

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. Ondřej Měšťák

Užití biologických materiálů k náhradě tkání v plastické chirurgii

Srovnání užití síťovaných a nesíťovaných extracelulárních matic pro rekonstrukci břišní stěny na animálním modelu

Use of biological materials for tissue substitution in plastic surgery

Comparison of cross linked and non cross linked extracellular matrices for abdominal wall reconstruction on an animal model

Disertační práce

Školitel: MUDr. Andrej Sukop, PhD.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 10.11.13

Ondřej Měšťák

Poděkování:

Děkuji mému školiteli As. MUDr. Andreji Sukopovi PhD. za vedení v průběhu mého postgraduálního studia. Jeho práce je pro mě inspirací.

Děkuji za poskytnuté konzultace z oblasti plastické chirurgie doc. MUDr. Janu Měšťákovi, CSc., z oblasti buněčné biologie MUDr. Pavlovi Veselému, CSc. a z oblasti biomateriálů RNDr. Vladimíru Stoyovi CSc. RNDr. Evě Matouškové, CSc. děkuji za kultivace buněk a konzultace z oblasti buněčné biologie.

Děkuji pracovníkům firmy MEDICEM za poskytnutí experimentální nesíťované acelulární prasečí dermis. Poděkování patří RNDr. Tomáši Druneckému a ing. Pavle Chotěborské PhD za pomoc s mechanickým testováním.

OBSAH:

Úvod.....	11
Složení extracelulárních matric -----	12
Zhotovení extracelulárních matric -----	12
Užití extracelulárních matric-----	13
Původ v současnosti užívaných extracelulárních matric-----	14
Biomechanické chování biologických sítěk-----	17
Síťování biologických sítěk -----	17
Biologická aktivita -----	18
GAL antigeny -----	19
Užití extracelulárních matric v chirurgii-----	20
Užití extracelulárních matric při rekonstrukci prsu po ablaci pro nádorové oněmocnění-----	30
Kmenové buňky-----	34
Tkáňové inženýrství -----	34
Animální modely břišní kýly -----	36
Cíle práce	38
Hypotéza	38
Metodika	39
Izolace a kultivace kmenových buněk -----	41
Kontrola identity kmenových buněk -----	41
Nasazení buněk na biologické sítě-----	42
Experimentální model kýly -----	42
Histologické vyšetření -----	45
Mechanické vlastnosti -----	46

Statistická analýza	47
Výsledky	48
Kultivace buněk, diferenciacce a kontrola identity	48
Makroskopické nálezy při explantaci	49
Histologické nálezy	50
Mechanické testování	60
Diskuze	65
Závěr	70
Literatura	71

Abstrakt (ČJ):

Úvod: Extracelulární matrice jsou biologické materiály stále častěji užívané v tkáňovém inženýrství a rekonstrukční chirurgii. Jsou schopné vaskularizace, což v chirurgických indikacích snižuje riziko infekce. V rekonstrukční chirurgii se užívají např. při rekonstrukci břišní stěny v kontaminovaných oblastech. Existují různé druhy těchto materiálů v závislosti na jejich původu a zpracování. Cílem práce bylo srovnání síťované a nesíťované acelulární prasečí dermis na dlouhodobém modelu břišní kýly na malém zvířeti s hodnocením histologického nálezu a pevnosti vrůstání do tkání příjemce. Dalším cílem bylo zjištění vlivu obohacení acelulární prasečí dermis o kmenové buňky na histologický nálezu a pevnost vrůstání do tkání příjemce na animálním modelu rekonstrukce břišní stěny.

Metodika: Byla provedena prospektivní studie rekonstrukce břišní stěny na potkanu kmene Wistar (n=42). Část materiálů jsme obohatili o autologní kmenové buňky derivované z tukové tkáně. Explantace byla provedena po 3, 6 a 12 měsících. Materiály byly vyšetřeny histologicky na neovaskularizaci, tloušťku kapsuly, celularizaci implantátu, leukocyty a obrovskobuněčnou reakci. Mechanometricky byla testována pevnost materiálů a jejich vrůstání do hostitelských tkání.

Výsledky: Srovnání skupin s obohacením o kmenové buňky nevykázalo žádné signifikantní rozdíly v parametrech síla pouzdra, reakce na cizí těleso, celularizace a vaskularizace. Síla vrůstání do hostitelských tkání byla signifikantně vyšší u nesíťované acelulární prasečí dermis obohacené o kmenové buňky. Porovnání síťovaných a nesíťovaných materiálů bez obohacení o kmenové buňky ukázalo signifikantně vyšší celularizaci a vaskularizaci u nesíťovaných materiálů. 3 měsíce od implantace, nesíťované acelulární prasečí dermis disponovaly signifikantně vyšším napětím potřebným pro rupturu vzorku, v 6 a 12 měsících nebyl rozdíl signifikantní.

Závěr: Výsledky naší studie prokázaly, že nesíťovaná acelulární prasečí dermis disponuje lepší biokompatibilitou a umožňuje vyšší vaskularizaci a celulózní penetraci než síťovaná acelulární prasečí dermis. Osídlení biologických sítěk mezenchymálními kmenovými buňkami nevedlo k signifikantnímu zvýšení vaskularizace u síťované ani u nesíťované acelulární prasečí dermis. U nesíťované acelulární prasečí dermis se po přidání kmenových buněk síla vrůstání do tkání příjemce signifikantně zvýšila.

Klíčová slova: extracelulární matrice, acelulární matrix, biokompatibilita, animální model, kýla, síťování, mezenchymální kmenové buňky, rekonstrukce břišní stěny, rekonstrukce prsu

Abstrakt (EN):

Background: Biological meshes are biomaterials consisting of extracellular matrix that are used in surgery particularly for hernia treatment or thoracic wall reconstruction. They are capable of vascularization, that decreases risk of infection, especially when used in contaminated fields. This study compared the strength of incorporation and biocompatibility of two porcine-derived grafts (cross-linked and non-cross-linked) in a rat hernia model. In addition, we hypothesized that combination of extracellular matrices with autologous mesenchymal stem cells used for hernia repair would result in increased vascularization and increased strength of incorporation.

Methods: We cultured autologous adipose-derived stem cells harvested from the inguinal region of Wistar rats on part cross-linked and non-cross-linked porcine extracellular matrices. Standardized 2 x 4 cm fascial defect was created in 42 Wistar rats and repaired with a cross-linked or a non-cross-linked graft either enriched or non-enriched with stem cells. The rats were sacrificed 3, 6 and 12 months later. The strength of incorporation, vascularization, cellular invasion, foreign body reaction and capsule formation were evaluated.

Results: Comparison of stem cell enriched and non-enriched groups showed no significant differences in the capsule thickness, foreign body reaction, cellularization or vascularization. In the non-cross-linked extracellular matrix, the strength of incorporation was significantly higher in the stem cell group than in the acellular group. In comparison of non-stem cell enriched grafts, the average level of cellularization and vascularization was significantly higher in the non-cross-linked grafts than in the cross-linked grafts at 6 months. 3 months after implantation non-cross-linked grafts showed significantly higher strength of incorporation; at 6 and 12 months was the difference insignificant.

Conclusion: The results of our study suggest that non-cross-linked grafts are more biocompatible and allow a more rapid and higher degree of cellular penetration and vascularization, resulting in stronger attachment to the tissues. Seeding of biological meshes with stem cells does not significantly contribute to their increased vascularization. In cross-linked materials it does not ensure increased strength of incorporation, in contrast to non-cross-linked materials where the difference is significant.

Keywords: extracellular matrix, scaffold, biologics, acellular matrix, histometrics, biocompatibility, animal model, cross-linking, hernia, mesenchymal stem cells, MSCs, ADSC

Zkratky: *ECM* (extracellulární matrice), *SVF* (stromální vaskulární frakce), *ADSC* (adipose derived stem cells), *H-MEM* (Minimum Essential Medium with Hanks' salts)

Úvod

Extracelulární matrice jsou biologické materiály stále častěji užívané v tkáňovém inženýrství a rekonstrukční chirurgii. Jsou odvozené od živočišných tkání, jako např. od speciálně zpracovaných srdečních chlopní, acelulárních matric odvozených od lidské nebo vepřové dermis, stěny tenkého střeva a osrdečnice. Disponují vysokou biokompatibilitou a schopností inkorporace do tkání příjemce. Jsou schopné vaskularizace, což v chirurgických indikacích snižuje riziko infekce. Díky tomu je jejich použití možné i v kontaminovaných oblastech na rozdíl od syntetických materiálů, u kterých je riziko infekce vysoké.

Podle jejich chemického a fyzikálního zpracování jsou tyto biomateriály přijatelně biokompatibilní a dostatečně stálé i pro dlouhodobé náhrady tkání. V rekonstrukční chirurgii se užívají např. při plastikách kýl v infikovaných oblastech, augmentaci měkkých tkání a rekonstrukcích prsu.

Extracelulární matrice jsou produktem buněk každé tkáně a skládají se z různých proteinů, především z kolagenních struktur a glykoproteinů, uspořádaných v trojdimensionální síti. Tyto proteiny poskytují extracelulárním matricím mechanickou pevnost. Jejich složení je unikátní v každé tkáni.

Nejdůležitějším krokem zpracování extracelulárních matric je decelularizace k odstranění cizích celulárních antigenů, které způsobují rejekci tkáně. V závislosti na dalším zpracování tyto biologické materiály rozdělujeme na síťované a nesíťované. Síťované materiály jsou stabilnější, ale disponují menší biokompatibilitou a slabším vrůstáním do tkání příjemce.

Nedávno se objevil nový typ acelulárního biomateriálu vyvinutého v České Republice pod názvem Xe-Derma. Tento anizotropní acelulární biomateriál je odvozen od práce na vývoji rekombinované kůže za pomoci xenodermis a kultivovaných keratinocytů v Ústavu Molekulární Genetiky AVČR a na Klinice popáleninové medicíny v Praze. Nyní je používán jako dočasný kryt k urychlení epitelizace při hojení ran, jako jsou popáleniny, bércové vředy nebo dermabraze. Hlavním znakem této xenomatrix je výrazná podpora regenerace tkáně na jejím povrchu. Xe-Derma se strukturně liší od

ostatních biomateriálů své kategorie díky svému zpracování (je velmi podobná nativní dermis, je anisotropní, není zhomogenizovaná, má zachované kolagenní struktury) a dá se předpokládat, že se bude lišit i její vhojování po implantaci.

Složení extracelulárních matric

Vzhledem k tomu, že komponenty extracelulárních matric jsou homogenní mezi různými druhy živočichů, jsou tyto materiály biologického původu po decelularizaci dobře tolerovány lidskými příjemci. Nejvíce zastoupeným proteinem je kolagen, který představuje asi 90% suché váhy. Kolagen typu I je nejčastější v šlachových a fasciálních komponentech, poskytující pevnost pro mechanickou zátěž. Jiné typy kolagenů se vyskytují v mnohem menším množství. Druhým nejčastějším proteinem v extracelulárních matricích je fibronectin. Tato molekula je důležitá pro buněčnou adhezi na submukosách, bazálních membránách, intersticiálních tkáních a jiných komponentech. Mezi jiné molekuly, které stojí za zmínku patří laminin, který se nachází v bazálních membránách podobně jako fibronectin a glykosaminoglykany, jejichž množství závisí na lokalitě tkáně, věku a mikroprostředí. Glykosaminoglykany jsou schopné zadržovat vodu. Nejvíce známý glykosaminoglykan je kyselina hyaluronová, která je extensivně zkoumaná ve vztahu k hojení ran, zejména ve fetálních tkáních. Užívá se také v kosmetické chirurgii k augmentaci měkkých tkání. Posledním důležitou molekulou extracelulárních matric jsou růstové faktory, díky kterým se tyto biologické materiály tak významně odlišují od syntetických.

Zhotovení extracelulárních matric

Získání extracelulárních biologických materiálů zahrnuje mechanické, fyzikální a enzymatické kroky zpracování, jejímž výsledkem je kompletní decelularizace zdrojové tkáně (Crapo, 2011; Gilbert, 2006; Keane, 2012). Existuje mnoho tkání, ze kterých je

možné extracelulární matrice připravit. Nejčastěji se jedná o dermis (Armour, 2006), močový měchýř (F. Chen, 1999; Ewalt et al., 1992; Freytes, 2004; Gilbert, 2005), submukózu tenkého střeva (Badylak, 1989; Kropp et al., 1995; Sacks & Gloeckner, 1999) a perikard (Deeken et al., 2011; Gaertner, 2007). Jelikož je většina tkání užívaných k získání extracelulárních matric alogenní nebo xenogenní, bez decelularizace by jejich celulární antigeny byly rozpoznány jako cizí a následně by byla indukována imunitní odpověď. Jak bylo dříve zmíněno, proteiny extracelulárních matric jsou podobné napříč živočišnými druhy a proto jsou dobře tolerovány i u xenogenních příjemců (Bernard, et al., 1983a; Bernard, et al., 1983b; Constantinou & Jimenez, 1991; Exposito, 1992). Cílem decelularizačního procesu je odstranění veškerého celulárního a nukleárního materiálu, zatímco složení, mechanické vlastnosti a biologická aktivita zůstávají zachovány.

Pro decelularizaci se užívají různé metody jako například ošetření ultrazvukem, zmrazení a rozmrazení nebo masáž. Tyto metody narušují buněčné membrány, uvolňují obsah buněk a usnadňují promývání a odstranění buněčného obsahu. Ošetřením činiteli jako trypsin, detergenty nebo iontové roztoky pokračuje ničení intercelulárních vazeb a buněčných membrán. Kombinace těchto metod se liší mezi různými tkáněmi v závislosti na jejich složení (Clemens van Blitterswijk, 2008).

Pokud mají být extracelulární matrice užity jako zdravotnické prostředky, musí být sterilizovány. Metody pro sterilizaci zahrnují gamma záření nebo expozici ethylenem oxidu (Freytes et al., 2004).

Užití extracelulárních matric

Extracelulární matrice se užívají v mnoha aplikacích, jako například k náhradě kožního krytu (Mostow et al., 2005), rekonstrukci močového traktu (le Roux, 2005; Mantovani, 2003; Mertsching, 2005), rekonstrukci šlach (Badylak et al., 1995),

rekonstrukci břišní stěny (Catena et al., 2007; Hammond, 2008; Hiles, 2009; Hsu et al., 2009; Parker, 2006; Ramsden, 2009; Smart, 2012), esofageální rekonstrukci (Badylak et al., 2005; Badylak, 2000; Lopes, 2006) a při rekonstrukci prsu po mastektomii (Nahabedian, 2009a).

Původ v současnosti užívaných extracelulárních matric

V současné době se v klinické medicíně a tkáňovém inženýrství užívá velké množství extracelulárních matric. Jak bylo výše zmíněno, jsou odvozené z dermis (Armour et al., 2006), močového měchýře (F. Chen et al., 1999; Ewalt et al., 1992; Freytes et al., 2004), submukózy tenkého střeva (Badylak et al., 1989; Kropp et al., 1995; Sacks & Gloeckner, 1999) a perikardu (Deeken et al., 2011; Gaertner et al., 2007). Všechny tyto materiály mají podobné složení - jsou to extracelulární hmoty. Odpověď příjemce na implantaci se liší u každého materiálu. Je to dáno různým zpracováním, které je u každého materiálu jiné (Tab. 1).

..

Produkt	Výrobce	Původ	Zpracování	Forma	Indikace
Strattice	Lifecell	Prasečí dermis	Nesítovaná	Suchý list	Rekonstrukce břišní stěny
XenoDerm	A care	Prasečí dermis	Nesítovaná	Suchý list	Hojení ran
Alloderm	Lifecell	Lidská kůže	Sítovaná	Suchý list	Rekonstrukce břišní stěny, rekonstrukce prsu, augmentace měkkých tkání, hojení ran
Surgisis	Cook	Prasečí submukóza tenkého střeva	Sítovaná	Suchý list	Rekonstrukce břišní stěny, terapie rektokutánní píštěle
Permacol	Covidien	Prasečí dermis	Sítovaná Hexamethylen Diisocyanatem	Prehydratovaný list	Rekonstrukce břišní stěny
Collamend	Bard	Prasečí dermis	Sítovaná	Suchý list	Rekonstrukce břišní stěny
Allomax	Bard	Lidská kůže	Nesítovaná	Suchý list	Rekonstrukce břišní stěny
Oasis	Healthpoint	Prasečí submukóza tenkého střeva	Nesítovaná	Suchý list	Léčba ran a popálenin
CuffPatch	Arthrotek	Prasečí submukóza tenkého střeva	Sítovaná	Prehydratovaný list	Rekonstrukce měkkých tkání
TissueMend	TEI Biosciences	Bovinní fetální kůže	Nesítovaná	Suchý list	Terapie a zpevnění měkkých tkání rotátorové manžety
Durepair	TEI Biosciences	Bovinní fetální kůže	Nesítovaná	Suchý list	Rekonstrukce kraniální a spinální dura mater
Xenform	TEI Biosciences	Bovinní fetální kůže	Nesítovaná	Suchý list	Terapie rektálního, uretrálního a vaginálního prolapse, rekonstrukce pánevního dna, uretrální sling
Primatrix	TEI Biosciences	Bovinní fetální kůže	Nesítovaná	Suchý list	Hojení ran
GraftJacket	Wright Medical Tech	Lidská kůže	Sítovaná	Suchý list	Hojení vředů

Tabulka 1: V současnosti užívané biologické sítky

Produkt	Výrobce	Původ	Zpracování	Forma	Indikace
Durasis	Cook	Prasečí submukóza tenkého střeva	Nesítovaná	Suchý list	Rekonstrukce dura mater
Stratasis	Cook	Prasečí submukóza tenkého střeva	Nesítovaná	Suchý list	Terapie močové inkontinence
OrthADAPT	Pegasus Biologicals	Koňský pericard	Sítovaná	N/A	Rekonstrukce měkkých tkání v chirurgii
DuraADAPT	Pegasus Biologicals	Koňský pericard	Sítovaná	N/A	Rekonstrukce dura mater
Axis dermis	Mentor	Lidská kůže	Nesítovaná	Suchý list	Terapie pánevního prolapsu
Suspend	Mentor	Lidská fascia lata	Nesítovaná	Suchý list	Uretrální sling
Restore	DePuy	Prasečí submukóza tenkého střeva	Nesítovaná	N/A	Rekonstrukce měkkých tkání
Veritas	Synovis	Bovinní pericard	Sítovaná glutaraldehydem	Prehydratovaný list	Rekonstrukce břišní stěny
Dura-Guard	Synovis	Bovinní pericard	Sítovaná glutaraldehydem	Prehydratovaný list	Rekonstrukce kranální a spinální dura mater
Vascu-Guard	Synovis	Bovinní pericard	Sítovaná glutaraldehydem	N/A	Rekonstrukce cév
Peri-Guard	Synovis	Bovinní pericard	Sítovaná glutaraldehydem	N/A	Rekonstrukce perikardu
FlexHD	Ethicon	Lidská kůže	N/A	Prehydratovaný list	Rekonstrukce prsu, rekonstrukce břišní stěny
XeDerma	Medicem	Prasečí dermis	Nesítovaná	Suchý list	Hojení ran

Tabulka 1: V současnosti užívané biologické sítky (pokračování)

Biomechanické chování biologických sítěk

Po implantaci přejímají tyto acelulární materiály funkci tkáně (např. břišní stěny) a postupně se nahrazují zdravou, přirozenou a funkční tkání příjemce. Tento proces, tak zvané remodelování, zahrnuje překrývající se biodegradaci implantátu a vytváření nové tkáně. Jedná se o normální odpověď příjemce na implantaci materiálu. Oba tyto procesy musí být precizně vyrovnané pro optimální výsledek. Implantát by neměl ztrácet pevnost následkem biodegradace před tím, než je nahrazen dostatečně vyžralou tkání pro plné převzetí jeho mechanické funkce. Při implantaci materiálu musíme brát v úvahu přirozené mechanické síly, které mohou ovlivnit proces remodelace. Biologické sítky by měly mít mechanické vlastnosti podobné přirozené tkáni.

V případě potřeby vyšší pevnosti (např. u operace rotátorové manžety, Achylovy šlachy nebo rekonstrukce břišní stěny), mohou být vytvořeny vícevrstvé materiály pro zvýšení pevnosti. Vrstvení se většinou provádí laminováním hydratovaných vrstev (sheetů) ve vakuu. Vakuum indukovaná komprese vrstev extracelulárních matric vyústí ve vytlačení vody z tkáně a upevní vrstvy k sobě.

Napětí a mechanické zatížení ovlivňuje osídlení biologické sítky fibroblasty a jejich syntézu kolagenu. Tyto změny mohou vést ke zlepšení biomechanického chování sítky. Na druhou stranu nedostatečné mechanické zatížení může zvýšit produkci metaloproteináz a vyústit v rychlou resorbci biologické sítky.

Sítování biologických sítěk

Sítování je metoda zavedená v oboru biomateriálů již od padesátých let minulého století, kdy byl polyvinyl alkohol síťovaný glutaraldehydem za účelem výroby IVALONU. IVALON byl jeden z prvních implantovatelných syntetických biomateriálů. Nebyl nicméně vhodný ke klinickému použití vzhledem k pomalému uvolňování

toxického glutaraldehydu (Harrison, 1957). Většina moderních biomateriálů, v současnosti užívaných v klinické praxi, se snaží síťování vyhnout. Například ze seznamu užívaných biologických sítěk (Tabulka 1) většina postrádá tento typ zpracování (Smart et al., 2012).

Dle některých studií se nezpracované extracelulární matrice bez chemického síťování rychle po implantaci vztřebávají. (de Castro Bras, 2010; de Castro Bras, 2012). Pro snížení vstřebávání a zvýšení pevnosti se užívalo mnoho různých činidel od aldehydu po hexamethylen diisocyanát (Oliver, 1982; Oliver, 1980).

Proto výrobci začali biologické síťky síťovat s cílem učinit je odolnějšími. Nicméně stále probíhá diskuze o tom, jak hodně jsou vlastnosti biologických materiálů síťováním ovlivněny (Butler et al., 2010; de Castro Bras et al., 2010; 2012; Deeken et al., 2011; Mulier, 2011). Pokusy výrobců biologických sítěk zlepšit jejich pevnost síťováním totiž zhoršují biokompatibilitu a pevnost vrůstání síťky do tkání příjemce. Materiály jsou příliš kompaktní pro prorůstání cév a ostatních tkání, což vede ke slabšímu spoji mezi materiálem a tkání příjemce, jako např. břišní stěny.

Biologická aktivita

Extracelulární matrice obsahují množství složek, které se účastní v procesu hojení. Tyto komponenty, zejména růstové faktory, sídlí jako neaktivní proteiny v intaktní extracelulární matici a mohou být uvolněny ve formě aktivních peptidů v průběhu degradace matrice. Posléze mohou pomoci regulaci regenerace tkáně antimikrobiálními (Brennan et al., 2006; Sarikaya et al., 2002), chemotaktickými (Badylak, 2001; F. Li et al., 2004; Zantop, 2006) a angiogenetickými (F. Li et al., 2004) faktory.

Komponenty extracelulárních matic prasečí submukózy tenkého střeva a submukózy močového měchýře disponují antibakteriální aktivitou proti gram-positivním i gram - negativním bakteriím (Sarikaya et al., 2002). Sarikaya zjistil tuto

aktivitu izolací a degradací matric s užitím tepla a kyselin. Produkty tohoto procesu byly smíchány s koloniemi staphylococcus aureus a escherichia coli a byly vyšetřeny po 24 hodinách. Oba materiály demostrovaly silný antibakteriální efekt proti oběma typům bakterií. Tato vlastnost byla ověřena v mnoha pre-klinických a klinických aplikacích - např. ve vaskulární rekonstrukci (Jernigan et al., 2004), rekonstrukci ureteru (Mantovani et al., 2003), kardiovaskulární chirurgii (Ruiz et al., 2005), rekonstrukci břišní stěny (Catena et al., 2007; Smart et al., 2012), operaci perianálních píštělí (M. Smith, 2007) a rekonstrukci prsu (Nahabedian, 2009a). Krátkodobá antibakteriální aktivita produktů degradace extracelulárních matric poskytuje krátce po implantaci bezprostřední ochranu vůči infekci.

GAL antigeny

Alfa-GAL je glykokonjugát přítomný na buněčných membránách savců a bakterií. Nevyskytuje se ale u člověka, který disponuje vysokými titry anti-gal protilátek. Transplantace prasečích orgánů člověku (xenotransplantace) by byla zatížena hyperakutní rejekcí zprostředkovanou přirozenými protilátkami člověka proti prasečím antigenům, fixací komplementu na endoteliálních buňkách a rychlým nástupem intravaskulární koagulace. V současné době je jasné, že hlavním cílem přirozených IgM a IgG protilátek jsou epitopy koncových karbohydrátů alfa-GAL (1,3) GAL, které jsou tvořené alfa 1,3 galactosyl transferasou, která umísťuje zbytkové koncové galaktosy v alfa propojení k další galaktóze. Alfa 1,3 galactosyl transferáza v prasatech vede k velmi vysoké endoteliální expresi GAL alfa -(1,3) GAL a vysvětluje hyperakutní rejekci vaskularizovaných orgánů. Parenchym jater a ledvin také obsahuje vysoké hladiny GAL alfa-(1, 3)GAL. Transplantace těchto tkání z prasete do člověka by byla neúspěšná, jak je nyní přesně popsáno v rámci antigenů a protilátek (Sandrin & McKenzie, 1994).

V průběhu decelularizace biologických sítěk je však většina buněk s GAL antigeny odstraněna. U příjemců acelulárních štěpů je možné detekovat signifikantní

snížení koncentrace anti-alfa-GAL IgM protilátek oproti příjemcům klasických prasečích chlopní (Mathapati, 2011). GAL antigeny jsou kvůli výše uvedenému důležité pro celý obor transplantologie.

Užití extracelulárních matric v chirurgii

Rekonstrukce břišní stěny

Břišní kýla je definovaná jako protruze nitrobřišního orgánu defektem ve fascii břišní stěny. Kýla může vzniknout na různých místech těla, ale břišní stěna je zdaleka nejčastější. Může se projevovat viditelným vyklenutím břišní stěny nebo bolestivostí.

Nejčastějším typem břišní kýly je kýla tříselná (až 75%), následovaná umbilikální kýlou a kýlou v jizvě, která vzniká po předchozích operacích.

Břišní operace vyústí v kýlu u 11–23 % případů (Mudge & Hughes, 1985). Tato komplikace většinou vzniká časně v pooperačním období, i když nemusí být patrná po mnoho let (Höer, 2002). Vzhledem k velkému počtu prováděných laparotomií se jedná o časté onemocnění. Vysoké míry recidiv kýl v mnoha publikovaných studiích potvrzují, že zlepšování technik rekonstrukcí kýl představuje do budoucna významnou výzvu.

Defekty břišní stěny představují obecně velmi heterogenní skupinu. Liší se nejen anatomickou složitostí a rozsahem, ale také celkovým stavem pacienta. Tyto faktory mají vliv na typ zákroku a také finální výsledek operace. Neexistuje žádná standardizovaná klasifikace pro velikost kýl. Jednou z nejjednodušších možností je klasifikace dle nejširšího místa kýlní branky (Eriksson, Rosenberg, & Bisgaard, 2013). Kýly můžeme také na reponibilní a nereponibilní. Akutní nereponibilní (uskřinutá) kýla se řadí mezi náhlé příhody břišní a vyžaduje neodkladnou terapii. Orgán z břišní dutiny, nejčastěji omentum nebo střevo, je zachycen v kýlní brance. Uskřinuté kýly jsou často bolestivé a může se u nich vyskytnout nevolnost, zvracení a horečka. Uskřinutá kýla může vyústit v nekrózu břišních orgánů následovanou peritonitidou a sepsí. Největší riziko inkarcerace má kýla umbilikální.

Přestože jsou obecné chirurgické přístupy podobné u všech rekonstrukcí břišní stěny, složitější situace vyžadují pečlivou předoperační přípravu a důraz na minimalizování rizika infekce a recidivy (Ghazi, 2011). Díky rozvoji rekonstrukce břišní stěny mohou být její defekty, které byly dříve považovány za neřešitelné, dnes úspěšně operovány a pacientům s dříve špatnou kvalitou života je nyní nabízeno řešení. Mezi nejdůležitější pokroky patří zavedení metody separace komponentů, dostupnost nových syntetických sítěk a nástup biologických sítěk (extracelulárních matric) pro rekonstrukci břišní stěny (Ventral Hernia Working Group et al., 2010).

