aplikaci buněk na ránu. Princip metody je jednoduchý, trypsinizací se rozvolní vzorek kůže na jednotlivé buňky a suspenze se nakape nebo nasprejuje 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. Xe-Derma svými biomechanickými vlastnostmi 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 transplantaci hlubokých popálenin III. st. a krytí vaskularizované náhrady dermis Integry (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. Makroskopické i histologické výsledky naší studie u rozsáhlé 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.

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. 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).

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.

Zkrácený seznam použité literatury:

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

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.

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.

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.

Herndon DN. *Total Burn Care*. Saunders Elsevier, 3rd Edition; 2007: 127–136.

Koster MI, Roop DR. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J Dermatol Sci* 2004; 34(1): 3–9.

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.

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

Pruniéras M, Régnier M, Woodley D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 1983; 81(1 Suppl): 28s-33s.

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.

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.

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

Zweifel CJ, Contaldo C, Köhler C, Jandali A, Kunzi 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 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, Pačuga 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, Zajicek R, Toupalík P. Early and late fatal complications of inhalation injury. *Acta Chir Plast*. 2002;44(2):51-4.
Musilová A, Zajicek 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.
Pediatrice 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 92/2013, číslo 5, str. 283-287, ISSN 1805-4579

Knihy:

Königová R., Bláha J. a kolektiv
Komplexní léčba popáleninového traumatu, Karolinum 2010.
ISBN 978-80-246-1670-4.

Kapitoly :Kožní banka a kultivační laboratoř

- Epidermální náhrady, str. 149-151.

- Dermální náhrady, str. 151-160.

Metabolizmus a nutriční u závažného popáleninového traumatu, str. 296-303