První volbou při operaci kýly je sutura okrajů kýlní branky k sobě (Bertolini, 2012). Často je spojená s použitím sítky. Touto technikou je možné dobře uzavřít menší defekty břišní stěny. Avšak čím je defekt břišní stěny větší, tím je větší tenze na výslednou suturu. Zvyšující se napětí tkání vede ke zvýšenému riziku recidiv. Pokud pak velikost defektu přesáhne určitou míru, je technicky nemožné sešít okraje kýlní branky k sobě. V tomto případě volí většina chirurgů přemostění sítkou. V případě přemostění se může síťka časem odpojit od stěny břišní (Blatnik, 2008).

Rozsáhlé defekty břišní stěny je možné řešit také laparoskopicky s umístěním sítky intraperitoneálně. Nevýhodou této techniky je fakt, že neřeší nadbytek měkkých tkání, zejména v oblasti kýlního vaku, který je případně nutné řešit otevřenou plastikou. Pak se výhoda miniinvazivního výkonu stírá.

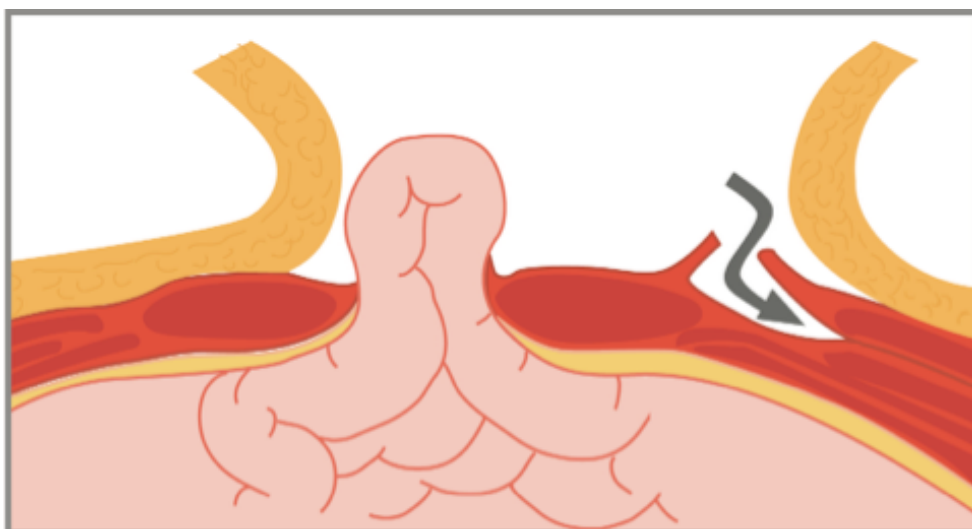
Níže popsaná metoda separace komponentů popsaná Ramirezem (O. M. Ramirez, 1990) nabízí výhody oproti klasickým metodám u větších defektů břišní stěny. Touto technikou můžeme předejít užití sítky a s ní spojených komplikací; kontrahující šikmé břišní svaly jsou připojeny zpět do inzerce v linea alba a intraabdominální tlak je obnoven. Díky tomu se předejde diafragmatické dysfunkci, která často vzniká při nevhodných korekcích defektů břišní stěny. Separace komponentů také vede ke snížení rizika recidivy kýly (Eriksson et al., 2013). Jelikož je popsaná technika indikována u rizikových pacientů, často se zvýšeným rizikem infekce, užívá se často ke zpevnění sutury biologických materiálů (extracelulárních matric) namísto syntetických sítěk (Novitsky & Rosen, 2012; Patel, 2012).

Technika operace:

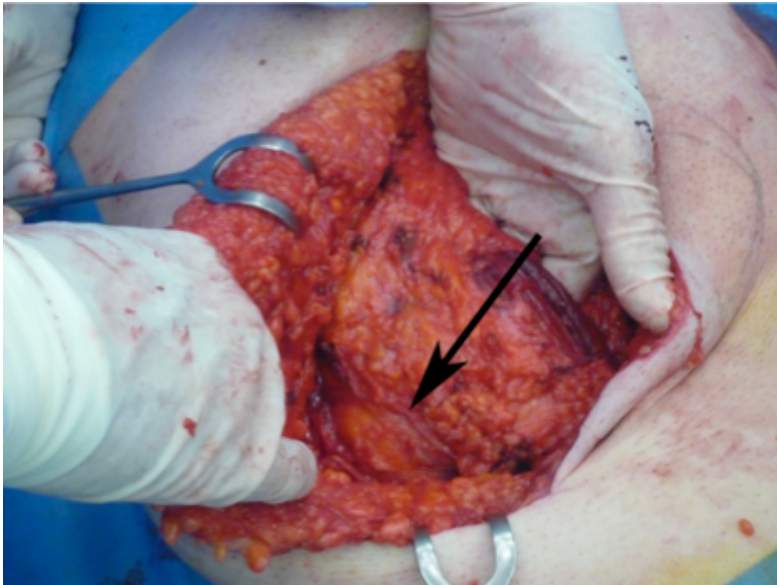
Začínáme incizí nad místem kýly, event. v původní jizvě. Po otevření kýlního vaku provádíme deliberaci jeho obsahu s repozicí do peritoneální dutiny. Kýlní vak resekujeme a uzavíráme v úrovni peritonea, kterého obvykle bývá nadbytek, a sutura je bez napětí.

V případě použití laterální separace komponentů protínáme fascii zevního šikmého svalu v místě, kde přechází ve fascii přímých svalů břišních (Obr. 1, 2). Při správném určení této oblasti se jedná o prakticky bezkrevnou incizi, ke které obvykle používáme elektrokauter. Rozsah uvolnění je závislý částečně na velikosti defektu, ale nejčastěji je uvolnění tkáňových struktur v celém rozsahu od oblouku žeberního až téměř do třísla. Podmínkou pro tento manévr je rozsáhlejší preparace kůže a podkoží od místa incize ve střední čáře nad fascií svalů až široce laterálně za místo incize fascie, tedy až po šikmé svaly břišní. Dle našich zkušeností je možné posunout okraj fascie o 5–10 cm mediálně z každé strany.

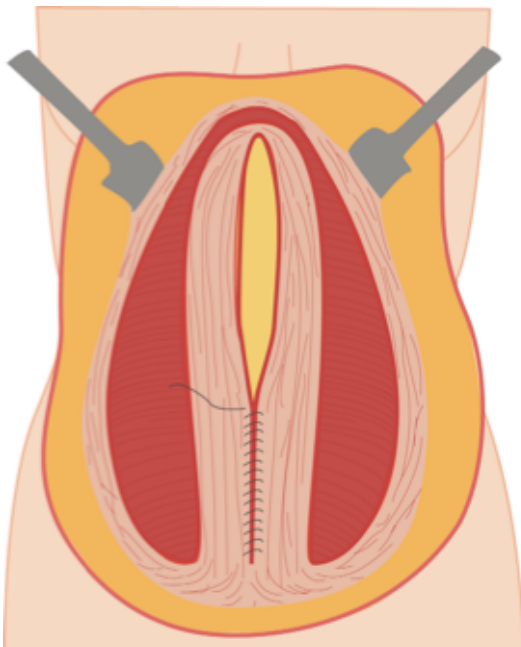
Suturu kýlní branky provádíme jednotlivým nevstřebatelným stehem nebo pokračujícím stehem loopem PDS v jedné vrstvě (Obr. 3).



Obr. 1: Schéma protnutí fascie zevního šikmého svalu v místě, kde přechází ve fascii přímých břišních svalů

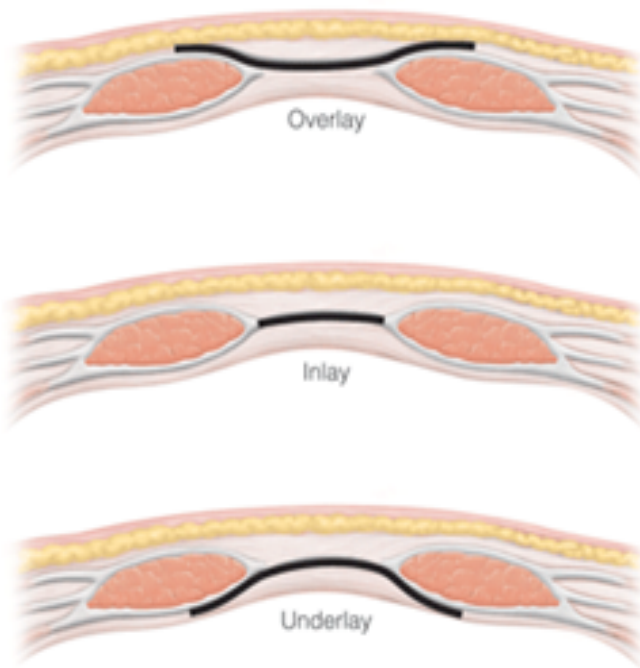


Obr. 2: Protnutí fascie zevního šikmého svalu při operaci (označeno šipkou) umožní roztažení komponent a posun fascie přímých břišních svalů mediálně (ruka operátora prostrčena střední laparotomií do dutiny břišní)



Obr. 3: Sutura defektu břišní stěny (kýlní branky) pokračujícím stehem

Pokud je riziko rekurence kýly neuniformní, překrýváme suturu sítkou k dalšímu zpevnění. Sítka mohou být lokalizovány v různých pozicích ve vztahu k břišní stěně. Mluvíme o tzv. umístění overlay (nad fasciemi břišních svalů), inlay (mezi fasciemi břišních svalů) a underlay (pod fasciemi břišních svalů nad peritoneem) (obr. 4). Lokalizaci materiálu volíme na základě několika faktorů, z nichž nejdůležitější jsou zkušenost operátora a zvyk daného pracoviště. Při rozhodování o umístění sítky musíme brát v potaz také typ defektu. V případě intraperitoneálního umístění sítky při laparoskopické operaci musíme užít sítku, která je vhodná k umístění do břišní dutiny. V případě použití nesprávné sítky může dojít k závažným intraperitoneálním srůstům.



Obr. 4: umístění sítěk ve vztahu k břišní stěně

Široká preparace nad fascií nám umožní ukotvit sítku do větší vzdálenosti od okraje defektu. Sítku kotvíme po obvodě i v ploše nevstřebatelnými stehy. V případě umístění underlay je sítko uloženo pod zadní stranu přímých svalů břišních, tedy do dutiny, kterou jsme vytvořili odloučením svalů od zadního listu jejich fascie. Pak kotvíme sítku U stehy přes fascii a uzlenými na zevní straně předního listu fascie přímých svalů břišních. Těchto stehů používáme podle rozsahu defektu 4–7. Zmíněné umístění sítky má výhodu jejího většího překrytí měkkými tkáněmi, přesto je nevhodnější použití vstřebatelných sítěk.

Na konci operace následuje sutura kůže a podkoží s redukcí těchto tkání v případě potřeby.

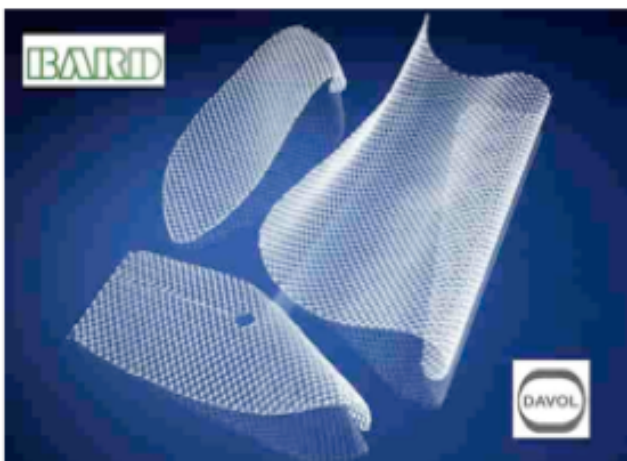
Syntetické sítky

Chirurgové začali používat u hernioplastik sítky kvůli často nedostatečným výsledkům sutury stehem. V současné době jsou k dispozici různé typy sítěk pro různé indikace. Nejdříve byly k dispozici sítky syntetické. Jejich užití vedlo k výraznému snížení rizika recidivy kýly. Měli ale některé problematické vlastnosti. Pokud se na syntetický materiál usídí třeba jen nepatrná infekce, téměř nikdy ji nelze zcela vyléčit bez toho, aniž by se musel implantát explantovat. V případě, že se syntetické sítky užívají intraperitoneálně, existuje také zvýšené riziko vzniku intraperitoneálních adhezí. Později se vyvinuly sítky, které jsou více rezistentní vůči infekci a také sítko pro intraperitoneální užití (např. Gore-Tex).

Zde uvádíme nejčastější druhy syntetických sítěk:

Polyesterová (PET): Jedná se o nevstřebatelnou sítku s velkými póry. Její přímý kontakt s břišními orgány je spojen se závažnými komplikacemi jako jsou píštěle. Velmi časté infekce materiálu a recidivy kýly.

Polypropylenová (Marlex, Prolene): Nevstřebatelná síťka s malými póry, která může vést k adhezím vzniku enterokutánních píštělí a erozím. Disponuje ale nízkým rizikem infekce materiálu. (obr. 5)



Obr. 5: Polypropylenová síťka

Polyglactin (Vicril): Je složená ze syntetického vstřebatelného kopolymeru glykolidu a lactidu derivované z kyseliny glykolové a mléčné. Užívají se k dočasné podpoře struktur břišní stěny.

PTFE (Goretex) (Obr. 6): Goretex má nízkou tahovou pevnost a nevrůstá do tkání příjemce, proto disponuje vysokým rizikem kýlních recidiv. Má ochrannou vrstvu, která předchází adhezím intraperitoneálního obsahu k síťce. Má ale větší riziko infekce.



Obr. 6: Goretexová síťka

Biologické sítky

Cenově dostupné syntetické materiály byly užívány s výborným klinickým efektem po dlouhou dobu. Nejsou ale vhodné pro rekonstrukce břišní stěny typu "open abdomen" (neuzavřená břišní stěna) nebo v kontaminovaných oblastech. Riziko infekce syntetických materiálů užívaných k rekonstrukci břišní stěny vedlo k vývoji nového typu biomateriálů - extracelulárních matic, neboli biologických sítěk. Byly představeny v devadesátých letech minulého století a v posledních deseti letech můžeme sledovat nárůst jejich užití (Butler, 2006). Biologické sítky jsou schopné revaskularizace a remodelace díky možnosti infiltrace buňkami příjemce. Jejich nevýhodou je vysoká cena, která ovlivňuje použití u jednoduchých případů. Jsou indikovány u komplikovaných nebo kontaminovaných hernií. Zatím neexistuje žádný standard pro správnou indikaci jejich použití. Jak bylo zmíněno výše, existuje velké množství různých biologických sítěk, ale v současné době nemáme k dispozici odpověď na otázku, jaký typ biologické sítky je nejvhodnější pro danou situaci (Smart et al., 2012). Biologické sítky se liší organizmem a tkání původu, decelularizačním a sterilizačním procesem, velikostí a tloušťkou materiálu. Další síťování vytváří materiál odolný biodegradaci a zlepšuje jeho pevnost. Všechny tyto faktory mohou ovlivnit efektivnost materiálu při jeho klinickém nasazení. Klinická výhoda síťovaných materiálů může být ve snížení rizika recidivy kýly (Catena et al., 2007; Hsu et al., 2009; O'Brien et al., 2011; Parker et al., 2006).

Nejdůležitějším bodem použití biologických sítěk je klinický výsledek, který je dán v kontextu hernioplastiky četností recidiv. Zatímco u některých výkonů je rychlá revaskularizace a minimální jizvení důležitými vlastnostmi, u hernioplastiky je dlouhodobá stálost rozhodující a má za následek přímý vliv na míru recidivy.

Existuje velký počet studií zkoumající efektivitu biologických sítěk pro hernioplastiku. Metodologie často nedostatečně popsána, většina článků se týká retrospektivních studií nebo prospektivních nekontrolovaných studií provedených na malých souborech a data týkající se typu rány nebo potenciální kontaminace nejsou dostupné.

Stabilita je závislá na vlastnostech materiálu a na prostředí do kterého je umístěn. Jiné klinické nálezy při použití biologických sítěk jako např. četnost seromů, chronická bolest a kvalita života jsou v literatuře velmi málo popsány. Recidivy jsou vykazované prakticky všemi studii. V kontextu výzkumu biologických sítěk je to důležité, protože je to faktor na který mají vliv různé technologie zpracování.

Alloderm

Míra rekurencí ve studiích zkoumající úspěšnost Allodermu při využití k hernioplastice se pohybuje v rozpětí od 0 do 100 %. Alloderm pravděpodobně poskytuje zlepšenou míru rekurence v porovnání s prostou suturou kýly v nekontaminovaných ranách, ale vychází hůře v porovnání s polypropylenovou sítkou a Surgisem. Funguje velmi špatně v případě užití k přemostění kýlního defektu. V kontaminovaných a infikovaných oblastech je míra rekurencí vysoká už při krátkých nebo středně dlouhých sledováních (Candage et al., 2008; Jin et al., 2007; Ko, 2009; Kolker, 2005; Scott et al., 2006). Problémy s vyklenutím břišní stěny byly popsány Gupta (Gupta, 2006) a míra roztahování Allodermu je v literatuře také diskutována (Nahabedian, 2007).

Korenkov (Korenkov et al., 2001) navrhl definici kýly v jizvě, která je v současné době široce přijímána: "Kýla v jizvě je jakýkoli otvor v břišní stěně s vyklenutím nebo bez vyklenutí nacházející se v oblasti pooperační jizvy zřetelný při klinickém vyšetření nebo v rámci vyšetření zobrazovacích". Tato definice nabízí otázku, zda nebyla rekurence kýl při užití Allodermu v některých studiích podhodnocena.

Zjištěné závěry můžeme shrnout tak, že není dostatek evidence k podpoře užití Allodermu ve většině situací, ve kterých je indikováno užití biologické sítky.

Surgisis

Publikované závěry ohledně užití Surgisisu jsou různorodé. Existují soubory kazuistik s nízkou mírou rekurence kýly (0-5.3%) nezávisle na tom, zda je operace

provedena ve sterilních nebo kontaminovaných ranách (Armellino et al., 2006; Eid et al., 2004; Hsu et al., 2009; Loganathan, Ainslie, & Wedgwood, 2010; Muysoms et al., 2009). Jiné studie signalizují mnohem vyšší míry rekurence v kontaminovaných operačních polích. Ueno (Ueno, 2004) popisuje celkovou míru rekurence v kontaminovaných ranách 30%, Helton (Helton et al., 2005) nachází silnou korelaci mezi typem rány a mírou rekurence s 39% rizikem ve znečištěných ranách. Celkově data naznačují, že Surgisis funguje dobře v čistých nebo mírně kontaminovaných ranách, ale riziko selhání v ranách s vyšší koncentrací bakterií je vysoké. Studie LAPSIS byla nedávno předčasně ukončena právě kvůli vysoké míře rekurence při užití Surgisis u pacientů bez infekce rány.

Permacol

S výjimkou dat prezentovaných Connollym (Connolly et al., 2008), jsou míry rekurence konzistentní napříč studii, nezávisle na metodologii, typu pacientů nebo závažnosti kontaminace operačního pole. Pohybují se v rozsahu od 0 do 15%. Vyšší riziko rekurence a fistulace zaznamenané Connollym by si zasloužilo bližší prozkoumání, protože nebyly publikovány žádné jiné studie podporující tyto observace a jiní autoři užívali Permacol v přítomnosti píštělí úspěšně (Armellino et al., 2006; Sailes et al., 2010). V této studii existují významné metodologické nedostatky (nerandomizovaná studie, absence dat o stupni kontaminace nebo incidenci Cronovy choroby v různých skupinách, obojí jako klíčové faktory vzniku nebo recidivy píštěle) ústící v nízký stupeň evidence. Nicméně ostatní studie trpí podobnými nedostatky. Ačkoli zmíněná studie vynechává detailní data o velikosti defektů, tak naznačuje, že nejmenší a nejméně komplikované případy byly rekonstruovány prostou suturou a měly následně větší pravděpodobnost lepších výsledků a méně komplikací než ty, které vyžadovaly užití syntetické sítky nebo Permacolu. Tento vliv může vysvětlit uměle zvýšenou míru recidivy u Permacolu.

Ostatní biologické sítky

U velkého množství sítěk (Allomax, FlexHD, FortaGen, Peri-Guard, SurgiMend and Tutopatch) neexistují data, které bych mohl zařadit do tohoto srovnání. U ostatních sítěk jsou data minimální nebo nedostatečné, jako např. u Veritas, Xenmatrix, CollaMend a Strattice s pouze malými retrospektivními studiemi. Jsou potřeba více studií s vyšší úrovní evidence. Do té doby nelze žádné další závěry ze studií vyvozovat.

Užití extracelulárních matric při rekonstrukci prsu po ablaci pro nádorové onemocnění

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem u žen. Jeho incidence se v posledních desetiletích narůstá, v současné době představuje 10% u běžné populace. Díky stále se zlepšující preventivní, diagnostické a terapeutické péči se počet žen, které přežijí karcinom prsu rychle zvyšuje. Ačkoli jsou vyléčeny z onemocnění, léčba bývá provázena nechtěnými následky včetně deformity prsu (BARD & SUTHERLAND, 1955). V současné době se rekonstrukce prsů považuje za poslední fázi léčby karcinomu prsu. Touto operací se snažíme pacientce navrátit kvalitu života, kterou měla před začátkem onemocnění (Nahabedian, 2009b).

Existuje mnoho technik rekonstrukce prsu. Výběr správné techniky je závislý na mnoha faktorech. Nejzásadnějším faktorem volby správného zákroku je typ primárního zákroku na prsu (modifikovaná radikální mastektomie nebo segmentektomie), ozáření tkáně, habitus pacientky, představy pacientky, zkušenosti chirurga a možnosti pracoviště (Serletti, 2011).

Existují tyto typy rekonstrukce prsů po chirurgické léčbě nádorového onemocnění:

- rekonstrukce prsu silikonovým implantátem (při nadbytku kůže v oblasti po ablaci), eventuálně v kombinaci s místním posunem kůže nebo s tkáňovým expandérem (Antony, McCarthy, Disa, & Mehrara, 2013)

- rekonstrukce prsu s užitím laloků (m. latissimus dorsi, thorakodorsální lalok) kombinovaných se silikonovým implantátem
- rekonstrukce prsu laloky bez užití implantátu (stopkovaný TRAM lalok, volný TRAM lalok, DIEP, SGAP, IGAP) (Chun, 2010a; Garvey et al., 2006; Vega et al., 2008; Wu, 2008)
- rekonstrukce prsu přenosem autologní tukové tkáně získané liposukcí (Delay, 2009; Rietjens et al., 2011)

Rekonstrukce prsu s užitím silikonového implantátu je operace nejméně náročná pro pacientku s výbornými kosmetickými výsledky v indikovaných případech. Z těchto důvodů se jedná o nejčastější typ rekonstrukce prsu po modifikované radikální mastektomii. Problémem při této rekonstrukci může být nedostatečná nebo ozářená kožní tkáň v místě po ablaci prsu. Pokud je tkáň zakrývající implantát tenká nebo málo vitální, je vysoké riziko kosmeticky špatného výsledku nebo dehiscence nad implantátem (Cordeiro & McCarthy, 2006; Rohrich et al., 1998).

V posledních pěti letech narůstá počet studií, které popisují užití biologických sítěk při rekonstrukci prsu silikonovým implantátem. Popsané výhody zahrnují zejména lepší krytí implantátu se sníženým rizikem jeho herniace a lepší kontrolu pozice implantátu (Antony et al., 2010; Becker et al., 2009; Bindingavele, 2007; Breuing & Colwell, 2007; Breuing & Warren, 2005; Chun et al., 2010b; Gamboa-Bobadilla, 2006; Jansen & Macadam, 2011a; 2011b; Komorowska-Timek, 2009; Losken, 2009; Pannucci, Antony, & Wilkins, 2013; Preminger, 2008; Salzberg, 2006; Sbitany, 2009; Spear, 2008; Spear, 2013; Topol, 2008; Zienowicz & Karacaoglu, 2007). Zdaleka nejčastěji užívaným materiálem při rekonstrukci prsu je výše popsáný Alloderm.

Po použití biologických sítěk při rekonstrukci prsu založené na silikonovém implantátu je popisováno možné snížení incidence tzv. kapsulární kontraktury. Kapsulární kontraktura je deformace prsu v důsledku stahování jizevnatého pouzdra vytvořeného kolem implantátu v průběhu hojení. Jedná se o reakci organismu na implantát. Kromě kvality povrchového zpracování implantátu se na vzniku kapsulární kontraktury podílí také subklinická infekce ve formě biofilmu. Prevence bakteriální

kontaminace implantátu je jednou z mála možností prevence kapsulární kontraktury, kterou máme v současné době k dispozici (Adams, 2001; Adams, 2006; Burkhardt, 2004; Khan, 2009; Netscher et al., 1995; Pajkos et al., 2003; Rieger et al., 2013; Tamboto, 2010; van Heerden, 2009; Virden, 1992; Wixtrom, 2012). Také moderní "texturované" povrchy implantátů riziko vzniku kapsulární kontraktury výrazně snížily, přesto přetrvává riziko kolem 30% u pacientek po rekonstrukci prsu (Antony et al., 2013). Dle Bakerovy klasifikace se kapsulární kontraktury dělí na čtyři stupně (tab. 2). V prvním stupni je prs měkký s normálním vzhledem, u druhého stupně je prs tvrdší, ale bez známek deformity. Ve třetím stupni klasifikace již jeví známky tvarových změn a ve čtvrtém a posledním stupni je navíc prs na pohmat bolestivý (Spear & Baker, 1995). Mechanismus účinnosti biologických sítěk v boji proti kapsulární kontraktuře je pravděpodobně dán zabráněním kontaktu části implantátu s prokrvenou tkání a přerušením kontinuity kapsuly.

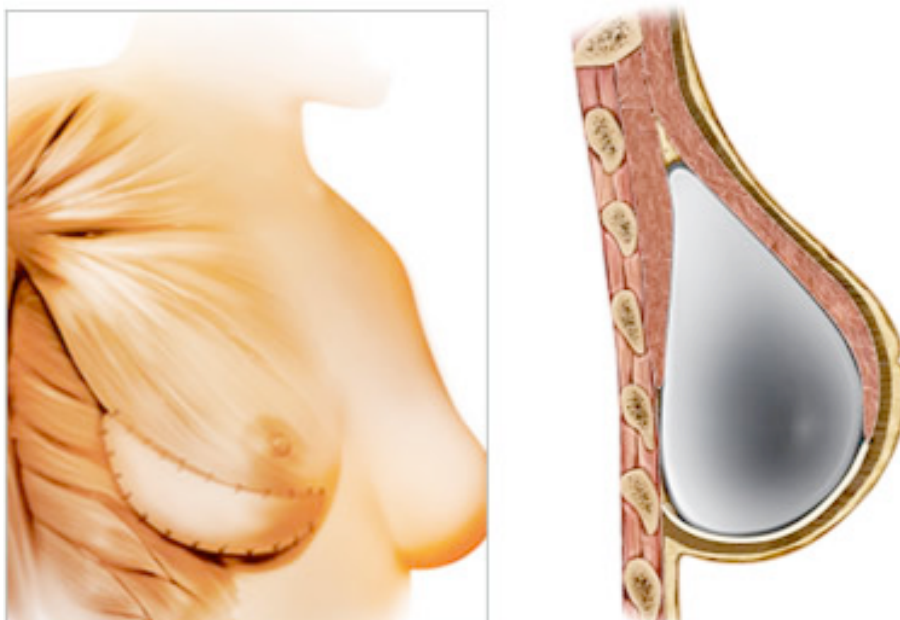
<u>Stupeň kontraktury</u>	<u>Klinický obraz</u>
1.	Prs je na pohmat měkký, bez deformity
2.	Prs je na pohmat pevnější, bez deformity
3.	Prs je na pohmat pevný a deformovaný
4.	Prs je na pohmat pevný, deformovaný, bolestivý

Tabulka 2: Klasifikace Bakerovy kontraktury

Technika rekonstrukce prsu implantátem:

Rekonstrukce implantátem se provádí z původní jizvy po ablaci. Přiměřeně se podminuje podkoží a vytvoří se dutina pod prsním svalem a podkožím směrem kaudálně. Kaudální okraj prsního svalu se odpojí, aby se zabránilo souhybu implantátu s prsním svalem. Implantát se vkládá do vytvořené dutiny. Kraniální část implantátu je kryta pektorálním svalem. Kaudální polovina nebo dvě třetiny implantátu jsou kryty

pouze kožním krytem s podkožím. V oblasti, která není krytá svalem se bohužel často nachází také kožní incize. Tím se toto místo stává "locus minoris resistencie" s rizikem dehiscence nad implantátem, zejména při nedostatečné kvalitě kožního krytu, např. po ozáření. V případě dehiscence snadno dojde k obnažení implantátu. Infekce implantátu na sebe nenechá dlouho čekat a následná nutnost vynětí implantátu je většinou nevyhnutelná. Pokud se na implantát dostane infekce, velmi zřídka se jí daří vyléčit bez odstranění implantátu.



Obr. 7: Umístění biologické sítěky při rekonstrukci prsu implantátem.

Biologické sítěky se implantují v průběhu operace po vložení implantátu. Jeden okraj se přišije ke kaudálnímu okraji pektorálního svalu, opačný okraj se přišije k hrudní stěně (Obr. 7). Tak vznikne další vrstva, která kryje implantát a lépe se fixuje a definuje podprsni rýha. Přerušením kontaktu implantátu s prokrvenou tkání pravděpodobně dochází k přerušování tvorby kapsuly v tomto místě a tím ke snížení rizika vzniku kapsulární kontraktury.

Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou nediferencované buňky, které se mohou dlouhodobě dělit, aniž by se diferencovaly (mohou vzniknout velké populace obdobných buněk). Zároveň mají schopnost sebeobnovy a diferenciace. Kmenové buňky savců mohou být získané z embryonálních nebo dospělých tkání. Jejich vlastnosti se liší v závislosti na původu (embryonální, kostní dřev, pupečnicková krev, tuková tkáň).

Kmenové buňky z tukové tkáně (ADSC) mají schopnost největší plasticity ze všech typů kmenových buněk dospělých tkání (Fang, Luo, Song, Li, & Cao, 2009). Po odebrání tukové tkáně jedinci a jejím zpracování kolagenázou dojde k uvolnění kmenových buněk z jejich vazeb na adipocyty a získáme skupinu různých buněk, kterou nazýváme stromální vaskulární frakce (SVF). Přibližně 2% buněk SVF vykazuje vlastnosti buněk kmenových s kapacitou diferenciace do různých řad. ADSC mohou diferencovat ve velké spektrum buněčných linií. Pro současné a potenciální klinické aplikace mohou kmenové buňky diferencovat buňky v chondrogenní, neurogenní, osteogenní, myogenní, kardiogenní, vaskulární, endokrinní, hepatické a hemopoetické (Illouz & Sterodimas, 2011). Pro diferenciaci jsou užívány v průběhu kultivace různé faktory; např. insulin, dexamethazon a indometacin pro adipogenní buňky nebo dexametazon, ascorbát a glycerolfosfát pro osteogenní buňky.

V posledních letech dochází k rozvoji užití kmenových buněk v klinické medicíně a to zejména při hojení ran, nebo regeneraci tkání poškozených radiací. Terapeutický potenciál kmenových buněk je dán zejména produkcí velkého množství cytokinů, které vedou ke zvýšené vaskularizaci a hojení tkáně.

Tkáňové inženýrství

Klasické přístupy rekonstrukční chirurgie užívají k rekonstrukci tkání např. lalokové plastiky, přenos autologního tuku nebo aloplastické materiály. U každé z těchto technik

najdeme nevýhody - morbiditu dárcovského místa u lalokových plastik, riziko infekce nebo reakce na cizí těleso u aloplastických implantátů. Existuje klinická potřeba pro stanovení nových terapeutických přístupů, jejichž výsledkem by byly rekonstrukce bez uvedených nežádoucích konsekvencí.

Cílem tkáňového inženýrství je vytvoření tkání, určených ke klinické léčbě (Bauer-Kreisel, 2010; Gomillion & Burg, 2006; Shenaq & Yuksel, 2002). Tyto umělé tkáně jsou složeny z buněk příjemce navázaných na nebuněčnou strukturu (scaffold), která poskytuje buňkám fyziologické a mechanické lešení. Pro potřeby mezibuněčné struktury se užívají biologické biomateriály jako např. korály, nebo také extracelulární matrice. Dlouhodobým cílem je vytvoření takové tkáně, která by se integrovala s přirozenou tkání příjemce. Autologní buňky jsou tělu příjemce vlastní a nevyvolávají žádnou reakci. Acelulární materiál, na kterém jsou buňky nanесeny neobsahuje antigeny, které by vedly k jeho odhojení.

Lidská tuková tkáň je ideálním zdrojem kmenových buněk, jelikož jich obsahuje velké množství a je snadno dostupná (Gimble, Katz, & Bunnell, 2007; Lin et al., 2008; Sensebe, Krampera, Schrezenmeier, Bourin, & Giordano, 2010; Strem & Hedrick, 2005; Utsunomiya et al., 2011; Yoshimura, Suga, & Eto, 2009). V současné době se používá přenos tukové tkáně včetně v ní obsažených kmenových buněk v klinické medicíně v mnoha indikacích. Příkladem uvedme rekonstrukce prsu po nádorovém onemocnění, rekonstrukce prsu u vrozených vývojových vad nebo rekonstrukce kraniofaciální oblasti (Coleman, 2006; Coleman & Saboeiro, 2007; Delay et al., 2009; Gir et al., 2012; Kamakura & Ito, 2011; Mestak & Zimovjanová, 2012).

Užití biologických sítěk pro syntézu rekombinantní kůže

Xenotransplantáty byly v medicíně hojně užívány od sedmdesátých let minulého století pro terapii popálenin a jiných akutních a chronických ran (Dvorankova, 2004). Aplikace prasečích xenotransplantátů měla velký význam pro snížení ztrát tekutin popálenou plochou, snížení bolestivosti a přípravu rány na autotransplantaci kůže.

Xenotransplantáty byly užívány jako dočasné kryty a musely být vždy nahrazeny autologní tkání, protože dochází k jejich postupnému odhojení. Jedinou možností trvalého krytí hlubokých popálenin je užití kožních autotransplantátů. V případech rozsáhlejších popálenin je nutné odebrání autotransplantátů o větších rozměrech a tím se morbidita odběrových ploch zvyšuje.

Před lety se začalo uvažovat o vytvoření arteficiální kůže, která by snížila nutnost odběru kožních autotransplantátů (Bell, 1981; Prunieras, 1983; Rheinwald & Green, 1975; L. M. Wilkins, 1994). Výsledkem bylo vytvoření rekombinantní kůže, která se skládá z autologních keratinocytů, které jsou nakultivované na extracelulární matrici. Velké zkušenosti s touto technikou má laboratoř tkáňového inženýrství popáleninového centra v nemocnici na Královských Vinohradech v Praze (Matouskova, 2002; Matouskova et al., 2006; Matouskova, 1993). Biologické sítěky se díky obsahu bioaktivních látek ukázaly jako ideální matrice na kultivaci keratinocytů. Narozdíl od syntetických materiálů na nich in vitro vzniká vrstvení keratinocytů obdobné jako na normální kůži (Zajicek et al., 2012).

Biologické sítěky nefungují na hojení ran příznivě pouze při kombinaci s nakultivovanými keratinocyty, ale mají samy o sobě velký regenerační potenciál (consensus, 2010; Zajicek et al., 2011). Je to dáno přítomností mnoha biologických faktorů, které podporují epitelizaci ran a prokazatelně urychlují hojení.

Animální modely břišní kýly

Biologické sítěky byly v minulosti rozsáhle studovány na animálních modelech. Velké množství dat ale pochází přímo od výrobců a neprošlo recenzním řízením. Vývoj animálních modelů pro implantaci acelulárních prasečích dermálních kolagenů započal na univerzitě Dundee v 70. a 80. letech 20. století (Oliver et al., 1980; 1982; Oliver, 1976; Oliver, 1975). Většina studií na zvířatech demonstrovala, že se implantované biologické materiály celularizují a revaskularizují, aniž by byly resorbované. V pozdější

době se vyvinuly modely zkoumající efektivitu užití biologických sítěk pro terapii kýly. Podstatou animálního modelu je vytvoření defektu v břišní stěně zvířete, přemostění tohoto defektu materiálem a zašití kůže nad ním. Explantace se provádí cestou resekcce celé břišní stěny, jejím histologickým vyšetřením a mechanickým testováním. V rámci histologického vyšetření se uskutečňuje hodnocení celulizace, vaskularizace, reakce na cizí těleso, kapsulace a dalších parametrů. Mechanicky se testuje pevnost materiálu a pevnost srůstu s břišní stěnou. Kromě těchto parametrů byla také hodnocena např. rezistence materiálů vůči infekci (Keller et al., 2010; Medberry, 2010). K modelu břišní kýly v rámci testování materiálu jsou používána různá zvířata, jako např. prasata (Deeken et al., 2011; E. D. Jenkins et al., 2010; Melman et al., 2011) nebo primáti (Sandor et al., 2008). Zdaleka nejčastější zvířata užívaná pro animální modely kýly k srovnávání účinnosti biologických sítěk jsou hlodavci (Ayubi, 2008; Broderick et al., 2011; Butler et al., 2010; de Castro Bras et al., 2010; Gaertner et al., 2007; Keller et al., 2010; Medberry et al., 2010; Mulier et al., 2011; Rice et al., 2009).

Závěry studií jsou v některých parametrech jako je vaskularizace a celularizace štěpu srovnatelné. Potvrdilo se také, že biologické materiály vyúsťují v méně adhezí v porovnání se syntetickými sítkami (Macleod, 2005). Mnoho animálních studií ale užívá nevhodné parametry, např. biochemické markery, spíše než skutečnou míru recidivy kýly jako měřítko klinického výkonu (Ayubi et al., 2008; Broderick et al., 2011; Butler et al., 2010; de Castro Bras et al., 2012; Deeken et al., 2011; Gaertner et al., 2007; Medberry et al., 2010; Mulier et al., 2011; Rice et al., 2009). Velmi kvalitní srovnávací data z animálních studií sice existují, ale pouze z klinických dat můžeme vyvodit závěry týkající se dlouhodobé účinnosti biologických materiálů u lidí.

Bylo již provedeno množství studií porovnávající různé síťované a nesíťované biologické sítky. Většina studií ale byla financována společnostmi produkujícími tyto materiály a studie testovaly materiály pouze po dobu několika týdnů nebo měsíců. Podobné parametry uvedené studie devalvují.

Cíle práce

Cílem práce bylo srovnání síťované a nesíťované acelulární prasečí dermis na dlouhodobém modelu břišní kýly u malého zvířete a zjištění možnosti jejich užití pro podporu a regeneraci tkání s hodnocením histologického nálezu (vaskularizace, celularizace, reakce na cizí těleso, šířka kapsuly) a pevnosti vrůstání do tkání příjemce. Dalším cílem bylo zjištění vlivu obohacení acelulární prasečí dermis o kmenové buňky na histologický nálezu (vaskularizace, celularizace, reakce na cizí těleso, šířka kapsuly) a pevnost vrůstání do tkání příjemce.

Vypracování správné metodiky pro implantaci a případnou modifikaci nových biologických biomateriálů v budoucnu umožní lepší užití biologických sítěk k regeneraci či náhradě poškozených tkání a orgánů.

Hypotéza

Nesíťovaný materiál pro rekonstrukci břišní stěny na animálním modelu bude disponovat větší biokompatibilitou a silnějším vrůstáním do břišní stěny ve srovnání se síťovanými biologickými biomateriály.

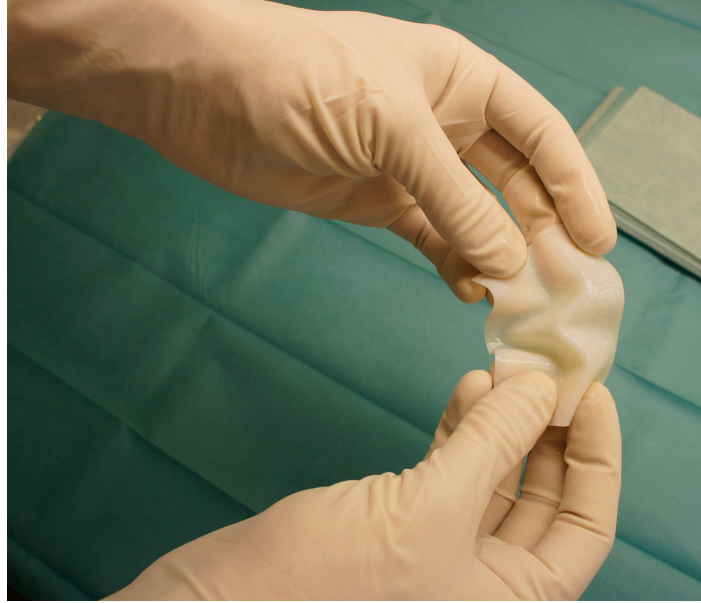
Při kombinaci biologických sítěk s autologními kmenovými buňkami získanými z tukové tkáně dojde ke zvýšené vaskularizaci a silnějším srůstání materiálu se svalovou fascií. To by vedlo, v případě klinického nasazení, ke zlepšení výsledků péče o pacienty s rozsáhlými defekty břišní stěny, zejména stran snížení rizika infekce materiálu a snížení rizika rekurence hernie.

Metodika

Byla provedena prospektivní studie porovnání dlouhodobých výsledků užití síťované acelulární prasečí dermis a nesíťované acelulární prasečí dermis pro rekonstrukci břišní stěny na potkanu kmene Wistar. Části experimentálních zvířat jsme odebrali tukovou tkáň z oblasti třísla, ze které jsme izolovali kmenové buňky. Část materiálů jsme obohatili o tyto autologní kmenové buňky derivované z tukové tkáně. Identitu kmenových buněk jsme ověřili jejich diferenciací.

Užili jsme nesíťovanou acelulární prasečí dermis (Medicem Technology, Česká Republika), získanou z dermoepidermálních štěpů prasečí kůže. Materiál byl zpracován 0,3% trypsinem k odstranění buněk, dehydratován a sterilizován gama paprsky (Obr. 8). Ke srovnání byla užitá komerčně dostupná síťovaná acelulární prasečí dermis Permacol (Covidien, Irsko), která je komerčně dostupná. Je vyráběna ze štěpů prasečí kůže zpracovaných trypsinem, extrakcí solventů (k odstranění lipidů), sterilizací gama ozářením. Je síťována hexamethylen diisocyanátem (Obr. 9).

Studie byly provedené v souladu s doporučením pro péči a užití laboratorních zvířat ministerstva zemědělství České Republiky. Experimentální protokol byl odsouhlasen odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Veškeré zákroky byly provedeny v řádném znecitlivění.



Obr. 8: Nesíťovaná acelulární prasečí dermis



Obr. 9: Síťovaná acelulární prasečí dermis (Permacol)

Izolace a kultivace kmenových buněk

Potkani typu Wistar ženského pohlaví vážící 340-400g byli uspáni intramuskulární injekcí Zoletilu (Virbac laboratories, Francie) 50mg/kg 30 minut před zákrokem. Po oholení inqvinální oblasti byla provedena incize a exstirpace tukové tkáně o objemu asi 1cm². Tento vzorek byl transportován do laboratoře tkáňového inženýrství. Rána byla zašita jednotlivými stehy Vicril 3/0 (Ethicon Inc., USA).

V laboratoři byla tuková tkáň nakrájena na malé kousky a inkubována 1-2 hodiny v 0,1% kolagenáze A (Roche) v 37 st. C. Zpracovaná tkáň byla rozrušena mícháním a opakovaným pipetováním, přidáno H-MEM (Minimum Essential Medium with Hanks' salts) médium s 10% bovinním sérem v asi 10 násobném nadbytku. Suspenze se centrifugovala při 500G 8 minut. Vzniklý pellet byl nasazen do 25cm² velkých kultivačních nádobek a kultivován v H-MEM médiu obohaceném o neesenciální aminokyseliny, 0,12 g/l pyruvátu, 1 g/l NaHCO₃, 10% bovinním séru a 2% fetálním bovinním séru (růstové médium pro kmenové buňky) při 37 st. C v inkubátoru s 3,5% CO₂. Médium bylo měněno každé 2-4 dny a buňky byly pasážovány při 70-90% konfluenci. Buňky z druhé pasáže byly užity na osídlení biologických sítěk v množství 3x10⁵ buněk v nádobě s biologickou sítkou nebo bez biologické sítky jako kontrola. Buněčná vrstva byla konfluentní za čtyři dny. Část vzorků biologických sítěk obarvena May-Grünwald a Giemsa - Romanovsky k preimplantační vizualizaci buněk.

Kontrola identity kmenových buněk

ADSC byly obohaceny o růstové faktory pro diferenciaci adipocytů a osteoblastů (Zuk et al., 2002).

Pro diferenciaci adypocytů byl užit dexametazon (1 μM), IBMX (0.5 μM), insulin (10 μg/ml) a indomethacin (60 μM) přidány do média. Buňky byly kultivovány pět dní. ADSC ve třetí pasáži byly kultivovány do subkonfluence. Médium pro kmenové buňky

bylo následně vyměněno za médium pro diferenciaci adipocytů a měněno každé 2-3 dny. Po pěti dnech byla kultura obarvena olejovou červení a histologicky vyšetřena.

Pro diferenciaci osteoblastů jsme užili dexamethasone (1 μM), kyselinu askorbovou (50 $\mu\text{g/ml}$) and β -glycerofosfát (10 mM). Buňky byly kultivované dva týdny a ve třetí pasáži kultivované do konfluence. Následně médium pro kmenové buňky vyměněno za médium pro diferenciaci osteoblastů (měněno každé 3-4 dny). Po 16 dnech byla kultura obarvena Alizarinskou červení pro vizualizaci kalcia.

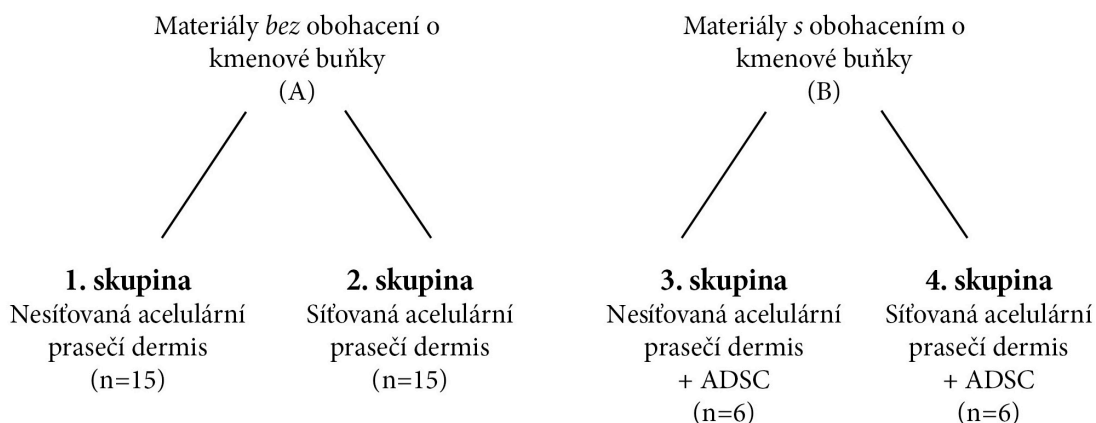
Nasazení buněk na biologické sítě

Umístili jsme 6 kusů síťované acelulární prasečí dermis a 6 kusů nesíťované acelulární prasečí dermis o velikosti 2x3cm individuálně v 60mm kultivačních miskách a přes noc naložili v růstovém médiu pro kmenové buňky. Druhý den byly kmenové buňky nasazeny do čerstvého média v množství 3×10^5 buněk na misku. Buňky byly na biologických sítkách kultivovány 4 dny. Materiály byly poté užity na plastiku kýly na animálním modelu.

Experimentální model kýly

Pro model břišní kýly jsme užili potkany kmene Wistar (n=42). Potkani byly uspáni intramuskulární injekcí Zoletilu (Virbac laboratories, Francie) 50mg/kg 30 minut před zákrokem. Po oholení abdominální krajiny a ošetření desinfekčním roztokem jsme provedli incizi kůže a podkoží o délce 5 cm. Kůže byla podminována do stran a následně provedena člunkovitá excize břišní stěny 4x2cm v plné tloušťce. Materiály byly přišity k okrajům břišní stěny (inlay) pokračovacím stehem Prolene 4/0 (Ethicon Inc., USA).

Byly implantovány 4 skupiny zvířat dle typu materiálu: 1. skupině (n=15) nesítovaná acelulární prasečí dermis, 2. skupině (n=15) síťovaná acelulární prasečí dermis, 3. skupině (n=6) nesítovaná acelulární prasečí dermis obohacená o ADSC a 4. skupině (n=6) síťovaná acelulární prasečí dermis obohacená o ADSC (Obr. 10).



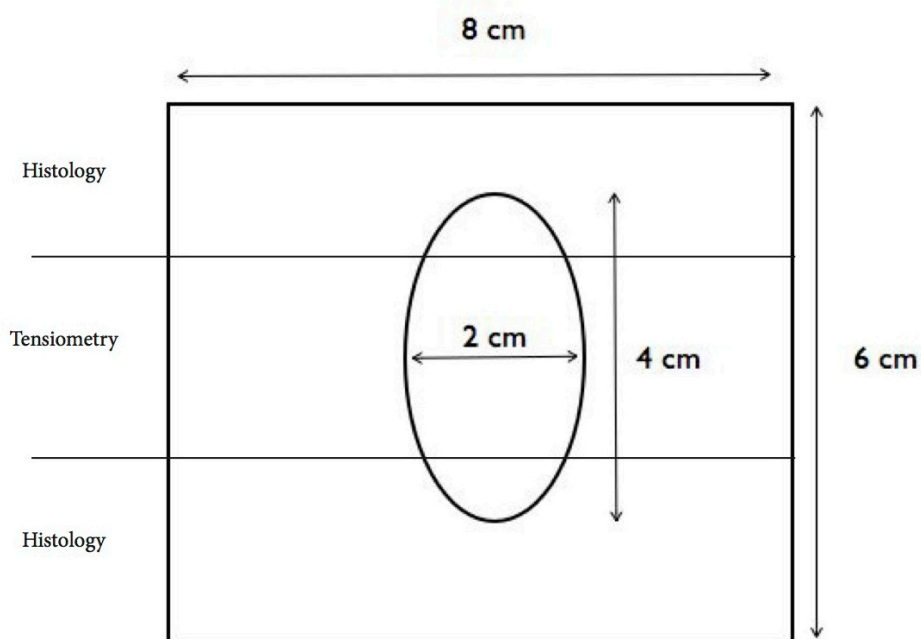
Obr. 10: rozložení počtu zvířat ve skupinách

Ránu jsme zašili s užitím Vicrylu 3/0 (Ethicon Inc., USA). Pooperační analgésie byla zajištěna Butonodorem (Richter Pharma, Austria) 0,01mg intramuskulárně. Pooperační průběh a observace byla bez nežádoucích příhod.

Po 3 měsících byla provedena explantace po 5 zvířatech z 1. a 2. skupiny a všech 6 zvířat z 3. a 4. skupiny. Po 6 a 12 měsících byla provedena explantace po 5 zvířatech z 1. a 5 zvířatech z 2. skupiny (tab. 3). Zvířata byla utracena injekcí ketaminu 0,1ml/100g + medetomidinu 0,01/100g intramuskulárně a T61 3ml/100g intrakardiálně. Byla vyšetřena incidence herniace. Čtvercová excize břišní stěny o velikosti 6x8 cm se rozdělila na 3 části (Obr. 11). Přední a zadní část byla histologicky vyšetřena. Prostřední část (15mm silný proužek) byla mechanicky testována.

Materiál	Celkem vzorků	Explantace		
		3 měsíce	6 měsíců	12 měsíců
Síťovaná acelulární prasečí dermis	15	5	5	5
Nesíťovaná acelulární prasečí dermis	15	5	5	5
Síťovaná acelulární prasečí dermis + ADSC	6	6	-	-
Nesíťovaná acelulární prasečí dermis + ADSC	6	6	-	-

Tab. 3: Počty zvířat explantovaných v jednotlivých časových intervalech



Obr. 11: Čtvercová excize břišní stěny o velikosti 6x8 cm se rozdělila na 3 části. Přední a zadní část byla histologicky vyšetřena (Histology). Prostřední část (15mm silný proužek) byla mechanicky testována (Tensiometry).

Histologické vyšetření

Po explantaci byly vzorky tkáně fixovány ve formaldehydu a podrobeny histologickému vyšetření po obarvení hematoxylinem-eosinem s užitím mikroskopu Olympus BX50 s 40x, 100x a 200x zvětšením. Bylo provedeno semikvantitativní histologické vyšetření každého explantátu s užitím skórovacího systému popsáném v ISO 10993-6 (Tab. 4).

Reakce	Skórování				
	0	1	2	3	4
Neovaskularizace	0	Minimální kapilární proliferace, fokální 1-3 pupeny	Skupina 4-7 kapilár s podpůrnými fibroblastickými strukturami	Široké pruhy kapilár s podpůrnými strukturami	Extensivní pruhy kapilár s podpůrnými fibroelastickými strukturami
Tloušťka kapsuly	0	Úzké pruhy	Mírně silné pruhy	Silné pruhy	Extensivní pruhy

Buněčná reakce	Skórování				
	0	1	2	3	4
Celularizace implantátu	0	Ojedinéle 1-5/phf	5-10/ phf	Silný infiltrát	Plno
Leukocyty	0	Ojedinéle 1-5/phf	5-10/ phf	Silný infiltrát	Plno
Obrovskobuněčná reakce	0	Ojedinéle 1-2/phf	3-5/ phf	Silný infiltrát	Plno
phf = per high powered field (400x)					

Tab. 4: Semikvantitativní histopatologické hodnocení explantátů jak je popsáné v ISO 10993-6

Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti byly testovány na přístroji Inspekt table 10kN s 100N zatížením cely a s užitím softwaru Labmaster (Hagewald & Peschke, Německo) (Obr. 12). Bylo nastaveno předpětí 0,05N a rychlost posunu hlavice 200mm/min. Každý vzorek byl v přístroji Inspekt table orientován horizontálně s fixací obou konců do čelistí (Obr. 13).



Obr. 12: Tensiometr Inspekt table 10kN

Tloušťka vzorků byla hodnocena přístrojem Mitutoyo ABSOLUTE (Mitutoyo Inc., Japan).

Tensiometricky byla hodnocena síla nutná k přetržení vzorku a napětí nutné k přetržení vzorku normalizované na tloušťku vzorku, velikost průřezu a místo ruptury vzorku (implantát, přechod implantátu a tkáně, nebo oblast tkáně). Pevnost srůstu byla vyjádřena dvěma hodnotami. Maximální síla nutná k přetržení vzorku byla vyjádřena v newtonech (N). Maximální síla vztážená na velikost průřezu (napětí) byla hodnocena v megapascalích (MPa).



Obr. 13: Uchycení vzorku do čelistí tensiometru

Statistická analýza

Pro analýzu dat byl použit Wilcoxon test pro kvantitativní data a Pearson Chi-Square, Mann-Whitney test a Fisherův test pro kategoriální data.

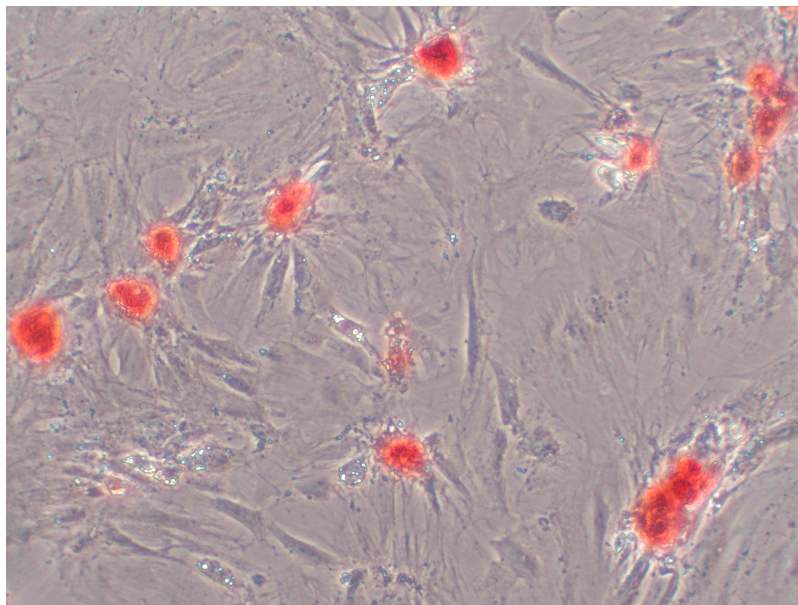
Výsledky

Kultivace buněk, diferenciaci a kontrola identity

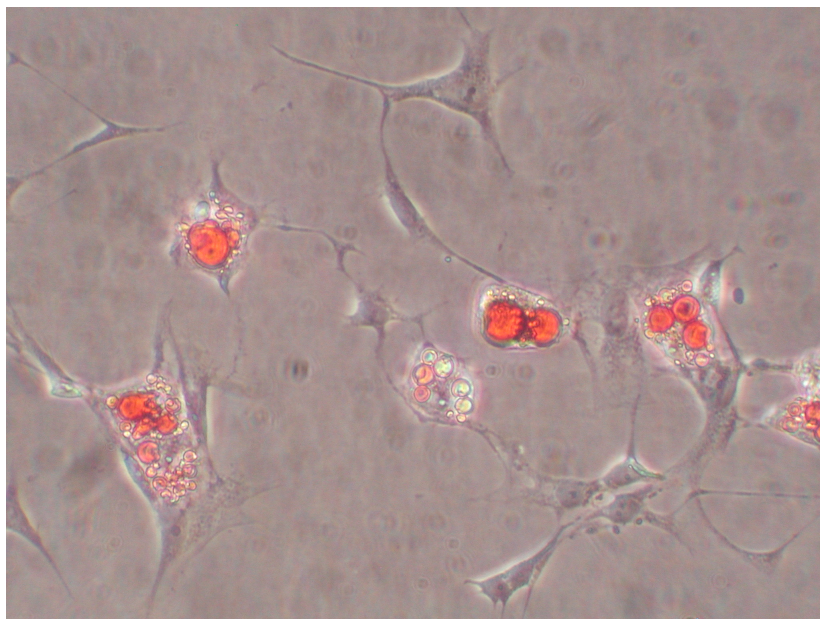
Pokrytí povrchu obou materiálů bylo kolem 50% při vyšetření barvením May-Grünwald a Giemsa- Romanovski. Nebyl pozorován žádný rozdíl v růstu mezi médiem s biologickou sítkou a bez ní (nebyla zjištěna cytotoxicita). Přítomnost kmenových buněk byla ověřena diferenciací v adipocyty a osteoblasty.

Diferenciaci v adipocyty: v buňkách byla pozorována akumulace vakuol bohatých na lipidy. Nakonec se lipidové vakuoly spojily a zaplnily buňky (Obr. 14).

Diferenciaci v osteoblasty: buňky vytvořily shluhy buněk, které byly obarveny alizarinskou červení (Obr. 15).



Obr. 14: ADSC 10 dní kultivované v médiu pro diferenciaci v adipocyty a následně obarvené olejovou červení. Akumulace obarvených lipidů uvnitř buněk je zřetelná.



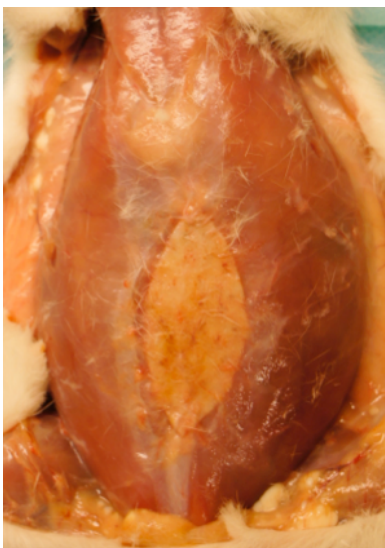
Obr. 15: ADSC 16 dní kultivované s médiem pro diferenciaci osteoblastů. Shluky buněk jsou pozitivní na kalcium jak je vidět po obarvení alizarinskou červení.

Makroskopické nálezy při explantaci

V okolí materiálů nebyl nalezen žádný serom. V žádné ze skupin nebyly v čase explantace přítomné recidivující kýly stejně tak jako střevní srůsty. U materiálů nesítované acelulární prasečí dermis bylo pozorováno mírné vyklenutí břišní stěny (1/5 ve 3 měsících, 2/5 v 6 měsících, 1/5 v 12 měsících). Intraperitoneálně jsme pozorovali pouze adheze omenta k peritoneální straně materiálů. Incidence těchto adhezí byla rovnoměrně zastoupena ve všech skupinách materiálů. Všechny materiály vykazovaly známky časně vaskularizace s krevními cévami na obou stranách materiálů. Nebyly přítomny známky zánětu, fibrózy, kalcifikace nebo granulomatózní reakce. Materiály byly pevně vrostlé do podkožní tkáně a břišní stěny.

Nesítovaná acelulární prasečí dermis vykazovala makroskopicky významnou resorbci již 3 měsíce po implantaci. Vyhlížela jako tenká, téměř transparentní, membrána. Sítované acelulární prasečí dermis nevykazovaly makroskopicky téměř

žádnou resorbci po dobu celé studie. Jejich vzhled byl při explantaci stejný jako při implantaci.



Obr. 16: Makroskopický nález při explantaci

Histologické nálezy

Srovnání materiálů s obohacením a bez obohacení kmenovými buňkami ve 3 měsících

Všechny materiály vykazovaly celulizaci a neovaskularizaci 3 měsíce po implantaci. Srovnání obou testovaných skupin s kontrolní skupinou bez obohacení ADSC nevykázalo žádné signifikantní rozdíly v parametrech síla pouzdra, reakce na cizí těleso, celularizace a vaskularizace (Tab. 5, 6).

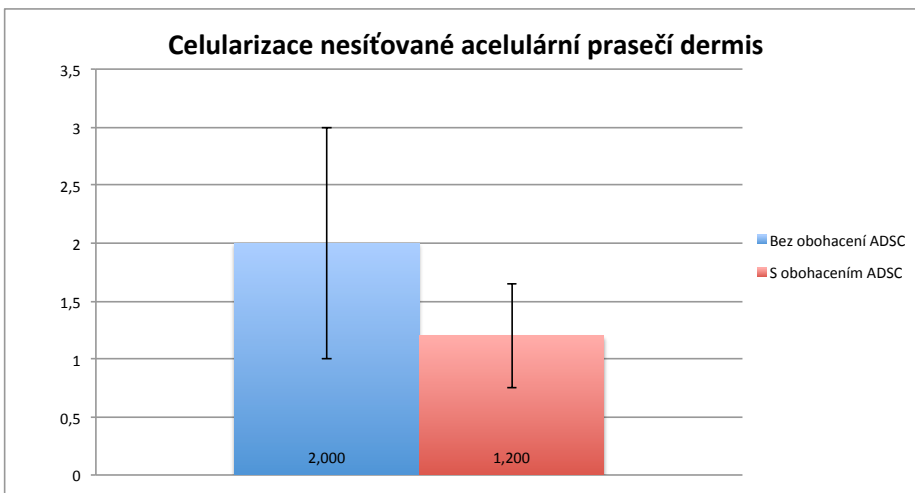
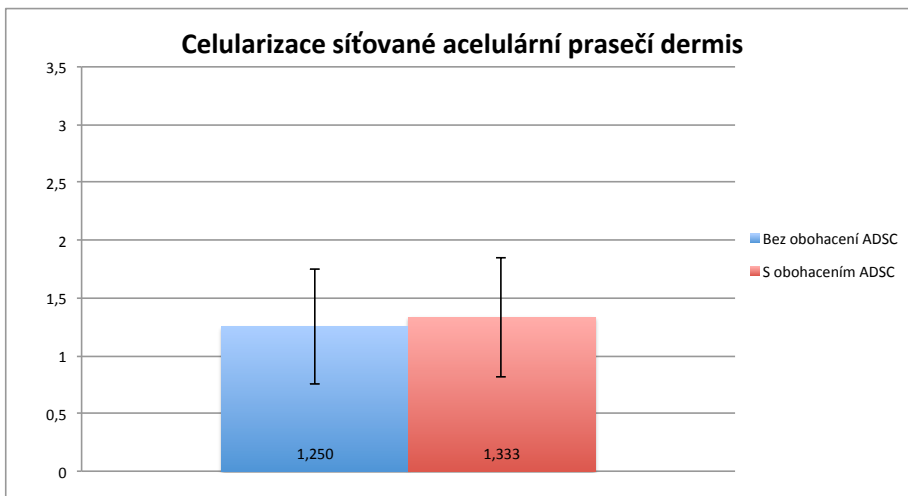
Parametr	Sítovaná	Sítovaná + kmenové buňky	p-hodnota
Celularizace	1,250	1,333	1
Vaskularizace	1,750	1,167	0,375
Síla pouzdra	0,333	1	0,830

Tab. 5: Srovnání histologických parametrů sítovaných materiálů s obohacením a bez obohacení kmenovými buňkami

Parametr	Nesítovaná	Nesítovaná + kmenové buňky	p-hodnota
Celularizace	2	1,2	0,455
Vaskularizace	2	1,4	0,542
Síla pouzdra	0,800	1	0,638

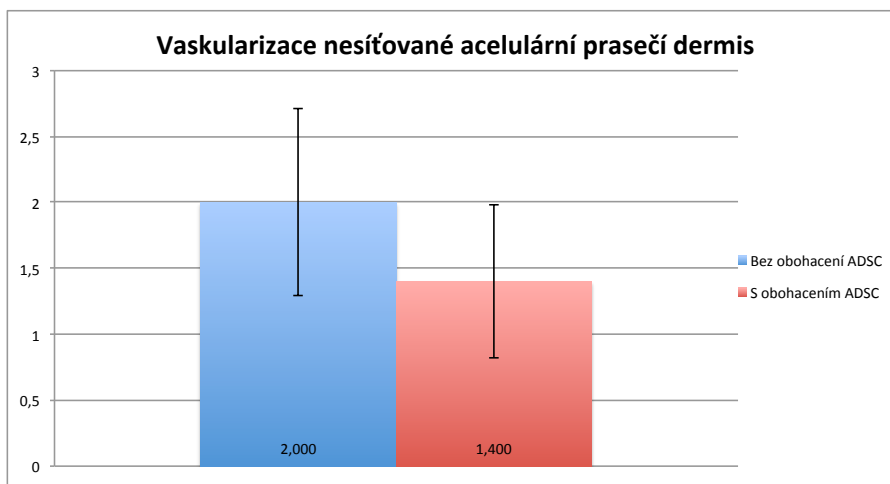
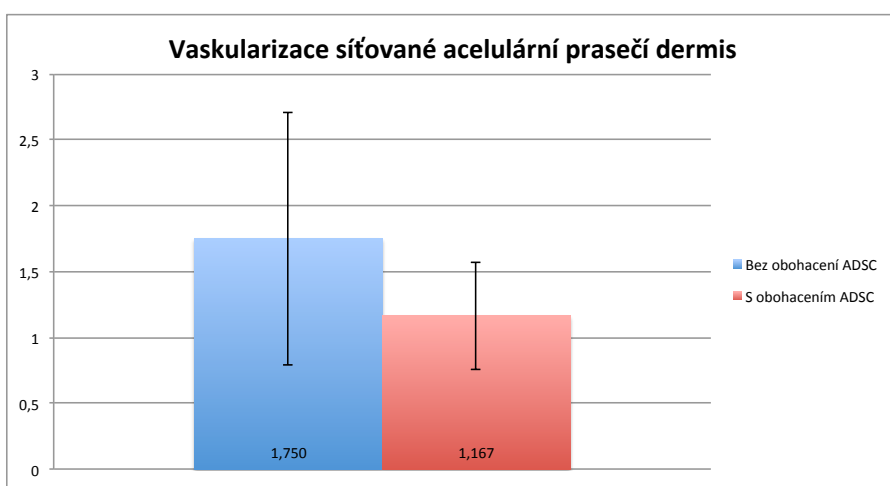
Tab. 6: Srovnání histologických parametrů nesítovaných materiálů s obohacením a bez obohacení kmenovými buňkami

Průměrná celularizace ve skupině sítované acelulární prasečí dermis bez obohacení kmenovými buňkami byla 1,250 a ve skupině s obohacením kmenovými buňkami 1,333 ($p=1$). Průměrná celularizace ve skupině nesítované acelulární prasečí dermis bez obohacení kmenovými buňkami byla 2 a ve skupině s obohacením kmenovými buňkami 1,2 ($p=0,455$) (Obr. 17). Výsledky byly statisticky nevýznamné.



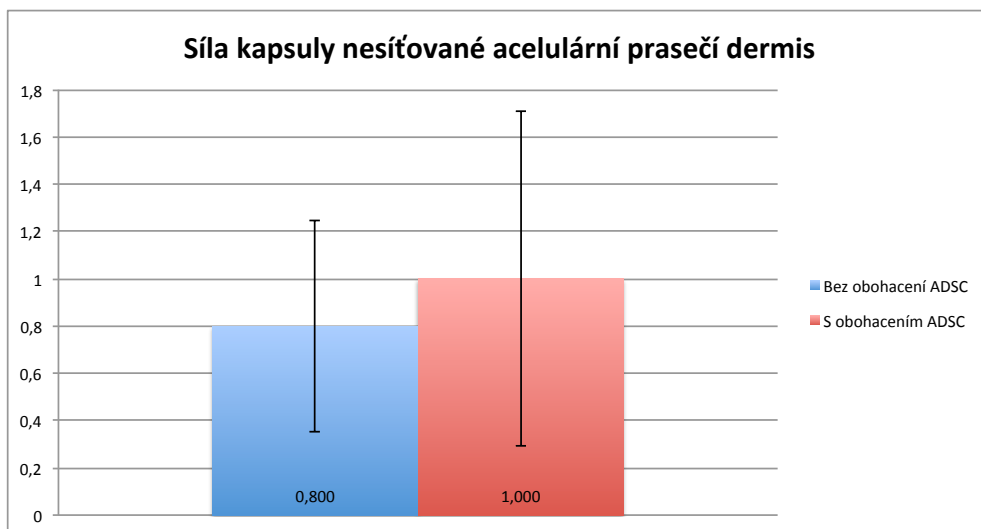
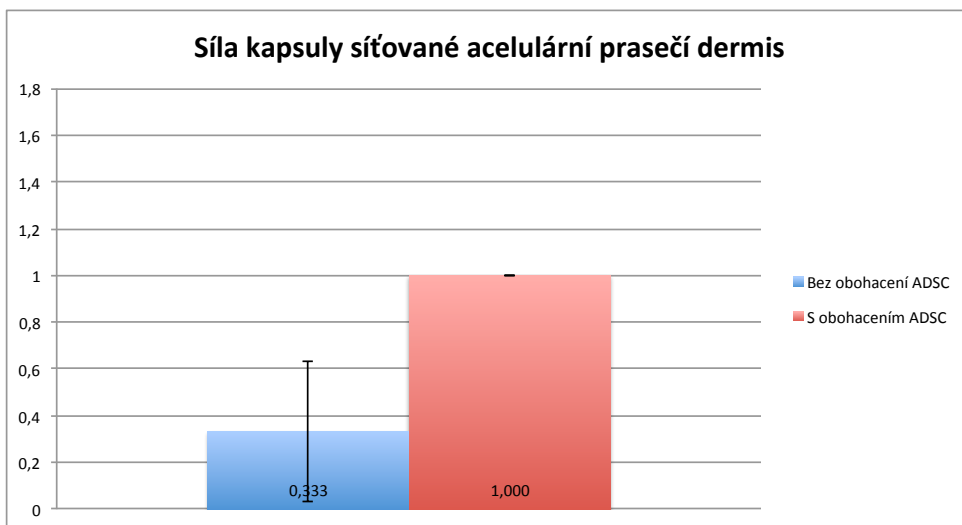
Obr. 17: Průměrné celularizace síťované a nesíťované acelulární prasečí dermis s obohacením a bez obohacení o kmenové buňky.

Pozoruhodné bylo zjištění, že vaskularizace ve skupině síťované acelulární prasečí dermis bez obohacení kmenovými buňkami měla hodnotu 1,75 a jen 1,167 ve skupině obohacené kmenové buňky ($p=0,375$). Průměrná vaskularizace ve skupině nesíťované acelulární prasečí dermis nebohacené o kmenové buňky byla na stupni 2 a ve skupině obohacené o kmenové buňky byla na stupni 1,4 ($p=0,542$) (Obr. 18). Výsledky byly ale statisticky nevýznamné.



Obr. 18: Průměrné vaskularizace síťované a nesíťované acelulární prasečí dermis s obohacením a bez obohacení o kmenové buňky.

Průměrný stupeň šířky kapsuly ve skupině síťované acelulární prasečí dermis neobohacené o kmenové buňky byla na stupni 0,33 a 1 ve skupině obohacené o kmenové buňky ($p=0,445$). Průměrný stupeň šířky kapsuly ve skupině nesíťované acelulární prasečí dermis neobohacené o kmenové buňky byl na stupni 0,8 a ve skupině obohacené o kmenové buňky byl na stupni 1 ($p=0,638$) (Obr. 19). Výsledky nebyly statisticky významné.



Obr. 19: Průměrné stupně šířky kapsuly síťované a nesíťované acelulární prasečí dermis s obohacením a bez obohacení o kmenové buňky.

Srovnání materiálů bez obohacení kmenovými buňkami po 3, 6 a 12 měsících

Oba materiály vykazovaly vrůstání buněk a neovaskularizaci od 3 měsíců po implantaci (Tab. 7, 8, 9).

Parametr	Síťovaná	Nesíťovaná	p-hodnota
Celularizace	1,25	2	0,55
Vaskularizace	1,75	2	0,31
Síla pouzdra	0,33	1	0,486

Tab. 7: Srovnání histologických parametrů po explantaci po 3 měsících

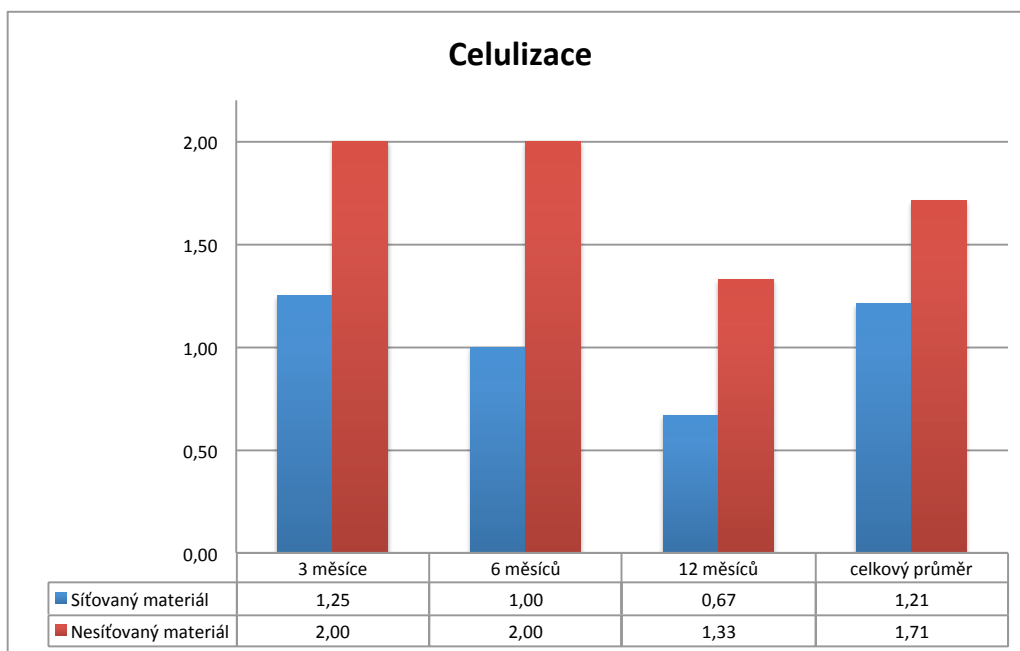
Parametr	Síťovaná	Nesíťovaná	p-hodnota
Celularizace	1	2	0,029
Vaskularizace	1	2	0,029
Síla pouzdra	1	0	0,005

Tab. 8: Srovnání histologických parametrů po explantaci po 6 měsících

Parametr	Síťovaná	Nesíťovaná	p-hodnota
Celularizace	0,67	1,33	0,329
Vaskularizace	0,67	1	1
Síla pouzdra	1	0	0,009

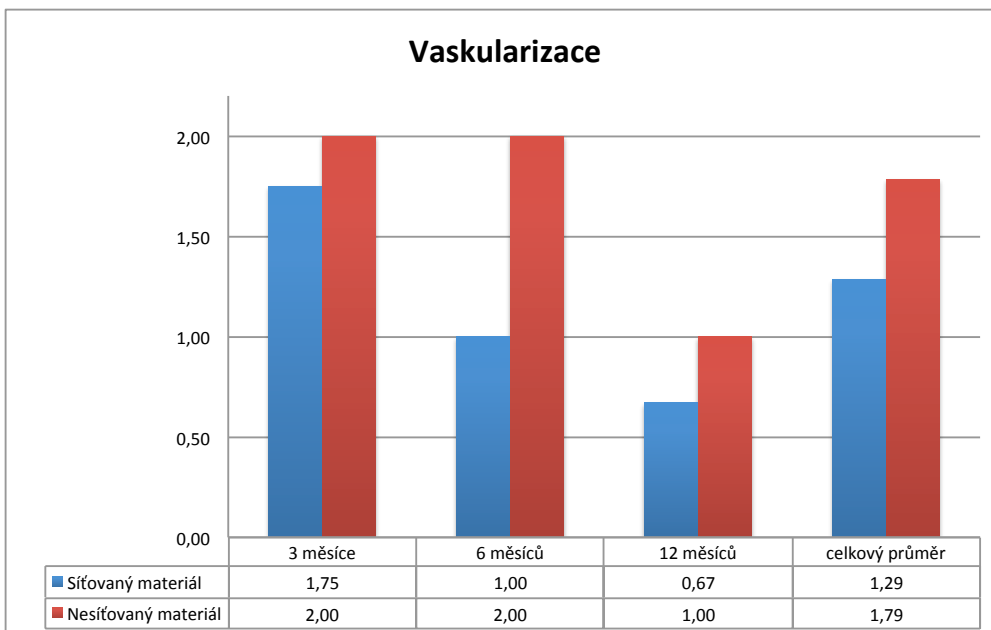
Tab. 9: Srovnání histologických parametrů po explantaci po 12 měsících

Průměrná hladina celularizace byla signifikantně vyšší v nesítované acelulární prasečí dermis než v sítované acelulární prasečí dermis v 6 měsících (2 vs. 1; $p=0,029$). Rozdíl celularizace byl nesignifikanční ve 3 měsících (2 vs. 1,25; $p=0,549$) a ve 12 měsících (1,33 vs. 0,67; $p=0,329$) (Obr. 20).



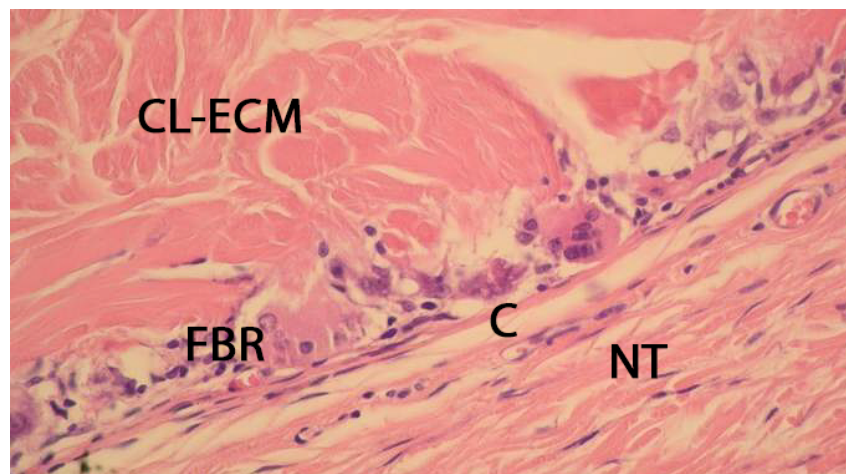
Obr. 20: Průměrné celularizace sítované a nesítované acelulární prasečí dermis po 3, 6 a 12 měsících.

Vaskularizace byla signifikantně vyšší ve skupině nesítované acelulární prasečí dermis ve srovnání se sítované acelulární prasečí dermis 6 měsíců po implantaci (2 vs. 1; $p=0,029$), nesignifikanční po 3 měsících (2 vs. 1,75; $p=0,311$) a po 12 měsících (1 vs. 0,67; $p=1$) (Obr. 21).

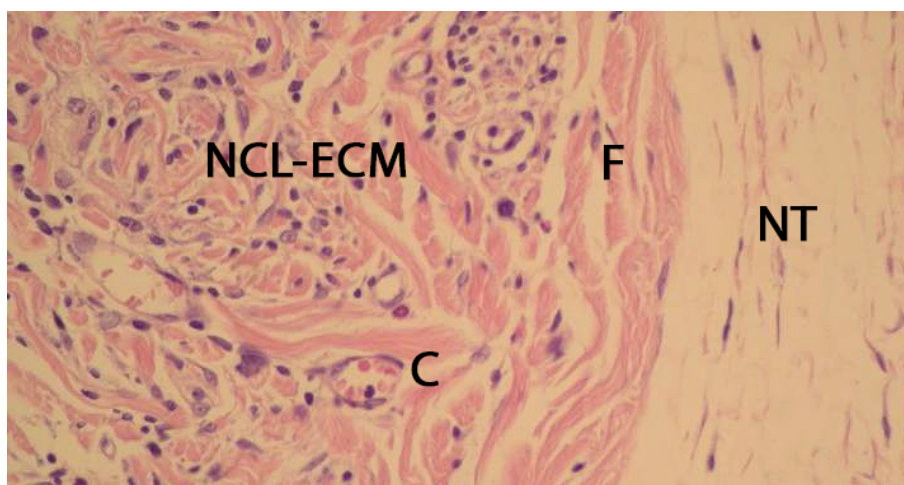


Obr. 21: Průměrné vaskularizace síťované a nesíťované acelulární prasečí dermis po 3, 6 a 12 měsících.

Krevní cévy a buňky byly v případě síťované acelulární prasečí dermis lokalizovány výlučně na rozhraní implantátu a tkáně příjemce, zatímco v případě nesíťované acelulární prasečí dermis pronikaly více do materiálu (Obr. 22 a 23). Struktura matrice byla u obou typů materiálů nenarušena ve všech časových úsecích.

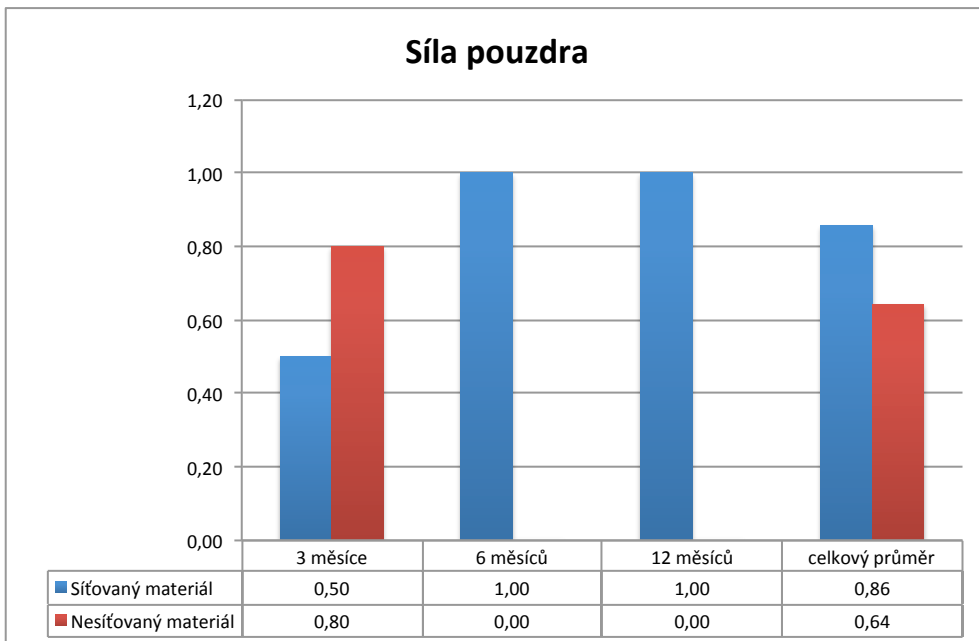


Obr. 22: Histologické vyšetření síťované acelulární prasečí dermis po 3 měsících. CL-ECM - síťovaná acelulární prasečí dermis; FBR - fibroblasty na povrchu implantátu nepronikající do implantátu; C - kapsula; NT - normální tkáň.



Obr. 23: Histologické vyšetření nesíťované acelulární prasečí dermis po 3 měsících. NCL-ECM - nesíťovaná acelulární prasečí dermis; C - kapsula; F - fibroblasty; NT - normální tkáň.

Pouzdra obklopující nesíťované acelulární prasečí dermis byly silnější ve 3 měsících (0,8 vs. 0,33), ale rozdíl nebyl signifikantní ($p=0,486$). Pouzdra nesíťované acelulární prasečí dermis byly signifikantně slabší v 6 měsících (0 vs. 1; $p=0,005$) a ve 12 měsících (0 vs. 1; $p=0,009$) ve srovnání s pouzdry síťované acelulární prasečí dermis (Obr. 24). To napovídá, že ztlustění kapsul může být reverzibilní.



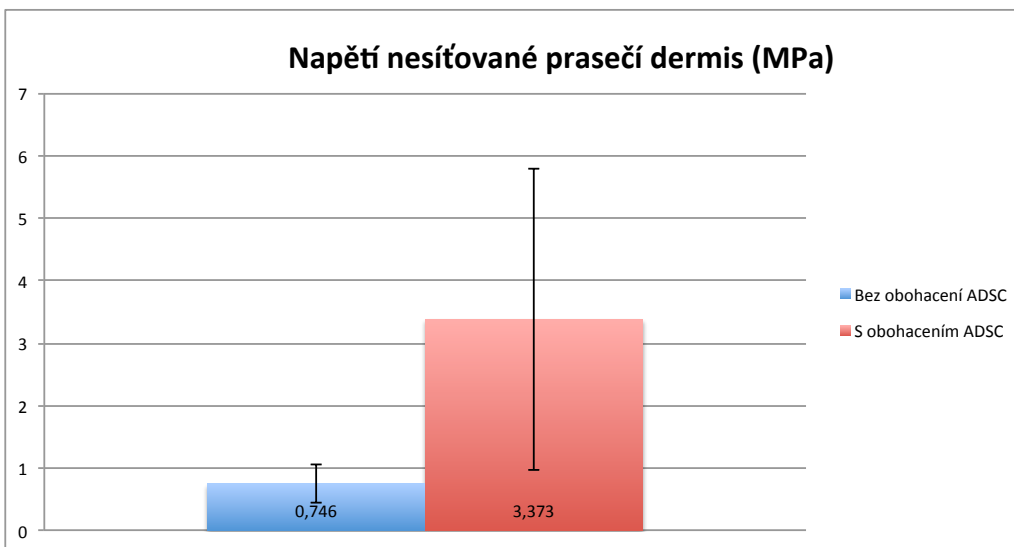
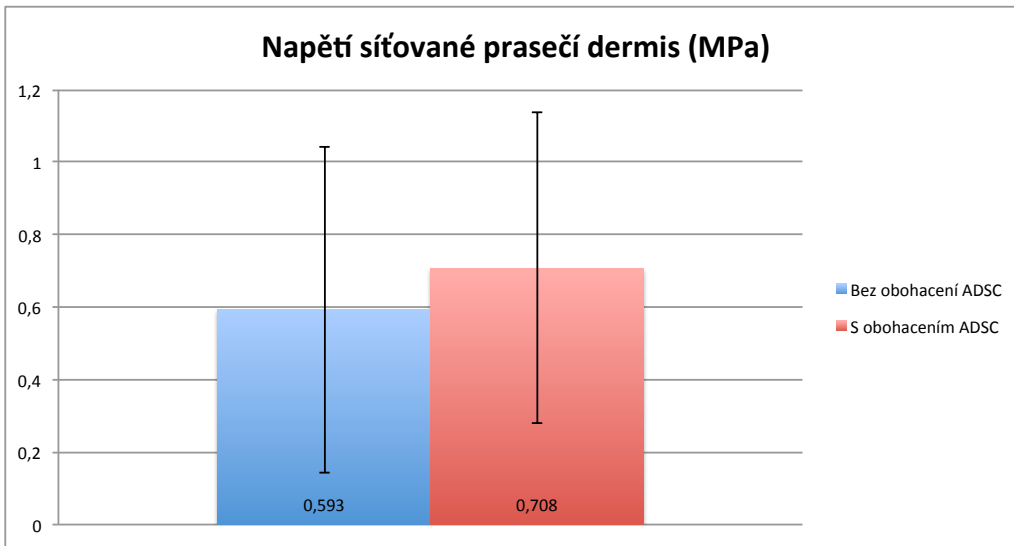
Obr. 24: Průměrné stupně síly pouzdra sítované a nesítované acelulární prasečí dermis po 3, 6 a 12 měsících.

Mechanické testování

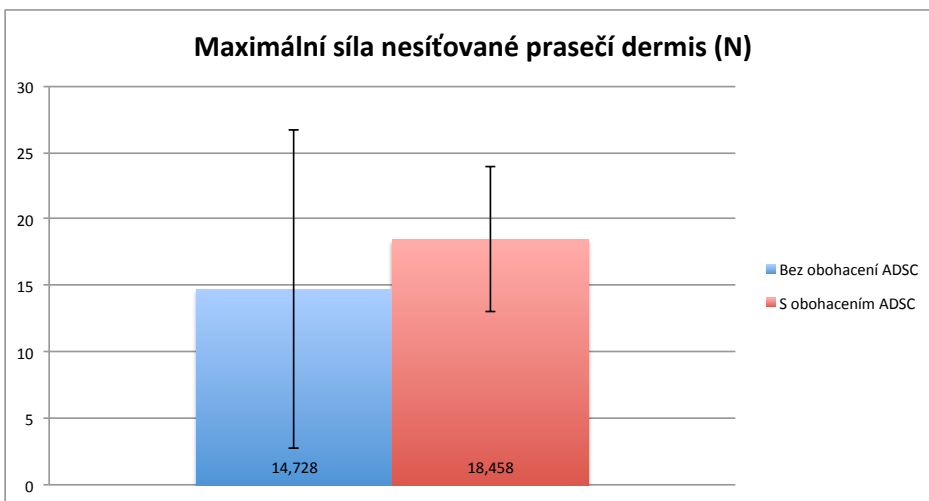
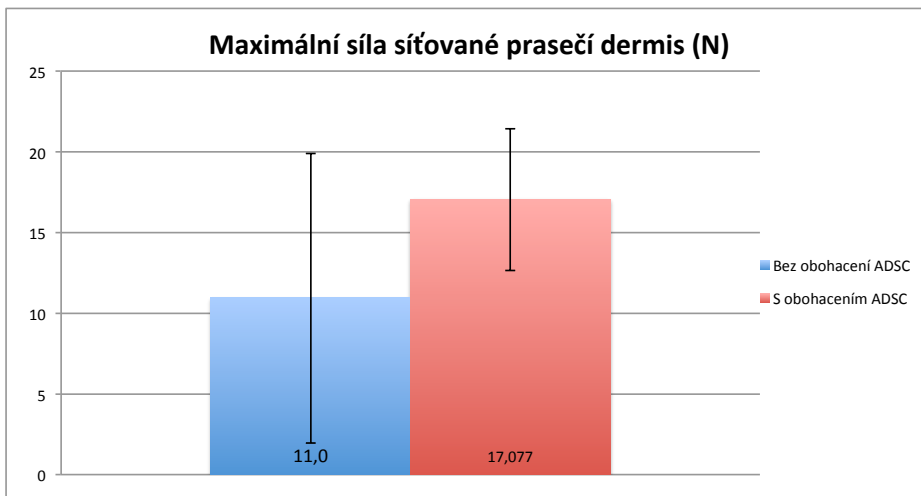
Srovnání materiálů s obohacím a bez obohacím o kmenové buňky ve 3 měsících

Síla vrůstání síťované acelulární prasečí dermis obohacené o kmenové buňky byla vyšší než u materiálů, které nebyly obohaceny o kmenové buňky, ale výsledek nebyl statisticky signifikantní (0,59MPa vs. 0,7 MPa, $p=0,66$).

Ve skupině nesíťované acelulární prasečí dermis byl statisticky významný rozdíl mezi materiály neobohacenými o kmenové buňky (0,75MPa) a materiály obohacenými (3,37 MPa; $p=0,018$). Tyto výsledky indikují lepší vrůstání tkáně do méně kompaktního materiálu (Obr. 25, 26).



Obr. 25: Maximální napětí před prasknutím měřené u materiálů s obohacením a bez obohacení o kmenové buňky po explantaci ve 3 měsících testované na tensiometru.



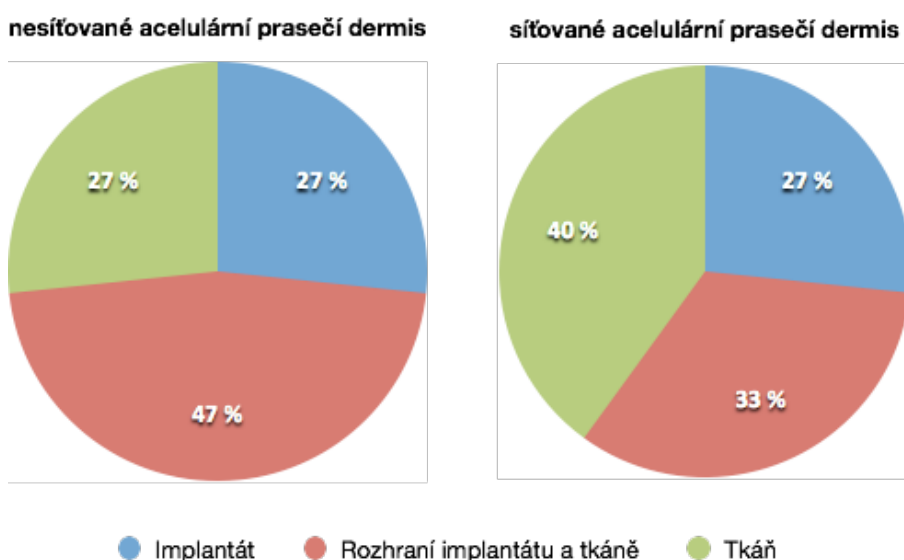
Obr. 26: Maximální síla před prasknutím měřené u materiálů s obohacením a bez obohacení o kmenové buňky po explantaci ve 3 měsících hodnocená na tensiometru.

Srovnání materiálů bez obohacení ADSC po 3, 6 a 12 měsících

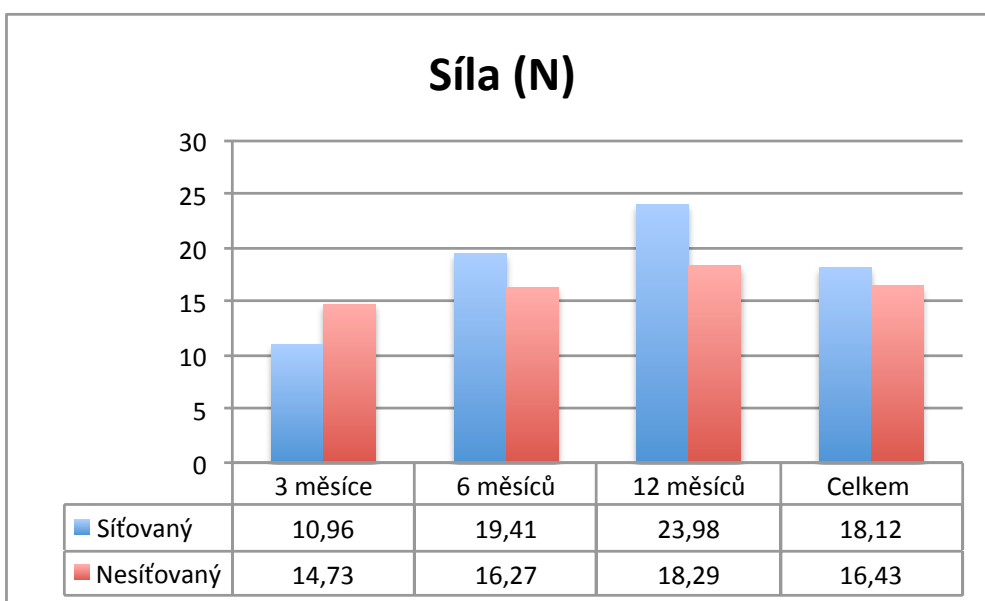
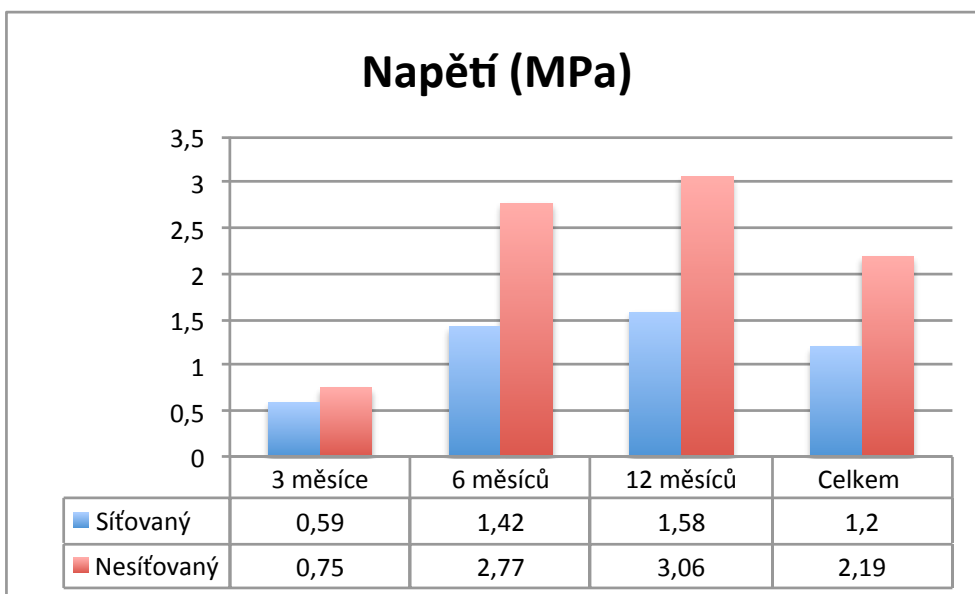
V průběhu testovací doby napětí a síla vzorků potřebných k ruptuře narůstaly. Místo přerušení vzorků bylo srovnatelné u všech implantátů (Obr. 27).

3 měsíce od implantace disponovaly nesítované aceluární prasečí dermis signifikantně vyšším napětím potřebným pro rupturu vzorku (0,75 vs. 0,59 MPa; $p=0,007$). 6 měsíců po implantaci byly rozdíly mezi nesítovanou aceluární prasečí dermis a síťovanou aceluární prasečí dermis nesignifikantní (2,77 vs. 1,42 MPa; $p=0,386$) a zůstaly nesignifikantní i 12 měsíců od implantace (3,06 vs. 1,58 MPa; $p=0,083$). Souhrnem, pevnost vzorků nesítované aceluární prasečí dermis stoupala od 3 měsíců (0,75 MPa) do 12 měsíců (3,06 MPa) od implantace. Pevnost síťované aceluární prasečí dermis také stoupala z 0,59 MPa ve 3 měsících na 1,58 MPa ve 12 měsících po implantaci (Obr. 28). Z těchto parametrů je více vypovídající parametr napětí, což je vlastně síla vztažená na průřez vzorku.

Z výsledků vyplývá větší pevnost vrůstání nesítovaných materiálů do tkání příjemce.



Obr. 27. Srovnání materiálů dle přerušení vzorku.



Obr. 28: Srovnání pevností vzorků po 3, 6 a 12 měsících.

Diskuze

V posledních letech dochází k rozšíření užití biologických biomateriálů ve formě extracelulárních matric pro rekonstrukci břišní stěny. Stále ale není dostatek experimentálních ani klinických dat potřebných pro správný výběr materiálu pro danou indikaci. Je všeobecně známo, že klinické randomizované kontrolované studie jsou v chirurgickém oboru z mnoha důvodů obtížně proveditelné. Jednou z možností pro částečné doplnění chybějících dat jsou studie experimentální.

Biologické sítě disponují vysokou biokompatibilitou, abilitou inkorporace do tkáně příjemce a schopností vaskularizace, která zvyšuje rezistenci k infekcím. Užívají se v celém spektru chirurgických výkonů, ale jejich nejčastější klinickou indikací zůstává rekonstrukce břišní stěny. Jediným výrazným problémem, který je spojen s užitím těchto materiálů je jejich nákladnost (Primus & Harris, 2013). Biologické sítě jsou často 10x dražší než jejich syntetická analoga. Z mnoha publikovaných studií, které zmiňuji v této práci, pouze jedna upozorňuje na tento fakt (Shankaran, Weber, Reed, & Luchette, 2011). Vzhledem k ekonomickým limitům, kterým jsou klinická pracoviště vystavená, bude do budoucna nutné provedení důkladné finanční (cost - benefit) analýzy k přesnému stanovení indikací k užití těchto materiálů také ze strany nákladnosti a přínosů pro celý zdravotnický systém. V současné době můžeme říci, že užití biologických sítěk v nekontaminovaných případech je z důvodu vysokých cen pochybné.

Stabilita a jiné vlastnosti biologických sítěk jsou výrazně ovlivněny chemickým a fyzikálním zpracováním při jejich výrobě. Jednou z nejvíce užívaných možností zvýšení biostability biologických sítěk je síťování (cross-linking). Pokusy výrobců biologických sítěk zvýšit tímto jejich pevnost ale může vést k narušení biokompatibility a snížení síly vrůstání sítěk do tkání příjemce. Materiály se stanou příliš kompaktními aby do nich

mohly vrůstat cévy a jiné tkáně. To má za následek slabší spojení mezi materiálem a tkání příjemce, například břišní stěnou.

Skenovací elektronová mikroskopie ukazuje, že soudržnost a pružnost nesítované acelulární prasečí dermis je dána zachováním přirozené sítě silných kolagenních svazků (Tolde, Rosel, Vesely, Folk, & Brabek, 2010). Přítomnost přirozeného interfibrilárního materiálu pravděpodobně napomáhá invazi pojivové tkáně a formaci nových kapilár. To je předpokladem správné náhrady biologických materiálů tkání příjemce. V případě, že dojde k zesíťování materiálu, tato přirozená vlastnost extracelulárních matric se omezí.

Cílem disertační práce bylo zhodnotit biokompatibilitu a pevnost vrůstání do tkání příjemce sítované a nesítované acelulární prasečí dermis v modelu dlouhodobě sledované rekonstrukce břišní stěny na malém laboratorním zvířeti. Část těchto biomateriálů jsme obohatili o autologní kmenové buňky derivované z tukové tkáně k zjištění jejich vlivu na nejdůležitější sledované parametry – celularizaci, vaskularizaci a pevnost vrůstání do tkání příjemce. Předpokládali jsme, že nesítovaná acelulární prasečí dermis bude disponovat menší reakcí na cizí těleso než sítovaná acelulární prasečí dermis.

V literatuře jsou popsány velmi kontroverzní názory na užití sítovaných a nesítovaných biologických sítěk v experimentální i klinické praxi. Některé studie naznačují, že sítované extracelulární matrice jsou dlouhodobě stabilní s vysokou biokompatibilitou in vivo (Catena et al., 2007; de Castro Bras et al., 2010; Gaertner et al., 2007; Macleod et al., 2005; Mulier et al., 2011; O'Brien et al., 2011; Parker et al., 2006; Smart et al., 2012), zatímco jiné studie tvrdí, že jsou mnohem méně biokompatibilní a nevhodné k aplikaci v klinické praxi (Ayubi et al., 2008; Butler et al., 2010; Wotton, 2009) a potenciálně rizikové k rejekci (Petter-Puchner et al., 2008). Většina studií byla financována společnostmi produkujícími tyto materiály. Navíc,

studie testovaly materiály po dobu několika týdnů nebo měsíců. Podobné parametry uvedené studie devalvují.

Mnoho experimentálních studií bylo věnováno hodnocení extracelulárních matric pro rekonstrukci břišní stěny u primátů (Sandor et al., 2008), miniprasat (Melman et al., 2011) nebo morčat (Butler et al., 2010). Nicméně zdaleka nejčastějším zvířetem pro tyto testy byl potkan, který byl užit ve většině studií (Ayubi et al., 2008; de Castro Bras et al., 2012; Keller et al., 2010; Mulier et al., 2011; Petter-Puchner et al., 2008; Rice et al., 2009). Důvodem je ta skutečnost, že explantáty z těchto malých animálních modelů jsou dostatečné pro histologické vyšetření a mechanometrické testování.

Výsledky naší studie potvrdily, že nesíťovaná acelulární prasečí dermis je více biokompatibilní a umožňuje rychlejší stupeň penetrace buněk a vaskularizace oproti síťované acelulární prasečí dermis. Vyšší vaskularizace a celularizace je předpokladem vyšší rezistence vůči infekcím, která je největším klinickým benefitem acelulárních dermálních matric.

Při mechanickém testování materiálů jsme zjistili, že nesíťované acelulární prasečí dermis disponují silnějším vrůstáním do tkání příjemce oproti síťované acelulární prasečí dermis ve všech sledovaných časových horizontech (3, 6 a 12 měsíců).

Nesíťované acelulární prasečí dermis byly makroskopicky degradovány 3 měsíce od implantace, ale tato degradace dále mezi 3. a 12. měsícem od implantace nenarůstala. Předpokládali jsme korelát tohoto výrazného makroskopického ztenčení štěpů ve snížení jejich pevnosti. Tensiometrie však ukázala stejné mechanické vlastnosti u nesíťované acelulární prasečí dermis jako u síťované acelulární prasečí dermis. Tyto výsledky demonstrují, že tří-dimensionální struktura, orientace kolagenních vláken a složení implantátu jsou důležitější než jeho tloušťka. Struktury zodpovědné za mechanickou pevnost nesíťované acelulární prasečí dermis jsou odolnější vůči degradaci než struktury méně důležité pro mechanickou pevnost.

Rekonstrukce břišní stěny s užitím sítěk většinou selhávají spíše v oblasti spoje sítěk se svalovou fascií než v oblasti vlastní sítěk. Časné vytvoření silného spoje mezi sítkou a fascií je důležité pro snížení rizika rekurence kýly ve vztahu k potenciální separaci rozhraní sítka – fascie (Butler et al., 2010).

Maximální síla a napětí potřebné pro rupturu vzorků se během testovacího období zvyšovaly. Tento trend je pravděpodobně spojen s jejich postupnou silnější integrací do tkání příjemce a remodelací implantátu jako odpovědi na mechanické zatížení (Clemens van Blitterswijk, 2008).

Žádné ze zvířat ve studii nemělo nález pooperační hernie. U některých zvířat ze skupiny nesítované acelulární prasečí dermis vyskytlo vyklenutí břišní stěny, které pravděpodobně vzniklo následkem post implantační degradace biomateriálů a funkčními poruchami břišní stěny po jejím narušení.

V literatuře existuje několik studií sledující kombinaci kmenových buněk s biologickými sítkami. Zhao (Zhao et al., 2011) popisuje acelulární dermální matrix osídlenou autologními buňkami kostní dřeně při užití k rekonstrukci břišní stěny u králíka. Jiná studie od japonských autorů (Orbay, 2011) hodnotila resorpci acelulární dermální matrice osídlené autologními kmenovými buňkami derivovanými z tukové tkáně. V obou studiích bylo popsáno, že samostatné biologické sítěk podléhají degradaci po implantaci a že jejich osídlení kmenovými buňkami signifikantně zvyšuje jejich vaskularizaci a sílu vrůstání do tkání příjemce. V naší studii jsme nedospěli k závěru, že by osídlení biologických sítěk kmenovými buňkami vedlo k pomalejší degradaci nebo zvýšené vaskularizaci. Dle našeho názoru je sítování v současnosti jediným přístupem ke zpomalení degradace biologických sítěk (de Castro Bras et al., 2010; 2012; Oliver et al., 1980; 1982). Vaskularizace a celularizace u materiálů, které byly obohaceny o kmenové buňky nebyly vyšší než u materiálů neobohacených, nebo tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní.

Užití kmenových buněk z kostní dřeně pro osídlení biologických sítěk v klinické praxi je diskutabilní. Kmenové buňky derivované z tukové tkáně jsou velmi snadno přístupné. Jejich odběr disponuje minimální morbiditou dárcovského místa a existují také nástroje k izolaci kmenových buněk z tukové tkáně přímo na sále (Lin et al., 2008).

Výsledky studie byly odlišné od očekávání v několika aspektech. Kmenové buňky měly nesignifikantní vliv na vaskularizaci a celularizaci materiálů. Nalezli jsme ale signifikantně vyšší pevnost srůstu s tkání příjemce u nesítovaných materiálů obohacených o kmenové buňky. U materiálů sítovaných byla pevnost srůstu také vyšší, ale tento výsledek nebyl statisticky signifikantní.

Odlišně od výsledku výše zmíněných autorů (Orbay et al., 2011; Zhao et al., 2011), velký počet literálních pramenů demonstruje mimořádně dobré klinické vlastnosti biologických sítěk bez osídlení kmenovými buňkami, včetně komplikovaných případů (Butler, 2006; Hiles et al., 2009; Iannitti et al., 2008). Nástup užití těchto materiálů znamenal velký posun při terapiích rozsáhlých defektů břišní stěny u rizikových pacientů, zejména těch s tendencí k infekci materiálu. Předpokládané zlepšení parametrů síly vrůstání do tkání příjemce a zlepšení vaskularizace se nepotvrdilo.

Zhao (Zhao et al., 2011) popisuje zrychlenou regeneraci peritonea ve skupině biologických sítěk s obohacením kmenovými buňkami. Tato výhoda může napomoci snížit střevní adheze k materiálu a břišní stěně. Dle našeho názoru je izolace a osídlení kmenových buněk na sítky pro rekonstrukci břišní stěny velmi složitá procedura, která v tomto případě nevyváží možný klinický přínos.

Závěr

Výsledky naší studie prokázaly, že nesíťovaná acelulární prasečí dermis disponuje lepší biokompatibilitou a umožňuje vyšší vaskularizaci a celulární penetraci než síťovaná acelulární prasečí dermis. To vede k silnějším vrůstání do tkání příjemce a zlepšení pevnosti srůstu s břišní stěnou. Oba materiály si zachovaly pevnost v průběhu celé doby testování. Vyšší míra vrůstání elementů pozorovaná při histologickém vyšetření korelovala se silnějším vrůstáním do tkání zjištěným při mechanickém testování.

Oba materiály mají potenciál dobrých výsledků při klinickém užití. Nesíťované acelulární prasečí dermis mají potenciál k menšímu riziku rekurence hernie.

Osídlení biologických sítěk mezenchymálními kmenovými buňkami nevedlo k signifikantnímu zvýšení vaskularizace u síťované ani u nesíťované acelulární prasečí dermis. U síťované acelulární prasečí dermis nevede přidání kmenových buněk ke zvýšení síly vrůstání do tkání příjemce. U nesíťované acelulární prasečí dermis se po přidání kmenových buněk síla vrůstání do tkání příjemce signifikantně zvýšila. S ohledem na fakt, že izolace a obohacení biologických sítěk kmenovými buňkami je velmi komplexní procedura, neshledáváme dostatečné výhody tohoto obohacení k užití v klinické praxi.

Literatura

- Adams, W. P., Conner, W. C., Barton, F. E., & Rohrich, R. J. (2001). Optimizing breast-pocket irrigation: the post-betadine era. *Plastic and reconstructive surgery*, 107(6), 1596–1601.
- Adams, W. P., Jr, Rios, J. L., & Smith, S. J. (2006). Enhancing Patient Outcomes in Aesthetic and Reconstructive Breast Surgery Using Triple Antibiotic Breast Irrigation: Six-Year Prospective Clinical Study. *Plastic and reconstructive surgery*, 118(Supplement), 46S–52S. doi:10.1097/01.prs.0000185671.51993.7e
- Antony, A. K., McCarthy, C. M., Cordeiro, P. G., Mehrara, B. J., Pusic, A. L., Teo, E. H., et al. (2010). Acellular human dermis implantation in 153 immediate two-stage tissue expander breast reconstructions: determining the incidence and significant predictors of complications. *Plastic and reconstructive surgery*, 125(6), 1606–1614.
- Antony, A. K., McCarthy, C., Disa, J. J., & Mehrara, B. J. (2013). Bilateral Implant Breast Reconstruction: Outcomes, Predictors, and Matched Cohort Analysis in 730 2-Stage Breast Reconstructions Over 10 Years. *Ann Plast Surg*. doi:10.1097/SAP.0b013e31826af03e
- Armellino, M. F., De Stefano, G., Scardi, F., Forner, A. L., Ambrosino, F., Bellotti, R., et al. (2006). [Use of Permacol in complicated incisional hernia]. *Chir Ital*, 58(5), 627–630.
- Armour, A. D., Fish, J. S., Woodhouse, K. A., & Semple, J. L. (2006). A comparison of human and porcine acellularized dermis: interactions with human fibroblasts in vitro. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(3), 845–856. doi:10.1097/01.prs.0000204567.28952.9d
- Ayubi, F. S., Armstrong, P. J., Mattia, M. S., & Parker, D. M. (2008). Abdominal wall hernia repair: a comparison of Permacol and Surgisis grafts in a rat hernia model. *Hernia*, 12(4), 373–378. doi:10.1007/s10029-008-0359-z
- Badylak, S. F., Lantz, G. C., Coffey, A., & Geddes, L. A. (1989). Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *Journal of Surgical Research*, 47(1), 74–80.
- Badylak, S. F., Park, K., Peppas, N., McCabe, G., & Yoder, M. (2001). Marrow-derived cells populate scaffolds composed of xenogeneic extracellular matrix. *Exp Hematol*, 29(11), 1310–1318.
- Badylak, S. F., Tullius, R., Kokini, K., Shelbourne, K. D., Klootwyk, T., Voytik, S. L., et al. (1995). The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model. *J Biomed Mater Res*, 29(8), 977–985. doi:10.1002/jbm.820290809
- Badylak, S. F., Vorp, D. A., Spievack, A. R., Simmons-Byrd, A., Hanke, J., Freytes, D. O., et al. (2005). Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model. *Journal of Surgical Research*, 128(1), 87–97. doi:10.1016/j.jss.2005.03.002

- Badylak, S., Meurling, S., Chen, M., Spievack, A., & Simmons-Byrd, A. (2000). Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model. *J Pediatr Surg*, 35(7), 1097–1103. doi:10.1053/jpsu.2000.7834
- BARD, M., & SUTHERLAND, A. M. (1955). Psychological impact of cancer and its treatment. IV. Adaptation to radical mastectomy. *Cancer*, 8(4), 656–672.
- Bauer-Kreisel, P., Goepferich, A., & Blunk, T. (2010). Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Advanced drug delivery reviews*, 62(7-8), 798–813. doi:10.1016/j.addr.2010.04.003
- Becker, S., Saint-Cyr, M., Wong, C., Dauwe, P., Nagarkar, P., Thornton, J. F., & Peng, Y. (2009). AlloDerm versus DermaMatrix in immediate expander-based breast reconstruction: a preliminary comparison of complication profiles and material compliance. *Plastic and reconstructive surgery*, 123(1), 1–6– discussion 107–8.
- Bell, E., Ehrlich, H. P., Buttle, D. J., & Nakatsuji, T. (1981). Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science (New York, N.Y.)*, 211(4486), 1052–1054.
- Bernard, M. P., Chu, M. L., Myers, J. C., Ramirez, F., Eikenberry, E. F., & Prockop, D. J. (1983a). Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro alpha 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures that are conserved during evolution. *Biochemistry*, 22(22), 5213–5223.
- Bernard, M. P., Myers, J. C., Chu, M. L., Ramirez, F., Eikenberry, E. F., & Prockop, D. J. (1983b). Structure of a cDNA for the pro alpha 2 chain of human type I procollagen. Comparison with chick cDNA for pro alpha 2(I) identifies structurally conserved features of the protein and the gene. *Biochemistry*, 22(5), 1139–1145.
- Bertolini, F., Lohsiriwat, V., Petit, J.-Y., & Kolonin, M. G. (2012). Adipose tissue cells, lipotransfer and cancer: A challenge for scientists, oncologists and surgeons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1826(1), 209–214. doi:10.1016/j.bbcan.2012.04.004
- Bindingavele, V., Gaon, M., Ota, K. S., Kulber, D. A., & Lee, D.-J. (2007). Use of acellular cadaveric dermis and tissue expansion in postmastectomy breast reconstruction. *Br J Plast Surg*, 60(11), 1214–1218. doi:10.1016/j.bjps.2007.03.015
- Blatnik, J., Jin, J., & Rosen, M. (2008). Abdominal hernia repair with bridging acellular dermal matrix--an expensive hernia sac. *Am J Surg*, 196(1), 47–50. doi:10.1016/j.amjsurg.2007.06.035
- Brennan, E. P., Reing, J., Chew, D., Myers-Irvin, J. M., Young, E. J., & Badylak, S. F. (2006). Antibacterial activity within degradation products of biological scaffolds composed of extracellular matrix. *Tissue Eng*, 12(10), 2949–2955. doi:10.1089/ten.2006.12.2949
- Breuing, K. H., & Colwell, A. S. (2007). Inferolateral AlloDerm hammock for implant coverage in breast reconstruction. *Ann Plast Surg*, 59(3), 250–255.

- Breuing, K. H., & Warren, S. M. (2005). Immediate bilateral breast reconstruction with implants and inferolateral AlloDerm slings. *Ann Plast Surg*, 55(3), 232–239.
- Broderick, G., McIntyre, J., Noury, M., Strom, H. M., Psoinos, C., Christakas, A., et al. (2011). Dermal collagen matrices for ventral hernia repair: comparative analysis in a rat model. *Hernia*. doi:10.1007/s10029-011-0891-0
- Burkhardt, B. R. (2004). Detection of subclinical infections in significant breast implant capsules. *Plastic and reconstructive surgery*, 113(1), 448. doi:10.1097/01.PRS.0000100600.39532.EC
- Butler, C. E. (2006). The role of bioprosthesis in abdominal wall reconstruction. *Clin Plast Surg*, 33(2), 199–211–v–vi. doi:10.1016/j.cps.2005.12.009
- Butler, C. E., Burns, N. K., Campbell, K. T., Mathur, A. B., Jaffari, M. V., & Rios, C. N. (2010). Comparison of cross-linked and non-cross-linked porcine acellular dermal matrices for ventral hernia repair. *J Am Coll Surg*, 211(3), 368–376. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2010.04.024
- Candage, R., Jones, K., Luchette, F. A., Sinacore, J. M., Vandevender, D., & Reed, R. L. 2. (2008). Use of human acellular dermal matrix for hernia repair: friend or foe? *Surgery*, 144(4), 703–9– discussion 709–11. doi:10.1016/j.surg.2008.06.018
- Catena, F., Ansaloni, L., Gazzotti, F., Gagliardi, S., Di Saverio, S., D'Alessandro, L., & Pinna, A. D. (2007). Use of porcine dermal collagen graft (Permacol) for hernia repair in contaminated fields. *Hernia*, 11(1), 57–60. doi:10.1007/s10029-006-0171-6
- Chen, F., Yoo, J. J., & Atala, A. (1999). Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology*, 54(3), 407–410.
- Chun, Y. S., Sinha, I., Turko, A., Lipsitz, S., & Pribaz, J. J. (2010a). Outcomes and patient satisfaction following breast reconstruction with bilateral pedicled TRAM flaps in 105 consecutive patients. *Plastic and reconstructive surgery*, 125(1), 1–9. doi:10.1097/PRS.0b013e3181c2a620
- Chun, Y. S., Verma, K., Rosen, H., Lipsitz, S., Morris, D., Kenney, P., & Eriksson, E. (2010b). Implant-based breast reconstruction using acellular dermal matrix and the risk of postoperative complications. *Plastic and reconstructive surgery*, 125(2), 429–436.
- Clemens van Blitterswijk, P. T. A. L. J. H. D. F. W. R. C. J. D. de B. A. J. S. (2008). *Tissue Engineering*. (C. van Blitterswijk, Ed.) (First.). Elsevier Academic Press.
- Coleman, S. R. (2006). Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plastic and reconstructive surgery*, 118(3 Suppl), 108S–120S. doi:10.1097/01.prs.0000234610.81672.e7
- Coleman, S. R., & Saboeiro, A. P. (2007). Fat Grafting to the Breast Revisited: Safety and Efficacy. *Plastic and reconstructive surgery*, 119(3), 775–785. doi:10.1097-01.prs.0000252001.59162.c9.

- Connolly, P. T., Teubner, A., Lees, N. P., Anderson, I. D., Scott, N. A., & Carlson, G. L. (2008). Outcome of reconstructive surgery for intestinal fistula in the open abdomen. *Ann Surg*, *247*(3), 440–444. doi:10.1097/SLA.0b013e3181612c99
- consensus, I. (2010). Acellular matrices for the treatment of wounds. An expert working group review. *An expert working group. Wounds International*.
- Constantinou, C. D., & Jimenez, S. A. (1991). Structure of cDNAs encoding the triple-helical domain of murine alpha 2 (VI) collagen chain and comparison to human and chick homologues. Use of polymerase chain reaction and partially degenerate oligonucleotide for generation of novel cDNA clones. *Matrix*, *11*(1), 1–9.
- Cordeiro, P. G., & McCarthy, C. M. (2006). A single surgeon's 12-year experience with tissue expander/implant breast reconstruction: part II. An analysis of long-term complications, aesthetic outcomes, and patient satisfaction. *Plastic and reconstructive surgery*, *118*(4), 832–839.
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, *32*(12), 3233–3243. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
- de Castro Bras, L. E., Proffitt, J. L., Bloor, S., & Sibbons, P. D. (2010). Effect of crosslinking on the performance of a collagen-derived biomaterial as an implant for soft tissue repair: a rodent model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, *95*(2), 239–249. doi:10.1002/jbm.b.31704
- de Castro Bras, L. E., Shurey, S., & Sibbons, P. D. (2012). Evaluation of crosslinked and non-crosslinked biologic prostheses for abdominal hernia repair. *Hernia*, *16*(1), 77–89. doi:10.1007/s10029-011-0859-0
- Deeken, C. R., Melman, L., Jenkins, E. D., Greco, S. C., Frisella, M. M., & Matthews, B. D. (2011). Histologic and biomechanical evaluation of crosslinked and non-crosslinked biologic meshes in a porcine model of ventral incisional hernia repair. *J Am Coll Surg*, *212*(5), 880–888. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2011.01.006
- Delay, E., Garson, S., Tousson, G., & Sinna, R. (2009). Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years. *Aesthet Surg J*, *29*(5), 360–376. doi:10.1016/j.asj.2009.08.010
- Dvorankova, B., Broz, L., Pafcuga, I., Kapounkova, Z., & Konigova, R. (2004). The role of skin bank in the treatment of severely burnt patients. *Acta Chir Plast*, *46*(2), 51–55.
- Eid, G. M., Mattar, S. G., Hamad, G., Cottam, D. R., Lord, J. L., Watson, A., et al. (2004). Repair of ventral hernias in morbidly obese patients undergoing laparoscopic gastric bypass should not be deferred. *Surg Endosc*, *18*(2), 207–210. doi:10.1007/s00464-003-8915-1
- Eriksson, A., Rosenberg, J., & Bisgaard, T. (2013). Surgical treatment for giant incisional hernia: a qualitative systematic review. *Hernia*. doi:10.1007/s10029-013-1066-y

- Ewalt, D. H., Howard, P. S., Blyth, B., Snyder, H. M. 3., Duckett, J. W., Levin, R. M., & Macarak, E. J. (1992). Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? *J Urol*, *148*(2 Pt 2), 544–549.
- Exposito, J. Y., D'Alessio, M., Solursh, M., & Ramirez, F. (1992). Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro-alpha 2(I) collagen. *J Biol Chem*, *267*(22), 15559–15562.
- Fang, B., Luo, S., Song, Y., Li, N., & Cao, Y. (2009). Hemangioblastic characteristics of human adipose tissue-derived adult stem cells in vivo. *Archives of medical research*, *40*(4), 311–317. doi:10.1016/j.arcmed.2009.04.007
- Freytes, D. O., Badylak, S. F., Webster, T. J., Geddes, L. A., & Rundell, A. E. (2004). Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, *25*(12), 2353–2361.
- Gaertner, W. B., Bonsack, M. E., & Delaney, J. P. (2007). Experimental evaluation of four biologic prostheses for ventral hernia repair. *J Gastrointest Surg*, *11*(10), 1275–1285. doi:10.1007/s11605-007-0242-8
- Gamboa-Bobadilla, G. M. (2006). Implant breast reconstruction using acellular dermal matrix. *Ann Plast Surg*, *56*(1), 22–25.
- Garvey, P. B., Buchel, E. W., Pockaj, B. A., Casey, W. J. 3., Gray, R. J., Hernandez, J. L., & Samson, T. D. (2006). DIEP and pedicled TRAM flaps: a comparison of outcomes. *Plastic and reconstructive surgery*, *117*(6), 1711–9– discussion 1720–1. doi:10.1097/01.prs.0000210679.77449.7d
- Ghazi, B., Deigni, O., Yezhelyev, M., & Losken, A. (2011). Current options in the management of complex abdominal wall defects. *Ann Plast Surg*, *66*(5), 488–492. doi:10.1097/SAP.0b013e31820d18db
- Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, *27*(19), 3675–3683. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.014
- Gilbert, T. W., Stolz, D. B., Biancaniello, F., Simmons-Byrd, A., & Badylak, S. F. (2005). Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials*, *26*(12), 1431–1435. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.04.042
- Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, *100*(9), 1249–1260. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09
- Gir, P., Brown, S. A., Oni, G., Kashefi, N., Mojallal, A., & Rohrich, R. J. (2012). Fat grafting: evidence-based review on autologous fat harvesting, processing, reinjection, and storage. *Plastic and reconstructive surgery*, *130*(1), 249–258.
- Gomillion, C. T., & Burg, K. J. L. (2006). Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*, *27*(36), 6052–6063. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.07.033

- Gupta, A., Zahriya, K., Mullens, P. L., Salmassi, S., & Keshishian, A. (2006). Ventral herniorrhaphy: experience with two different biosynthetic mesh materials, Surgisis and AlloDerm. *Hernia*, *10*(5), 419–425. doi:10.1007/s10029-006-0130-2
- Hammond, T. M., Chin-Aleong, J., Navsaria, H., & Williams, N. S. (2008). Human in vivo cellular response to a cross-linked acellular collagen implant. *Br J Surg*, *95*(4), 438–446. doi:10.1002/bjs.5883
- Harrison, J. H., Lincoln, A. F., & Swanson, D. S. (1957). A comparison of the tissue reactions to plastic materials; dacron, ivalon sponge, nylon, orlon, and teflon. *AMA Arch Surg*, *74*(1), 139–144.
- Helton, W. S., Fisichella, P. M., Berger, R., Horgan, S., Espat, N. J., & Abcarian, H. (2005). Short-term outcomes with small intestinal submucosa for ventral abdominal hernia. *Arch Surg*, *140*(6), 549–60– discussion 560–2. doi:10.1001/archsurg.140.6.549
- Hiles, M., Record Ritchie, R. D., & Altizer, A. M. (2009). Are biologic grafts effective for hernia repair?: a systematic review of the literature. *Surg Innov*, *16*(1), 26–37. doi:10.1177/1553350609331397
- Höer, J., Lawong, G., Klinge, U., & Schumpelick, V. (2002). [Factors influencing the development of incisional hernia. A retrospective study of 2,983 laparotomy patients over a period of 10 years]. *Chirurg*, *73*(5), 474–480. doi:10.1007/s00104-002-0425-5
- Hsu, P. W., Salgado, C. J., Kent, K., Finnegan, M., Pello, M., Simons, R., et al. (2009). Evaluation of porcine dermal collagen (Permacol) used in abdominal wall reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, *62*(11), 1484–1489. doi:10.1016/j.bjps.2008.04.060
- Iannitti, D. A., Hope, W. W., Norton, H. J., Lincourt, A. E., Millikan, K., Fenoglio, M. E., & Moskowitz, M. (2008). Technique and outcomes of abdominal incisional hernia repair using a synthetic composite mesh: a report of 455 cases. *J Am Coll Surg*, *206*(1), 83–88. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2007.07.030
- Illouz, Y. G., & Sterodimas, A. (Eds.). (2011). *Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine*. Berlin: Springer-Verlag.
- Jansen, L. A., & Macadam, S. A. (2011a). The use of AlloDerm in postmastectomy alloplastic breast reconstruction: part I. A systematic review. *Plastic and reconstructive surgery*, *127*(6), 2232–2244.
- Jansen, L. A., & Macadam, S. A. (2011b). The use of AlloDerm in postmastectomy alloplastic breast reconstruction: part II. A cost analysis. *Plastic and reconstructive surgery*, *127*(6), 2245–2254.
- Jenkins, E. D., Melman, L., Deeken, C. R., Greco, S. C., Frisella, M. M., & Matthews, B. D. (2010). Evaluation of fenestrated and non-fenestrated biologic grafts in a porcine model of mature ventral incisional hernia repair. *Hernia*, *14*(6), 599–610. doi:10.1007/s10029-010-0684-x

- Jernigan, T. W., Croce, M. A., Cagiannos, C., Shell, D. H., Handorf, C. R., & Fabian, T. C. (2004). Small intestinal submucosa for vascular reconstruction in the presence of gastrointestinal contamination. *Ann Surg*, 239(5), 733–8– discussion 738–40.
- Jin, J., Rosen, M. J., Blatnik, J., McGee, M. F., Williams, C. P., Marks, J., & Ponsky, J. (2007). Use of acellular dermal matrix for complicated ventral hernia repair: does technique affect outcomes? *J Am Coll Surg*, 205(5), 654–660. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2007.06.012
- Kamakura, T., & Ito, K. (2011). Autologous Cell-Enriched Fat Grafting for Breast Augmentation. *Aesthetic plastic surgery*, 35(6), 1022–1030. doi:10.1007/s00266-011-9727-7
- Keane, T. J., Londono, R., Turner, N. J., & Badylak, S. F. (2012). Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*, 33(6), 1771–1781. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.054
- Keller, J. E., Dolce, C. J., Walters, K. C., Heath, J. J., Peindl, R. D., Kercher, K. W., et al. (2010). Effect of Bacterial Exposure on Acellular Human Dermis in a Rat Ventral Hernia Model. *Journal of Surgical Research*, 162(1), 148–152. doi:10.1016/j.jss.2009.03.083
- Khan, U. D. (2009). Breast Augmentation, Antibiotic Prophylaxis, and Infection: Comparative Analysis of 1,628 Primary Augmentation Mammoplasties Assessing the Role and Efficacy of Antibiotics Prophylaxis Duration. *Aesthetic plastic surgery*, 34(1), 42–47. doi:10.1007/s00266-009-9427-8
- Ko, J. H., Salvay, D. M., Paul, B. C., Wang, E. C., & Dumanian, G. A. (2009). Soft polypropylene mesh, but not cadaveric dermis, significantly improves outcomes in midline hernia repairs using the components separation technique. *Plastic and reconstructive surgery*, 124(3), 836–847. doi:10.1097/PRS.0b013e3181b0380e
- Kolker, A. R., Brown, D. J., Redstone, J. S., Scarpinato, V. M., & Wallack, M. K. (2005). Multilayer reconstruction of abdominal wall defects with acellular dermal allograft (AlloDerm) and component separation. *Ann Plast Surg*, 55(1), 36–41– discussion 41–2.
- Komorowska-Timek, E., Oberg, K. C., Timek, T. A., Gridley, D. S., & Miles, D. A. G. (2009). The effect of AlloDerm envelopes on periprosthetic capsule formation with and without radiation. *Plastic and reconstructive surgery*, 123(3), 807–816.
- Korenkov, M., Paul, A., Sauerland, S., Neugebauer, E., Arndt, M., Chevrel, J. P., et al. (2001). Classification and surgical treatment of incisional hernia. Results of an experts' meeting. *Langenbecks Arch Surg*, 386(1), 65–73.
- Kropp, B. P., Eppley, B. L., Prevel, C. D., Rippey, M. K., Harruff, R. C., Badylak, S. F., et al. (1995). Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute. *Urology*, 46(3), 396–400. doi:10.1016/s0090-4295(99)80227-1
- le Roux, P. J. (2005). Endoscopic urethroplasty with unseeded small intestinal submucosa collagen matrix grafts: a pilot study. *J Urol*, 173(1), 140–143. doi:10.1097/01.ju.0000146554.79487.7f

- Li, F., Li, W., Johnson, S., Ingram, D., Yoder, M., & Badylak, S. (2004). Low-molecular-weight peptides derived from extracellular matrix as chemoattractants for primary endothelial cells. *Endothelium*, 11(3-4), 199–206. doi:10.1080/10623320490512390
- Lin, K., Matsubara, Y., Masuda, Y., Togashi, K., Ohno, T., Tamura, T., et al. (2008). Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system. *Cytotherapy*, 10(4), 417–426. doi:10.1080/14653240801982979
- Loganathan, A., Ainslie, W. G., & Wedgwood, K. R. (2010). Initial evaluation of Permacol bioprosthesis for the repair of complex incisional and parastomal hernias. *Surgeon*, 8(4), 202–205. doi:10.1016/j.surge.2009.11.002
- Lopes, M. F., Cabrita, A., Ilharco, J., Pessa, P., & Patricio, J. (2006). Grafts of porcine intestinal submucosa for repair of cervical and abdominal esophageal defects in the rat. *J Invest Surg*, 19(2), 105–111. doi:10.1080/08941930600569621
- Losken, A. (2009). Early Results Using Sterilized Acellular Human Dermis (Neoforn) in Post-Mastectomy Tissue Expander Breast Reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*. doi:10.1097/PRS.0b013e31819c4337
- Macleod, T. M., Williams, G., Sanders, R., & Green, C. J. (2005). Histological evaluation of Permacol as a subcutaneous implant over a 20-week period in the rat model. *Br J Plast Surg*, 58(4), 518–532. doi:10.1016/j.bjps.2004.12.012
- Mantovani, F., Trinchieri, A., Castelnovo, C., Romano, A. L., & Pisani, E. (2003). Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix. *Eur Urol*, 44(5), 600–602.
- Mathapati, S., Verma, R. S., Cherian, K. M., & Guhathakurta, S. (2011). Inflammatory responses of tissue-engineered xenografts in a clinical scenario. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 12(3), 360–365. doi:10.1510/icvts.2010.256719
- Matouskova, E., Broz, L., Pokorna, E., & Konigova, R. (2002). Prevention of burn wound conversion by allogeneic keratinocytes cultured on acellular xenodermis. *Cell Tissue Bank*, 3(1), 29–35.
- Matouskova, E., Broz, L., Stolbova, V., Klein, L., Konigova, R., & Vesely, P. (2006). Human allogeneic keratinocytes cultured on acellular xenodermis: the use in healing of burns and other skin defects. *Biomed Mater Eng*, 16(4 Suppl), S63–71.
- Matouskova, E., Vogtova, D., & Konigova, R. (1993). A recombined skin composed of human keratinocytes cultured on cell-free pig dermis. *Burns*, 19(2), 118–123.
- Medberry, C. J., Tottey, S., Jiang, H., Johnson, S. A., & Badylak, S. F. (2010). Resistance to Infection of Five Different Materials in a Rat Body Wall Model. *J Surg Res*. doi:10.1016/j.jss.2010.08.035
- Melman, L., Jenkins, E. D., Hamilton, N. A., Bender, L. C., Brodt, M. D., Deeken, C. R., et al. (2011). Early biocompatibility of crosslinked and non-crosslinked biologic meshes in a porcine model of ventral hernia repair. *Hernia*, 15(2), 157–164. doi:10.1007/s10029-010-0770-0

- Mertsching, H., Walles, T., Hofmann, M., Schanz, J., & Knapp, W. H. (2005). Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials*, *26*(33), 6610–6617. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.048
- Mestak, O., & Zimovjanová, M. (2012). [Breast reconstruction by autologous fat transfer]. *Rozhl Chir*, *91*(7), 373–377.
- Mostow, E. N., Haraway, G. D., Dalsing, M., Hodde, J. P., King, D., & Group, O. V. U. S. (2005). Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: a randomized clinical trial. *J Vasc Surg*, *41*(5), 837–843. doi:10.1016/j.jvs.2005.01.042
- Mudge, M., & Hughes, L. E. (1985). Incisional hernia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes. *Br J Surg*, *72*(1), 70–71.
- Mulier, K. E., Nguyen, A. H., Delaney, J. P., & Marquez, S. (2011). Comparison of Permacol and Strattice for the repair of abdominal wall defects. *Hernia*, *15*(3), 315–319. doi:10.1007/s10029-010-0777-6
- Muysoms, F. E., Miserez, M., Berrevoet, F., Campanelli, G., Champault, G. G., Chelala, E., et al. (2009). Classification of primary and incisional abdominal wall hernias. *Hernia*, *13*(4), 407–414. doi:10.1007/s10029-009-0518-x
- Nahabedian, M. Y. (2007). Does AlloDerm stretch? *Plastic and reconstructive surgery*, *120*(5), 1276–1280. doi:10.1097/01.prs.0000279342.48795.9a
- Nahabedian, M. Y. (2009a). AlloDerm performance in the setting of prosthetic breast surgery, infection, and irradiation. *Plastic and reconstructive surgery*, *124*(6), 1743–1753. doi:10.1097/PRS.0b013e3181bf8087
- Nahabedian, M. Y. (2009b). Breast reconstruction: a review and rationale for patient selection. *Plastic and reconstructive surgery*, *124*(1), 55–62. doi:10.1097/PRS.0b013e31818b8c23
- Netscher, D. T., Weizer, G., Wigoda, P., Walker, L. E., Thornby, J., & Bowen, D. (1995). Clinical relevance of positive breast periprosthetic cultures without overt infection. *Plastic and reconstructive surgery*, *96*(5), 1125–1129.
- Novitsky, Y. W., & Rosen, M. J. (2012). The biology of biologics: basic science and clinical concepts. *Plastic and reconstructive surgery*, *130*(5 Suppl 2), 9S–17S. doi:10.1097/PRS.0b013e31825f395b
- O'Brien, J. A., Ignatz, R., Montilla, R., Broderick, G. B., Christakis, A., & Dunn, R. M. (2011). Long-term histologic and mechanical results of a Permacol abdominal wall explant. *Hernia*, *15*(2), 211–215. doi:10.1007/s10029-010-0628-5
- Oliver, R. F., Barker, H., Cooke, A., & Stephen, L. (1982). 3H-collagen turnover in non-cross-linked and aldehyde-cross-linked dermal collagen grafts. *Br J Exp Pathol*, *63*(1), 13–17.
- Oliver, R. F., Grant, R. A., Cox, R. W., & Cooke, A. (1980). Effect of aldehyde cross-linking on human dermal collagen implants in the rat. *Br J Exp Pathol*, *61*(5), 544–549.

- Oliver, R. F., Grant, R. A., Cox, R. W., Hulme, M. J., & Mudie, A. (1976). Histological studies of subcutaneous and intraperitoneal implants of trypsin-prepared dermal collagen allografts in the rat. *Clin Orthop Relat Res*, (115), 291–302.
- Oliver, R. F., Hulme, M. J., Mudie, A., & Grant, R. A. (1975). Skin collagen allografts in the rat. *Nature*, 258(5535), 537–539.
- Orbay, H., Takami, Y., Hyakusoku, H., & Mizuno, H. (2011). Acellular Dermal Matrix Seeded with Adipose-Derived Stem Cells as a Subcutaneous Implant. *Aesthetic plastic surgery*, 35(5), 756–763. doi:10.1007/s00266-011-9683-2
- Pajkos, A., Deva, A. K., Vickery, K., Cope, C., Chang, L., & Cossart, Y. E. (2003). Detection of Subclinical Infection in Significant Breast Implant Capsules. *Plastic and reconstructive surgery*, 111(5), 1605–1611. doi:10.1097/01.PRS.0000054768.14922.44
- Pannucci, C. J., Antony, A. K., & Wilkins, E. G. (2013). The impact of acellular dermal matrix on tissue expander/implant loss in breast reconstruction: an analysis of the tracking outcomes and operations in plastic surgery database. *Plastic and reconstructive surgery*, 132(1), 1–10. doi:10.1097/PRS.0b013e318290f917
- Parker, D. M., Armstrong, P. J., Frizzi, J. D., & North, J. H. J. (2006). Porcine dermal collagen (Permacol) for abdominal wall reconstruction. *Curr Surg*, 63(4), 255–258. doi:10.1016/j.cursur.2006.05.003
- Patel, K. M., Nahabedian, M. Y., Gatti, M., & Bhanot, P. (2012). Indications and outcomes following complex abdominal reconstruction with component separation combined with porcine acellular dermal matrix reinforcement. *Ann Plast Surg*, 69(4), 394–398. doi:10.1097/SAP.0b013e31822f997b
- Petter-Puchner, A. H., Fortelny, R. H., Walder, N., Mittermayr, R., Ohlinger, W., van Griensven, M., & Redl, H. (2008). Adverse effects associated with the use of porcine cross-linked collagen implants in an experimental model of incisional hernia repair. *J Surg Res*, 145(1), 105–110. doi:10.1016/j.jss.2007.03.090
- Preminger, B. A., McCarthy, C. M., Hu, Q. Y., Mehrara, B. J., & Disa, J. J. (2008). The influence of AlloDerm on expander dynamics and complications in the setting of immediate tissue expander/implant reconstruction: a matched-cohort study. *Ann Plast Surg*, 60(5), 510–513.
- Primus, F. E., & Harris, H. W. (2013). A critical review of biologic mesh use in ventral hernia repairs under contaminated conditions. *Hernia*, 17(1), 21–30. doi:10.1007/s10029-012-1037-8
- Prunieras, M., Regnier, M., & Woodley, D. (1983). Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *The Journal of investigative dermatology*, 81(1 Suppl), 28s–33s.
- Ramirez, O. M., Ruas, E., & Dellon, A. L. (1990). "Components separation" method for closure of abdominal-wall defects: an anatomic and clinical study. *Plastic and reconstructive surgery*, 86(3), 519–526.

- Ramsden, A. J., Allen, V., & O'Donoghue, J. M. (2009). Anterior rectus sheath repair with porcine collagen (Permacol) in patients undergoing breast reconstruction with free abdominal flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, *62*(6), e170–1. doi:10.1016/j.bjps.2008.08.072
- Rheinwald, J. G., & Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, *6*(3), 331–343.
- Rice, R. D., Ayubi, F. S., Shaub, Z. J., Parker, D. M., Armstrong, P. J., & Tsai, J. W. (2009). Comparison of Surgisis®, AlloDerm®, and Vicryl Woven Mesh® Grafts for Abdominal Wall Defect Repair in an Animal Model. *Aesthetic plastic surgery*, *34*(3), 290–296. doi:10.1007/s00266-009-9449-2
- Rieger, U. M., Mesina, J., Kalbermatten, D. F., Haug, M., Frey, H. P., Pico, R., et al. (2013). Bacterial biofilms and capsular contracture in patients with breast implants. *Br J Surg*, *100*(6), 768–774. doi:10.1002/bjs.9084
- Rietjens, M., De Lorenzi, F., Rossetto, F., Brenelli, F., Manconi, A., Martella, S., et al. (2011). Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after cancer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, *64*(4), 477–483. doi:10.1016/j.bjps.2010.06.024
- Rohrich, R. J., Adams, W. P. J., Beran, S. J., Rathakrishnan, R., Griffin, J., Robinson, J. B. J., & Kenkel, J. M. (1998). An analysis of silicone gel-filled breast implants: diagnosis and failure rates. *Plastic and reconstructive surgery*, *102*(7), 2304–8– discussion 2309.
- Ruiz, C. E., Iemura, M., Medie, S., Varga, P., Van Alstine, W. G., Mack, S., et al. (2005). Transcatheter placement of a low-profile biodegradable pulmonary valve made of small intestinal submucosa: a long-term study in a swine model. *J Thorac Cardiovasc Surg*, *130*(2), 477–484. doi:10.1016/j.jtcvs.2005.04.008
- Sacks, M. S., & Gloeckner, D. C. (1999). Quantification of the fiber architecture and biaxial mechanical behavior of porcine intestinal submucosa. *J Biomed Mater Res*, *46*(1), 1–10.
- Sailes, F. C., Walls, J., Guelig, D., Mirzabeigi, M., Long, W. D., Crawford, A., et al. (2010). Synthetic and biological mesh in component separation: a 10-year single institution review. *Ann Plast Surg*, *64*(5), 696–698. doi:10.1097/SAP.0b013e3181dc8409
- Salzberg, C. A. (2006). Nonexpansive immediate breast reconstruction using human acellular tissue matrix graft (AlloDerm). *Ann Plast Surg*, *57*(1), 1–5.
- Sandor, M., Xu, H., Connor, J., Lombardi, J., Harper, J. R., Silverman, R. P., & McQuillan, D. J. (2008). Host response to implanted porcine-derived biologic materials in a primate model of abdominal wall repair. *Tissue Eng Part A*, *14*(12), 2021–2031. doi:10.1089/ten.tea.2007.0317
- Sandrin, M. S., & McKenzie, I. F. (1994). Gal alpha (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies. *Immunol Rev*, *141*, 169–190.

- Sarikaya, A., Record, R., Wu, C. C., Tullius, B., Badylak, S., & Ladisch, M. (2002). Antimicrobial activity associated with extracellular matrices. *Tissue Eng*, 8(1), 63–71. doi: 10.1089/107632702753503063
- Sbitany, H., Sandeen, S. N., Amalfi, A. N., Davenport, M. S., & Langstein, H. N. (2009). Acellular dermis-assisted prosthetic breast reconstruction versus complete submuscular coverage: a head-to-head comparison of outcomes. *Plastic and reconstructive surgery*, 124(6), 1735–1740.
- Scott, B. G., Welsh, F. J., Pham, H. Q., Carrick, M. M., Liscum, K. R., Granchi, T. S., et al. (2006). Early aggressive closure of the open abdomen. *J Trauma*, 60(1), 17–22. doi: 10.1097/01.ta.0000200861.96568.bb
- Sensebe, L., Krampera, M., Schrezenmeier, H., Bourin, P., & Giordano, R. (2010). Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*, 98(2), 93–107. doi:10.1111/j.1423-0410.2009.01227.x
- Serletti, J. M., Fosnot, J., Nelson, J. A., Disa, J. J., & Bucky, L. P. (2011). Breast reconstruction after breast cancer. *Plastic and reconstructive surgery*, 127(6), 124e–35e. doi:10.1097/PRS.0b013e318213a2e6
- Shankaran, V., Weber, D. J., Reed, R. L., II, & Luchette, F. A. (2011). A review of available prosthetics for ventral herni... [Ann Surg. 2011] - PubMed - NCBI. *Annals of Surgery*, 253(1), 16–26. doi:10.1097/SLA.0b013e3181f9b6e6
- Shenaq, S. M., & Yuksel, E. (2002). New research in breast reconstruction: adipose tissue engineering. *Clin Plast Surg*, 29(1), 111–25–vi.
- Smart, N. J., Marshall, M., & Daniels, I. R. (2012). Biological meshes: a review of their use in abdominal wall hernia repairs. *Surgeon*, 10(3), 159–171. doi:10.1016/j.surge.2012.02.006
- Smith, M., Hooks, V. H., & Jenkins, B. (2007). Patch repair of ileoanal pouch-vaginal fistula with Permacol collagen implant. *Am Surg*, 73(5), 514–515.
- Spear, S. L., & Baker, J. L. J. (1995). Classification of capsular contracture after prosthetic breast reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*, 96(5), 1119–23– discussion 1124.
- Spear, S. L., Parikh, P. M., Reisin, E., & Menon, N. G. (2008). Acellular dermis-assisted breast reconstruction. *Aesthetic plastic surgery*, 32(3), 418–425. doi:10.1007/s00266-008-9128-8
- Spear, S. L., Sher, S. R., Al-Attar, A., & Pittman, T. (2013). Applications of Acellular Dermal Matrix in Revision Breast Reconstruction Surgery. *Plastic and reconstructive surgery*. doi:10.1097/01.prs.0000436810.88659.36
- Strem, B. M., & Hedrick, M. H. (2005). The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol*, 23(2), 64–66. doi:10.1016/j.tibtech.2004.12.003

- Tamboto, H., Vickery, K., & Deva, A. K. (2010). Subclinical (biofilm) infection causes capsular contracture in a porcine model following augmentation mammoplasty. *Plastic and reconstructive surgery*, 126(3), 835–842.
- Tolde, O., Rosel, D., Vesely, P., Folk, P., & Brabek, J. (2010). The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *Eur J Cell Biol*, 89(9), 674–680. doi:10.1016/j.ejcb.2010.04.003
- Topol, B. M., Dalton, E. F., Ponn, T., & Campbell, C. J. (2008). Immediate single-stage breast reconstruction using implants and human acellular dermal tissue matrix with adjustment of the lower pole of the breast to reduce unwanted lift. *Ann Plast Surg*, 61(5), 494–499.
- Ueno, T., Pickett, L. C., la Fuente, de, S. G., Lawson, D. C., & Pappas, T. N. (2004). Clinical application of porcine small intestinal submucosa in the management of infected or potentially contaminated abdominal defects. *J Gastrointest Surg*, 8(1), 109–112.
- Utsunomiya, T., Shimada, M., Imura, S., Morine, Y., Ikemoto, T., Mori, H., et al. (2011). Human adipose-derived stem cells: potential clinical applications in surgery. *Surg Today*, 41(1), 18–23. doi:10.1007/s00595-010-4415-9
- van Heerden, J., Turner, M., Hoffmann, D., & Moolman, J. (2009). Antimicrobial coating agents: can biofilm formation on a breast implant be prevented? *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 62(5), 610–617. doi:10.1016/j.bjps.2007.09.044
- Vega, S., Smartt, J. M. J., Jiang, S., Selber, J. C., Brooks, C. J., Herrera, H. R., & Serletti, J. M. (2008). 500 Consecutive patients with free TRAM flap breast reconstruction: a single surgeon's experience. *Plastic and reconstructive surgery*, 122(2), 329–339. doi:10.1097/PRS.0b013e31817f45cb
- Ventral Hernia Working Group, Breuing, K., Butler, C. E., Ferzoco, S., Franz, M., Hultman, C. S., et al. (2010). Incisional ventral hernias: review of the literature and recommendations regarding the grading and technique of repair. *Surgery*, 148(3), 544–558. doi:10.1016/j.surg.2010.01.008
- Virden, C. P., Dobke, M. K., Stein, P., Parsons, C. L., & Frank, D. H. (1992). Subclinical infection of the silicone breast implant surface as a possible cause of capsular contracture. *Aesthetic plastic surgery*, 16(2), 173–179.
- Wilkins, L. M., Watson, S. R., Prosky, S. J., Meunier, S. F., & Parenteau, N. L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnology and bioengineering*, 43(8), 747–756. doi:10.1002/bit.260430809
- Wixtrom, R. N., Stutman, R. L., Burke, R. M., Mahoney, A. K., & Codner, M. A. (2012). Risk of breast implant bacterial contamination from endogenous breast flora, prevention with nipple shields, and implications for biofilm formation. *Aesthet Surg J*, 32(8), 956–963. doi:10.1177/1090820X12456841
- Wotton, F. T. (2009). Rejection of Permacol(R) mesh used in abdominal wall repair: A case report. *World Journal of Gastroenterology*, 15(34), 4331. doi:10.3748/wjg.15.4331

- Wu, L. C., Bajaj, A., Chang, D. W., & Chevray, P. M. (2008). Comparison of donor-site morbidity of SIEA, DIEP, and muscle-sparing TRAM flaps for breast reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*, 122(3), 702–709. doi:10.1097/PRS.0b013e3181823c15
- Yoshimura, K., Suga, H., & Eto, H. (2009). Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med*, 4(2), 265–273. doi:10.2217/17460751.4.2.265
- Zajicek, R., Mandys, V., Mestak, O., Sevcik, J., Königova, R., & Matouskova, E. (2012). Human keratinocyte growth and differentiation on acellular porcine dermal matrix in relation to wound healing potential. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 727352. doi:10.1100/2012/727352
- Zajicek, R., Matouskova, E., Broz, L., Kubok, R., Waldauf, P., & Königova, R. (2011). New biological temporary skin cover Xe-Derma((R)) in the treatment of superficial scald burns in children. *Burns*, 37(2), 333–337. doi:10.1016/j.burns.2010.07.009
- Zantop, T., Gilbert, T. W., Yoder, M. C., & Badylak, S. F. (2006). Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of achilles tendon reconstruction. *J Orthop Res*, 24(6), 1299–1309. doi:10.1002/jor.20071
- Zhao, Y., Zhang, Z., Wang, J., Yin, P., Zhou, J., Zhen, M., et al. (2011). Abdominal Hernia Repair With a Decellularized Dermal Scaffold Seeded With Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Artif Organs*, 36(3), 247–255. doi:10.1111/j.1525-1594.2011.01343.x
- Zienowicz, R. J., & Karacaoglu, E. (2007). Implant-based breast reconstruction with allograft. *Plastic and reconstructive surgery*, 120(2), 373–381.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., et al. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13(12), 4279–4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105

Identifikační záznam:

MĚŠŤÁK, Ondřej. Užití biologických materiálů k náhradě tkání v plastické chirurgii. [Use of biological materials for tissue substitution in plastic surgery]. Praha, 2013. xx stran, x příloh. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika plastické chirurgie. Školitel Sukop, Andrej

Mesenchymal Stem Cells Seeded on Cross-Linked and Noncross-Linked Acellular Porcine Dermal Scaffolds for Long-Term Full-Thickness Hernia Repair in a Small Animal Model

*Ondrej Mestak, †Eva Matouskova, ‡Zuzana Spurkova, ‡Kamila Benkova, *Pavel Vesely, *Jan Mestak, *Martin Molitor, and §Andrej Sukop

**Department of Plastic Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Bulovka Hospital; †Laboratory of Cell Biology, Prague Burn Centre, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague; ‡Department of Pathology, Bulovka Hospital; and §Department of Plastic Surgery, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic*

Abstract: Background. Biological meshes are biomaterials consisting of extracellular matrix that are used in surgery particularly for hernia treatment, thoracic wall reconstruction, or silicon implant-based breast reconstruction. We hypothesized that combination of extracellular matrices with autologous mesenchymal stem cells used for hernia repair would result in increased vascularization and increased strength of incorporation. **Methods.** We cultured autologous adipose-derived stem cells harvested from the inguinal region of Wistar rats on cross-linked and noncross-linked porcine extracellular matrices. In 24 Wistar rats, a standardized 2 × 4 cm fascial defect was created and repaired with either cross-linked or noncross-linked grafts enriched with stem cells. Non-MSCs-enriched grafts were used as controls. The rats were sacrificed at 3 months of age. The specimens were examined for the strength of incorporation, vascularization, cell invasion, foreign body reaction, and capsule formation. **Results.** Both materials showed cellular ingrowth and neovascularization. Comparison of

both tested groups with the controls showed no significant differences in the capsule thickness, foreign body reaction, cellularization, or vascularization. The strength of incorporation of the stem cell-enriched cross-linked extracellular matrix specimens was higher than in acellular specimens, but this result was statistically nonsignificant. In the noncross-linked extracellular matrix, the strength of incorporation was significantly higher in the stem cell group than in the acellular group. **Conclusion.** Seeding of biological meshes with stem cells does not significantly contribute to their increased vascularization. In cross-linked materials, it does not ensure increased strength of incorporation, in contrast to noncross-linked materials. Owing to the fact that isolation and seeding of stem cells is a very complex procedure, we do not see sufficient benefits for its use in the clinical setting. **Key Words:** Extracellular matrix—Scaffold—Biologics—Acellular matrix—Histometrics—Biocompatibility—Animal model—Cross-linking—Hernia—Mesenchymal stem cells—Adipose-derived stem cells.

There are many materials used for tissue replacement in modern surgery including those derived from extracellular matrix (ECM). These biological meshes are derived from different human and animal tissues

such as human dermis, porcine dermis, porcine small intestine submucosa, or bovine pericardium. The largest benefit of these materials is their ability of better vascularization and integration into the host tissue in comparison to synthetic materials (1–3). This increases the safety of mesh use in contaminated areas with large risk of synthetic mesh infection (4,5). ECMs are used particularly for hernia treatment (6–9), thoracic wall reconstruction, or silicon implant-based breast reconstruction (10). These biological meshes can be used without further processing (noncross-linked [non-CL] materials) or can be

doi:10.1111/aor.12224

Received May 2013; revised September 2013.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Ondrej Mestak, Bulovka Hospital, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Budinova 2, Prague 8, 180 00, Czech Republic. E-mail: Mestak@gmail.com

cross-linked (CL) to make them more stable. However, cross-linking decreases the biocompatibility of the material and the strength of incorporation into host tissues (9).

Cross-linking can also deteriorate potential penetration of cells, including stem cells, into the biomaterial. Stem cells are cells that have potential of differentiating into different cell lines. There are two basic types of stem cells—embryonic and adult stem cells. Adult stem cells play a crucial role in evolution and progress of regenerative medicine (11). They can be found in almost any tissue including skin, brain, or fat. By far, the most accessible and abundant tissue for stem cell harvesting is fat (12). In human, it can be harvested by liposuction, in small animals by excision, both with very low donor site morbidity. Autologous cells are body's own and, therefore, they do not evoke any reaction. Sufficient numbers of cells can be easily cultivated from a relatively small amount of fat.

Stem cells have angiogenic properties, probably entailed by secretion of cytokines (13). We therefore hypothesized that combining ECM with autologous mesenchymal stem cells (MSCs) from fat (adipose-derived stem cells [ADSCs]) used for hernia repair would result in increased vascularization and increased strength of incorporation compared with repairing hernia with acellular ECM. This would result in improved outcomes of clinical ventral hernia repairs in terms of infection and hernia recurrence.

So far, no study has evaluated the histological and mechanical properties of CL and non-CL ECM combined with ADSCs used for hernia repair. Both CL ECM and non-CL ECM are frequently used in surgery. As these materials differ in their ability of tissue ingrowth, we considered beneficial to comprise both of them in our study and compare the influence of MSCs on their properties.

The standard test to confirm multipotency is the ability of the cells to differentiate into osteoblasts and adipocytes (and chondrocytes as well as myocytes, and possibly neuron-like cells) (14).

MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague. All surgery was performed under anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

ECMs used

We used non-CL ECM (Medicem Technology, ••, Czech Republic) produced by harvesting split-thickness porcine skin grafts with thickness of about 0.8 mm. Then, the material underwent trypsinization (0.3%) for cell removal, was dehydrated by desiccation attached to a glass substrate, and sterilized by gamma-irradiation. We compared this non-CL ECM to commercially available CL ECM Permacol™ (Covidien, ••, Ireland). Permacol is one of the most widely used and well-studied surgical dermal scaffold materials (8,15,16). It is a porcine-derived acellular dermal scaffold manufactured by trypsinization (to remove all living cells), solvent extraction (to remove all lipid and fat deposits), gamma-irradiation, and cross-linking using hexamethylene diisocyanate.

Isolation and cultivation of MSCs

Female Wistar rats ($n = 12$) weighing 340–400 g were anesthetized with an intramuscular injection of 50 mg/kg body weight Zoletil (Virbac Laboratories, ••, France) 30 min before surgery. After shaving the inguinal area, incision was made, and a sample of fat around 1 cc was harvested. This sample was then transferred to our tissue engineering laboratory. The wound was sutured by interrupted sutures using Vicryl 3/0 (Ethicon Inc., ••, USA). Adipose tissue was cut into small pieces and incubated for 1–2 h in 0.1% collagenase A (Roche) at 37°C. The digested tissue was disrupted by shaking and repeated pipetting. An excess (ca 10-fold) of H-MEM medium with 10% of bovine serum was added, and the suspension was centrifuged at 500 g for 8 min. The resultant cell pellet was seeded into 25 cm² tissue culture flasks and cultured in the H-MEM medium enriched with nonessential amino acids, 0.12 g/L sodium pyruvate, 1 g/L NaHCO₃, 10% bovine serum, and 2% fetal bovine serum (MSCs growth medium) at 37°C in an incubator with 3.5% CO₂. The medium was changed every 2–4 days, and passages were carried out at 70–90% confluence. Cells from the second passage were used for seeding on ECM. MSCs (passage 2) were seeded in the amount of 3×10^5 cells/dish with ECM or without ECM control. The cell layer on the dish was confluent in 4 days. There was no difference between growth in the medium containing ECM and control (no cytotoxicity was observed). A small thin piece of each ECM group was stained by May-Grünwald and Giemsa-Romanovski to visualize the cells.

Identity control of MSCs

MSCs were cultured in the MSCs growth medium enriched with growth factors for adipocyte and

osteoblast differentiation (17). For adipocyte differentiation, dexamethasone (1 μ M), IBMX (0.5 μ M), insulin (10 μ g/mL), and indomethacin (60 μ M) were added into the medium. The cells were cultured for 5 days. MSCs in the third passage were cultured to subconfluence. The MSCs medium was then replaced by adipocyte medium (changed every 2–3 days). After 5 days, the culture was stained by oil red for histological assay. For osteoblast differentiation, dexamethasone (1 μ M), ascorbic acid (50 μ g/mL), and β -glycerophosphate (10 mM) were added. Cells were cultured for 2 weeks. MSCs in the third passage were cultured to confluence. The MSCs medium was then replaced by osteoblast medium (changed every 3–4 days). After 16 days, the culture was stained by alizarin red for calcium visualization.

Seeding of cultured MSCs onto ECM

Six pieces of non-CL-ECM and six pieces of CL-ECM measuring approx. 2 \times 3 cm were placed individually in 60 mm culture dishes and bathed overnight in the MSCs growth medium. MSCs (ADSC) were seeded next day in fresh medium in the amount of 3 \times 10⁵ cells/dish. The cells on ECM were cultured for four days. ECM with cells was used for the surgical procedure of hernia repair.

Surgical procedure

For hernia repair, the group of female Wistar rats used for fat harvesting (A; $n = 12$) and a control group of female Wistar rats (B; $n = 12$) were anesthetized with an intramuscular injection of 50 mg/kg body weight Zoletil (Virbac Laboratories) 30 min before surgery. After shaving the abdominal area and treating with antibiotic solution, an abdominal midline incision (5 cm) through the skin and subcu-

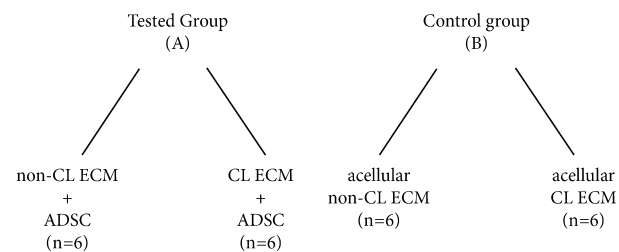


FIG. 1. Rats from the tested group (A) were randomly divided into two subgroups. The first subgroup ($n = 6$) received non-CL ECM seeded with MSCs for abdominal wall repair. The second subgroup ($n = 6$) received CL ECM seeded with MSCs for abdominal wall repair. Rats from the control group (B) were randomly divided into two subgroups as well. The first subgroup received non-MSCs-enriched CL ECM for abdominal wall repair ($n = 6$). The second subgroup received non-MSCs-enriched non-CL ECM for abdominal wall repair ($n = 6$).

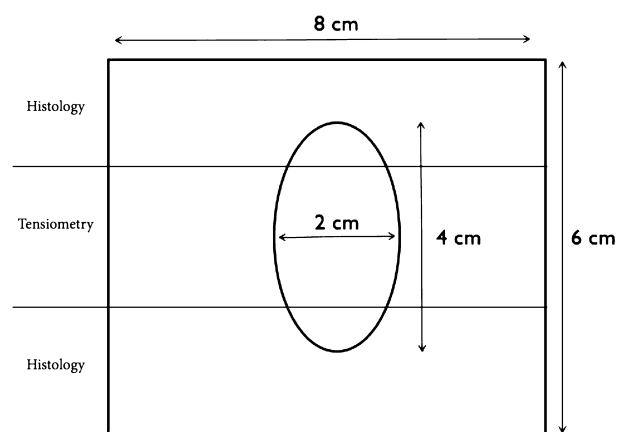


FIG. 2. A square block of abdominal wall measuring 8 \times 6 cm was excised en bloc and divided into three parts. The ventral and dorsal parts were processed for histological evaluation. The middle part of the excision (15-mm wide strip) was transported for tensile testing.

taneous tissue was made. Carinal shape full-thickness excision (4 \times 2 cm) of the abdominal wall was made. Materials were sutured to the edges of the abdominal wall defects as a patch using Prolene 4/0 (Ethicon Inc.) continuous suture. Rats from the tested group were randomly divided into two subgroups. The first subgroup ($n = 6$) received non-CL-ECM seeded with MSCs for abdominal wall repair. The second subgroup ($n = 6$) received CL ECM seeded with MSCs for abdominal wall repair. Rats from the control group were randomly divided into two subgroups as well. The first subgroup received acellular CL ECM for abdominal wall repair ($n = 6$). The second subgroup received acellular non-CL ECM for abdominal wall repair ($n = 6$) (Fig. 1). The wound was sutured by interrupted sutures using Vicryl 3/0 (Ethicon Inc.). Postoperative analgesic treatment was provided by intramuscular application of Butomidor (Richter Pharma, ••, Austria) 0.01 mg per rat. The postoperative course and observation period were without undesirable events.

All animals were sacrificed after 3 months by injection of ketamine 0.1 mL/100 g + medetomidine 0.01/100 g intramuscularly and T61 3 mL/100 g intracardially. The incidence of herniation was evaluated. A square block of abdominal wall measuring 8 \times 6 cm was excised en bloc and divided into three parts (Fig. 2). The ventral and dorsal parts were processed for histological evaluation. The middle part of the excision (15-mm wide strip) was transported in saline solution for tensile testing.

Histological examination

After explantation, tissue samples were fixed in formaldehyde and subjected to histological examina-

Cell/ reaction	Scoring				
	0	1	2	3	4
Implant cellularization	0	Rare, 1-5/phf	5-10/ phf	Heavy infiltrate	Packed
Leukocytes	0	Rare, 1-5/phf	5-10/ phf	Heavy infiltrate	Packed
Giant cells	0	Rare, 1-2/phf	3-5/ phf	Heavy infiltrate	Sheets

phf per high powered (400x) field
 Histopathological scoring system: cell type/response

Reaction	Scoring				
	0	1	2	3	4
Neovascularization	0	Minimal capillary proliferation, focal 1-3 buds	Group of 4-7 capillaries with supporting fibro-blastic structures	Broad band of capillaries with supporting structures	Extensive band of capillaries with supporting fibroblastic structures
Capsule thickness	0	Narrow band	Moderately thick band	Thick band	Extensive band

Histopathological scoring system : response

FIG. 3. Semiquantitative histopathological evaluation of each explant, as described in ISO 10993-6.

tion with hematoxylin-eosin staining using an Olympus BX50 microscope with 40, 100, and 200 × magnification. Semiquantitative histopathological evaluation of each explant was performed by the scoring system described in ISO 10993-6 (Fig. 3). The scores for microscopic evaluation of each parameter of each animal were added to obtain the sum for a group and divided by the number of animals in the group to obtain a test or reference group average. Samples were scored independently by two pathologists (KM and ZS).

Mechanical properties

The strength of incorporation was evaluated by Inspekt table 10 kN with 100 N load cell and Labmaster software (Hegewald & Peschke, ••, Germany). Preload 0.05 N and speed of crosshead travel 200 mm/min was set at the machine. The thickness of materials was evaluated by Mitutoyo ABSO-LUTE (Mitutoyo Inc., ••, Japan). Each specimen was oriented horizontally, with each end secured inside the grips. We evaluated the pull firmness and maximal breaking strength normalized for thickness, width and cross-section of the strip and place of specimen rupture (implant, implant-tissue conjunction, and tissue). The degree of strength of incorporation (SOI) was expressed by several values. Maximum load was recorded in newtons (N). Tensile stress per unit width was determined by dividing the maximum load sustained by the material by the width of the specimen (N/mm). Tensile strength needed for specimen rupture was recorded in megapascals (MPa). The

breaking strength was recorded as the maximum tension developed across the fascia-patch interface before rupture.

Statistical analysis

The data were analyzed statistically; quantitative data using Wilcoxon test; and categorical data using nonparametric Pearson chi-square test, Mann-Whitney test, and Fisher’s test.

RESULTS

Cell cultivation, differentiation and identity control

The surface coverage by cells was about 50% in both materials examined after staining by May-Grünwald and Giemsa-Romanovski to visualize the cells.

Adipocyte differentiation: an accumulation of lipid-rich vacuoles was observed within the cells (Fig. 4). Eventually, the lipid vacuoles combined and filled the cells.

Osteoblast differentiation: the MSCs formed aggregates or nodules, which were stained positively by alizarin red (Fig. 5).

Local findings after explantation

No seroma was found surrounding the materials. There were no hernias observed at the time of explantation in any group. There were no bowel adhesions in any group. We noticed only omentum adhesions to the peritoneal side of the material. The incidence of these adhesions was evenly distributed

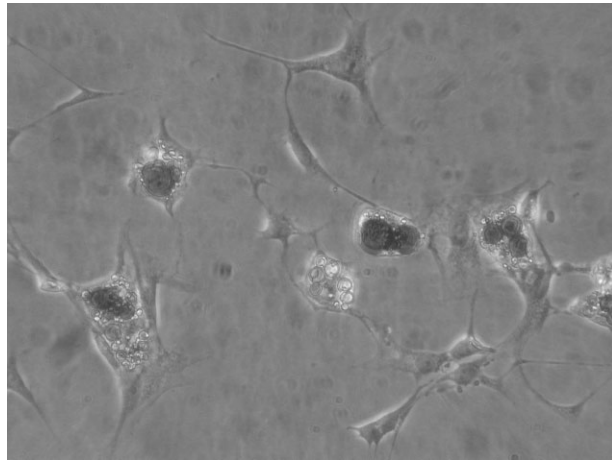


FIG. 4. MSCs were cultured in the adipocyte medium (MSCs medium with addition of dexamethasone, insulin, isobutyl methylxanthine, and indomethacin) for 10 days. The cells were stained by oil red. Accumulation of lipid (red) in vacuoles filling the cells is visible.

between both materials. All materials showed macroscopic evidence of early vascularization with blood vessels on both sides of the material. There were no signs of inflammation, fibrosis, calcification, or granulomatous reaction. Materials were stably ingrown in the subcutaneous tissues and abdominal wall. Non-CL ECM showed macroscopically significant degrading, looking like a thin, almost transparent membrane. CL ECM samples did not exhibit any macroscopic degradation throughout the entire study. Their appearance during the explantation was the same as at the time of implantation.

Histology

Both materials showed cellular ingrowth and neovascularization. Comparison of both tested groups with control groups did not show any significant differences in the capsule thickness, foreign body reaction, cellularization, or vascularization. Notably, the mean cellularization of 1.25 in the CL ECM non-MSCs-enriched subgroup was higher than 1.167 in the MSCs-enriched subgroup ($P = 0.375$). Vascularization in the CL ECM group was 1.75 in the non-MSCs-enriched subgroup and only 1.167 in the MSCs-enriched subgroup ($P = 0.375$). The mean capsule thickness in the CL ECM group was 0.33 in the non-MSCs-enriched subgroup and 1 in the MSCs-enriched subgroup ($P = 0.830$). Similarly as in the CL ECM group, the mean cellularization in non-CL ECM was higher in the non-MSCs-enriched subgroup (2) than in the MSCs-enriched subgroup (1.2, $P = 0.445$). Mean vascularization in the non-CL ECM group was 2 in the non-MSCs-enriched subgroup and

1.4 in the MSCs-enriched subgroup ($P = 0.542$). The mean capsule thickness in the non-CL ECM group was 0.8 in the non-MSCs-enriched subgroup and 1 in the MSCs-enriched subgroup ($P = 0.638$) (Fig. 6).

Tensiometry

The place of rupture was evenly distributed between the implant, implant-tissue conjunction, and tissue.

SOI of the MSCs-enriched CL ECM specimens was higher than that of the non-MSCs-enriched CL ECM, but this result was statistically nonsignificant (0.59 MPa vs. 0.7 MPa, $P = 0.66$) (Fig. 7A). In the non-CL ECM group, there was a statistically significant difference between non-MSCs-enriched ECM (0.75 MPa) and MSCs-enriched ECM (3.37 MPa; $P = 0.018$) (Fig. 7A). This result might indicate better ingrowth of cells into the less compact material.

DISCUSSION

Biological meshes are materials that possess excellent biocompatibility and an ability to incorporate into host tissues. They undergo vascularization, which increases their resistance to infection. Their biostability can be increased by cross-linking. However, attempts of biological mesh producers to improve firmness by cross-linking deteriorate the biocompatibility and strength of attachment of the mesh to the host tissues. The materials are too compact for vessels and other host tissues to grow inside them, resulting in a weaker connection between the material and host tissues, for example, abdominal wall, and lesser resistance to infection.

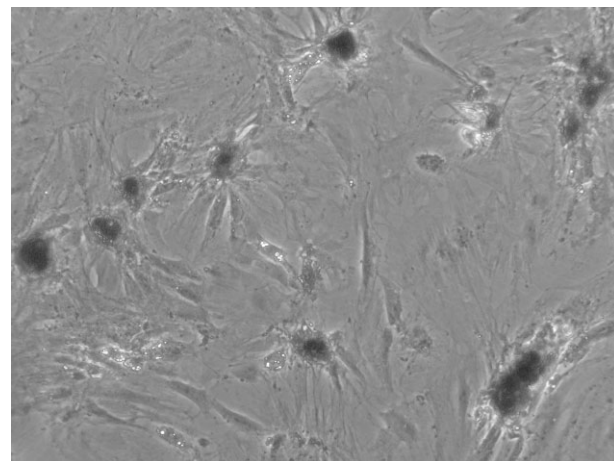


FIG. 5. MSCs were cultured in the osteoblast medium (MSCs medium with addition of dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate) for 16 days. The cell clusters were positive for calcium, as visible by staining with alizarin red.

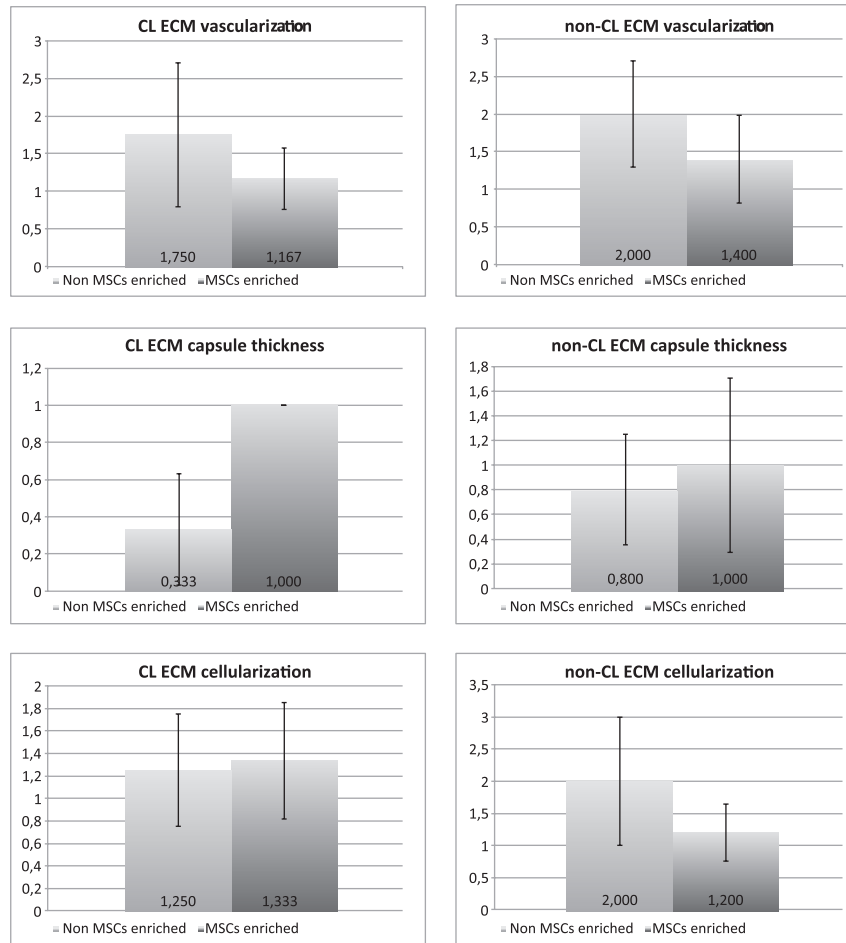


FIG. 6. Results of histological examination. Notably, mean cellularization of 1.25 in the cross-linked extracellular matrix (CL ECM) non-MSCs-enriched subgroup was higher than 1.167 in the MSCs-enriched subgroup ($P = 0.375$). Vascularization in the CL ECM group was 1.75 in the non-MSCs-enriched subgroup and only 1.167 in the MSCs-enriched subgroup ($P = 0.375$). The mean capsule thickness in the CL ECM group was 0.33 in the non-MSCs-enriched subgroup and 1 in the MSCs-enriched subgroup ($P = 0.830$). Similarly as in the CL ECM group, mean cellularization in noncross-linked extracellular matrix (non-CL ECM) was higher in the non-MSCs-enriched subgroup (2) than in the MSCs-enriched subgroup (1.2, $P = 0.445$). Mean vascularization in the non-CL ECM group was 2 in the non-MSCs-enriched subgroup and 1.4 in the MSCs-enriched subgroup ($P = 0.542$). The mean capsule thickness in the non-CL ECM group was 0.8 in the non-MSCs-enriched subgroup and 1 in the MSCs-enriched subgroup ($P = 0.638$).

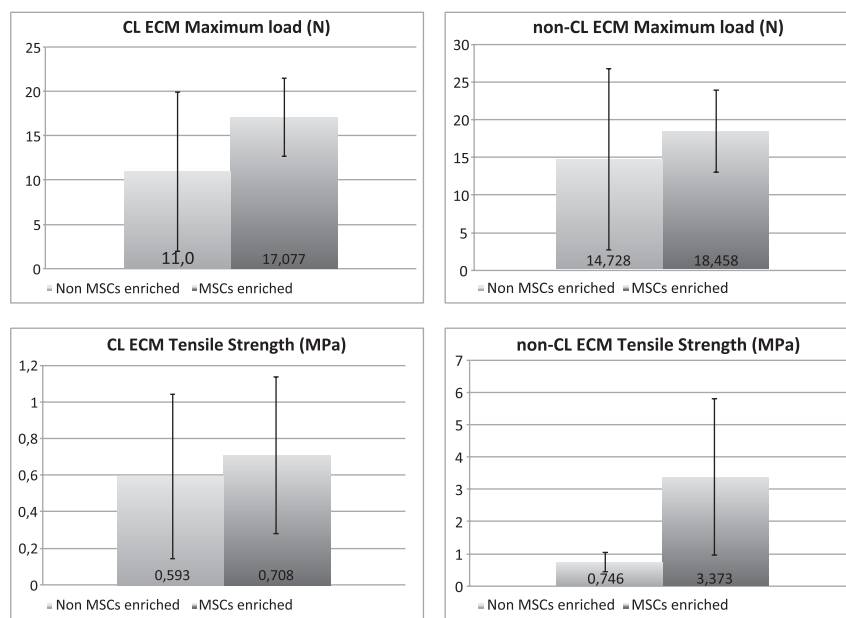


FIG. 7. Results of tensiometry. The strength of incorporation of the MSCs-enriched cross-linked extracellular matrix (CL ECM) specimens was higher than that of the non-MSCs-enriched CL ECM, but this result was statistically nonsignificant (0.59 MPa vs. 0.7 MPa, $P = 0.66$). In the noncross-linked extracellular matrix (non-CL ECM) group, there was a statistically significant difference between non-MSCs-enriched ECM (0.75 MPa) and MSCs-enriched ECM (3.37 MPa; $P = 0.018$).

Many experimental studies have been devoted to evaluation of the performance of ECMs for hernia repair. Primates (18), minipigs (19), or guinea pigs (9) have been used as animal models. However, by far, the most common animal for these tests is the rat, which has been used in most of the studies (16,20–24). The reason is that explants from this small animal model are sufficient for histological evaluation and tensiometry testing.

Our study was aimed to evaluate the outcomes of experimental hernia repair by CL ECM and non-CL ECM seeded with MSCs compared to acellular ECM either enriched or nonenriched with MSCs.

Similar studies have been presented in the literature. One study of a acellular dermal matrix seeded with autologous bone marrow-derived MSCs described its use for experimental hernia repair in the rabbit (25). Another study by Japanese authors evaluated resorption of acellular dermal matrix seeded with ADSCs implanted as subcutaneous implant (26).

Zhao et al. (25) and Orbay et al. (26) reported that simple ECM undergoes degradation after implantation, and seeding it with stem cells significantly increases vascularization and SOI. We did not find slower degradation or increased vascularization after seeding ECM with cells. In our opinion, cross-linking is the only approach available at present to decreasing degradation of biologic meshes (20,27–29). The use of bone marrow-derived MSCs for seeding ECM is questionable in clinical practice. However, adipose-derived MSCs are very easily harvestable, with minimum donor site morbidity. In addition, currently we have available instruments that are capable of isolating substantial numbers of ADSC during an operation (30).

The results of our study were different than anticipated in many aspects. Vascularization and cellularization in both CL ECM and non-CL ECM groups were lower in the acellular subgroup, but these results were not significant. This outcome can be entailed by the minimal impact of MSCs on ECM properties and also by the limited number of studied subjects. The only significant difference was the tensile strength in the non-CL ECM group. The SOI of the acellular subgroup was significantly lower than in the MSCs subgroup.

Contrary to the opinion of other authors (25,26), a tremendous number of studies have demonstrated an exceptional performance of ECM without seeded MSCs for hernia repair, especially in difficult cases (3,7,31).

Zhao et al. (25) described increased peritoneum regeneration in a group of MSCs-enriched ECMs.

This benefit might be helpful for decreasing bowel adhesions to the abdominal wall. In our opinion, isolation and seeding of cells on the mesh for hernia repair is a very complex procedure that cannot outweigh the possible clinical benefit.

CONCLUSION

Seeding of extracellular scaffolds with MSCs does not contribute significantly to increased vascularization in both CL ECM and non-CL ECM. In addition, in CL ECM, it does not ensure increased SOI. However, our findings showed significantly increased SOI in non-CL ECM. Owing to the fact that isolation and seeding of MSCs on ECM represents a very complex procedure, we do not see sufficient benefits for its use in the clinical setting.

Acknowledgment: This work was entirely supported by a research grant from the Ministry of Health of the Czech Republic, IGA MZ CR NT 11,392-6/2010.

Bohumir Prochazka, M.Sc., Ph.D., helped with statistical processing of the data.

Author contributions: Ondrej Mestak: concept/design, data analysis/interpretation, drafting the article, critical revision of article, and data collection.

Eva Matouskova: data collection and drafting the article.

Zuzana Spurkova: data collection.

Kamila Benkova: data collection.

Pavel Vesely: concept/design.

Jan Mestak: funding secured by and approval of article.

Martin Molitor: approval of article.

Andrej Sukop: approval of article and concept/design.

REFERENCES

1. Catena F, Ansaloni L, Gazzotti F, et al. Use of porcine dermal collagen graft (Permacol) for hernia repair in contaminated fields. *Hernia* 2007;11:57–60.
2. Mahmoud Uslu HY, Erkek AB, Cakmak A, et al. Incisional hernia treatment with polypropylene graft: results of 10 years. *Hernia* 2006;10:380–4.
3. Iannitti DA, Hope WW, Norton HJ, et al. Technique and outcomes of abdominal incisional hernia repair using a synthetic composite mesh: a report of 455 cases. *J Am Coll Surg* 2008; 206:83–8.
4. Voyles CR, Richardson JD, Bland KI, Tobin GR, Flint LM, Polk HCJ. Emergency abdominal wall reconstruction with polypropylene mesh: short-term benefits versus long-term complications. *Ann Surg* 1981;194:219–23.
5. Szczerba SR, Dumanian GA. Definitive surgical treatment of infected or exposed ventral hernia mesh. *Ann Surg* 2003;237: 437–41.

6. Parker DM, Armstrong PJ, Frizzi JD, North JHJ. Porcine dermal collagen (Permacol) for abdominal wall reconstruction. *Curr Surg* 2006;63:255–8.
7. Hiles M, Record Ritchie RD, Altizer AM. Are biologic grafts effective for hernia repair?: a systematic review of the literature. *Surg Innov* 2009;16:26–37.
8. Hsu PW, Salgado CJ, Kent K, et al. Evaluation of porcine dermal collagen (Permacol) used in abdominal wall reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009;62:1484–9.
9. Butler CE, Burns NK, Campbell KT, Mathur AB, Jaffari MV, Rios CN. Comparison of cross-linked and non-cross-linked porcine acellular dermal matrices for ventral hernia repair. *J Am Coll Surg* 2010;211:368–76.
10. Nahabedian MY. AlloDerm performance in the setting of prosthetic breast surgery, infection, and irradiation. *Plast Reconstr Surg* 2009;124:1743–53.
11. Behr B, Ko SH, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2010;126:1163–71.
12. Strem BM, Hedrick MH. The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol* 2005;23:64–6.
13. Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, et al. Human adipose-derived stem cells: potential clinical applications in surgery. *Surg Today* 2011;41:18–23.
14. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7.
15. Macleod TM, Williams G, Sanders R, Green CJ. Histological evaluation of Permacol as a subcutaneous implant over a 20-week period in the rat model. *Br J Plast Surg* 2005;58:518–32.
16. Ayubi FS, Armstrong PJ, Mattia MS, Parker DM. Abdominal wall hernia repair: a comparison of Permacol and Surgisis grafts in a rat hernia model. *Hernia* 2008;12:373–8.
17. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–95.
18. Sandor M, Xu H, Connor J, et al. Host response to implanted porcine-derived biologic materials in a primate model of abdominal wall repair. *Tissue Eng Part A* 2008;14:2021–31.
19. Melman L, Jenkins ED, Hamilton NA, et al. Early biocompatibility of crosslinked and non-crosslinked biologic meshes in a porcine model of ventral hernia repair. *Hernia* 2011;15:157–64.
20. de Castro Bras LE, Shurey S, Sibbons PD. Evaluation of cross-linked and non-crosslinked biologic prostheses for abdominal hernia repair. *Hernia* 2012;16:77–89.
21. Rice RD, Ayubi FS, Shaub ZJ, Parker DM, Armstrong PJ, Tsai JW. Comparison of Surgisis, AlloDerm, and Vicryl Woven Mesh grafts for abdominal wall defect repair in an animal model. *Aesthetic Plast Surg*, [Internet] 2009;34:290–6. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00266-009-9449-2>. Accessed ••
22. Keller JE, Dolce CJ, Walters KC, et al. Effect of bacterial exposure on acellular human dermis in a rat ventral hernia model. *J Surg Res* 2010;162:148–52.
23. Mulier KE, Nguyen AH, Delaney JP, Marquez S. Comparison of Permacol and Strattice for the repair of abdominal wall defects. *Hernia* 2011;15:315–9.
24. Petter-Puchner AH, Fortelny RH, Walder N, et al. Adverse effects associated with the use of porcine cross-linked collagen implants in an experimental model of incisional hernia repair. *J Surg Res* 2008;145:105–10.
25. Zhao Y, Zhang Z, Wang J, et al. Abdominal hernia repair with a decellularized dermal scaffold seeded with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 2011;36:247–55.
26. Orbay H, Takami Y, Hyakusoku H, Mizuno H. Acellular dermal matrix seeded with adipose-derived stem cells as a subcutaneous implant. *Aesthetic Plast Surg* 2011;35:756–63.
27. de Castro Bras LE, Proffitt JL, Bloor S, Sibbons PD. Effect of crosslinking on the performance of a collagen-derived biomaterial as an implant for soft tissue repair: a rodent model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;95:239–49.
28. Oliver RF, Grant RA, Cox RW, Cooke A. Effect of aldehyde cross-linking on human dermal collagen implants in the rat. *Br J Exp Pathol* 1980;61:544–9.
29. Oliver RF, Barker H, Cooke A, Stephen L. 3H-collagen turnover in non-cross-linked and aldehyde-cross-linked dermal collagen grafts. *Br J Exp Pathol* 1982;63:13–7.
30. Lin K, Matsubara Y, Masuda Y, et al. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the celution system. *Cytotherapy* 2008;10:417–26.
31. Butler CE. The role of bioprosthesis in abdominal wall reconstruction. *Clin Plast Surg* 2006;33:199–211, v–vi.

Research Article

Human Keratinocyte Growth and Differentiation on Acellular Porcine Dermal Matrix in Relation to Wound Healing Potential

Robert Zajicek,¹ Vaclav Mandys,² Ondrej Mestak,³ Jan Sevcik,¹ Radana Königova,¹
and Eva Matouskova⁴

¹Prague Burn Centre, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, 100 00 Prague 10, Czech Republic

²Department of Pathology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, 100 00 Prague 10, Czech Republic

³Department of Plastic Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, 100 00 Prague 10, Czech Republic

⁴Prague Burn Centre, University Hospital Kralovske Vinohrady, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruska 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Eva Matouskova, eva.matou@seznam.cz

Received 19 November 2011; Accepted 19 December 2011

Academic Editors: A. Cömert and Y. Tabata

Copyright © 2012 Robert Zajicek et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A number of implantable biomaterials derived from animal tissues are now used in modern surgery. Xe-Derma is a dry, sterile, acellular porcine dermis. It has a remarkable healing effect on burns and other wounds. Our hypothesis was that the natural biological structure of Xe-Derma plays an important role in keratinocyte proliferation and formation of epidermal architecture *in vitro* as well as *in vivo*. The bioactivity of Xe-Derma was studied by a cell culture assay. We analyzed growth and differentiation of human keratinocytes cultured *in vitro* on Xe-Derma, and we compared the results with formation of neoepidermis in the deep dermal wounds treated with Xe-Derma. Keratinocytes cultured on Xe-Derma submerged in the culture medium achieved confluence in 7–10 days. After lifting the cultures to the air-liquid interface, the keratinocytes were stratified and differentiated within one week, forming an epidermis with basal, spinous, granular, and stratum corneum layers. Immunohistochemical detection of high-molecular weight cytokeratins (HMW CKs), CD29, p63, and involucrin confirmed the similarity of organization and differentiation of the cultured epidermal cells to the normal epidermis. The results suggest that the firm natural structure of Xe-Derma stimulates proliferation and differentiation of human primary keratinocytes and by this way improves wound healing.

1. Introduction

A number of implantable biomaterials derived from human and animal tissues—such as acellular matrices derived from the human dermis (Alloderm), porcine dermis (Strattice, Permacol), porcine small intestine submucosa (Surgisis), or bovine pericardium (Veritas)—are used in modern surgery. These biomaterials are reasonably biocompatible and stable enough for long-term tissue replacements. They are used, for instance, in the field of reconstructive surgery for hernia repair [1, 2], soft tissue augmentation, breast reconstruction [3], and wound treatment [4, 5]. These biomaterials consist primarily of collagen structures and glycoproteins that maintain the structure of the original intercellular tissue to a greater or lesser extent.

Recently, a new type of acellular biomaterial was developed in the Czech Republic under the name of Xe-Derma (manufactured by MEDICEM Institute Ltd.). This anisotropic acellular biomaterial is a result of the research and development of recombinant skin using xenodermis and cultured keratinocytes at the Prague Burn Centre [6–9]. However, the regulations controlling the use of cultured cells in clinical practice are becoming increasingly complex. Our goal, then, was to develop an acellular dermis that would maximally support the growth of patient's own keratinocytes from the adnexa remnants in the wound by providing optimal conditions for their attachment, proliferation, and migration.

Xe-Derma (XD) is a dry, sterile, commercially available acellular porcine dermis (Figure 1). Hydrated XD displays biomechanical properties similar to those of human skin. In



FIGURE 1: Acellular porcine dermis Xe-Derma. Hydrated XD has properties similar to those of normal human skin.

the clinical study, we have shown that XD has significantly higher efficacy in partial thickness burns in children than hydrocolloid dressing (larger area is healed in comparable time), and no exchange of the cover is needed until complete healing [10]. XD spontaneously adheres to the wound and immediately prevents bleeding. After the wound becomes epithelized, the dry xenodermis peels off, usually within 4–14 days [10, 11]. In comparison with the silver sulphadiazine cream Flammazine (Solvay Pharmaceuticals B.V., The Netherlands), the gold standard for the treatment of deep dermal burns, XD induces rapid healing with superior cosmetic results (Figure 2). Since 2007, we have successfully used XD in the treatment of burns [10], leg ulcers, diabetic feet, dermabrasions and donor sites for skin grafts [11].

The aim of the current study was to gain more insight into the biological mechanism of XD-mediated wound healing. The bioactivity of XD has been demonstrated in a cell culture assay. Keratinocyte growth and differentiation *in vitro* on XD and *in vivo* under XD was analyzed by histology and immunocytochemistry. Our hypothesis was that the natural biological structure of the dermis plays an important role in proliferation and differentiation of the patient's own keratinocytes.

2. Material and Methods

We analyzed growth and differentiation of primary human keratinocytes cultured *in vitro* on XD. We then compared the results with differentiation of neopidermis in a freshly healing wound treated with XD. Proliferation and differentiation of skin cells *in vitro* and in the deep dermal burn wound covered with XD was compared using routine histological and immunohistological methods.

2.1. Tensile Strength of XD. Tensile testing on bone-shaped samples was conducted on the testing engine INSPEKT desk 10 kN (Hegewald & Peschke) equipped with programme Labmaster. Samples were hydrated overnight in PBS and

pulled to failure at 100 mm/min using a mechanical stand with a 100 N load cell. In total, 40 samples of XD were measured.

2.2. Keratinocyte Cultivation on XD. Human primary keratinocytes (2nd passage) were obtained from redundant skin of donors undergoing abdominoplasty. Keratinocytes were cultured on XD using the 3T3 feeder layer technique [6, 12]. Prior to seeding the cells, XD in the tissue culture dish was immersed in a standard culture medium (HMEM with non-essential amino acids, 0.12 g/L sodium pyruvate, 1 g/L NaHCO₃, and 10% bovine serum) overnight at 37°C. Lethally irradiated NIH-3T3 cells were used as feeder cells and were seeded on the dish with XD at a concentration of 3×10^4 cells/cm² in a standard culture medium. On the following day, the keratinocytes were seeded at a concentration of 5×10^4 cells/cm² in a standard culture medium enriched with 2% fetal bovine serum, hydrocortisone (0.5 ug/mL), insulin (0.12 U/mL), cholera toxin (10^{-10} M), and EGF (5 ng/mL). The cultures were grown in a humidified 3.5% CO₂ atmosphere. The progress of cell growth on XD was followed on the noncovered areas of the dish or on specimens stained by May-Grünwald and Giemsa-Romanowski.

After achieving confluence, XD, along with 1-2 keratinocyte layers, was cut into pieces of approximately 1 cm² and lifted to the air-liquid interface on a stainless steel grid covered with two layers of sterile gauze. The “skin” was cultured at the air-liquid interface for one week.

2.3. Keratinocyte Cultivation on Biopad. In an *in vitro* control sample, keratinocytes were cultured on the equine collagen Biopad, a sponge-shaped lyophilized equine collagen type I, using the same methodology as the keratinocyte cultivation on XD.

2.4. Treatment of Burns with XD. In deep dermal burns (classified as mixed burns of degrees 2b and 3), the necrotic tissue was surgically removed, and XD was used to cover the area after necrectomy to prepare the wound for skin grafting. XD was hydrated for 1–3 min in saline and applied to the wound. The dressing was covered with one layer of tulle gras and with plain gauze wetted with 3% boric acid. As a control, part of the wound was covered by tulle gras Grassolind and plain gauze with 3% boric acid only. Biopsies of three patients were taken in the course of one week after XD application.

2.5. Histology. Specimens of XD with *in vitro* cultured keratinocytes and samples from three deep dermal wounds after necrectomy covered with XD (without cultured keratinocytes) or Grassolind were fixed in 10% buffered formaldehyde and processed by the routine histological technique. Five-micron-thick paraffin sections were mounted on glass histological slides and stained with hematoxylin and eosin, using the van Gieson/orcein method or used for immunohistochemical staining.

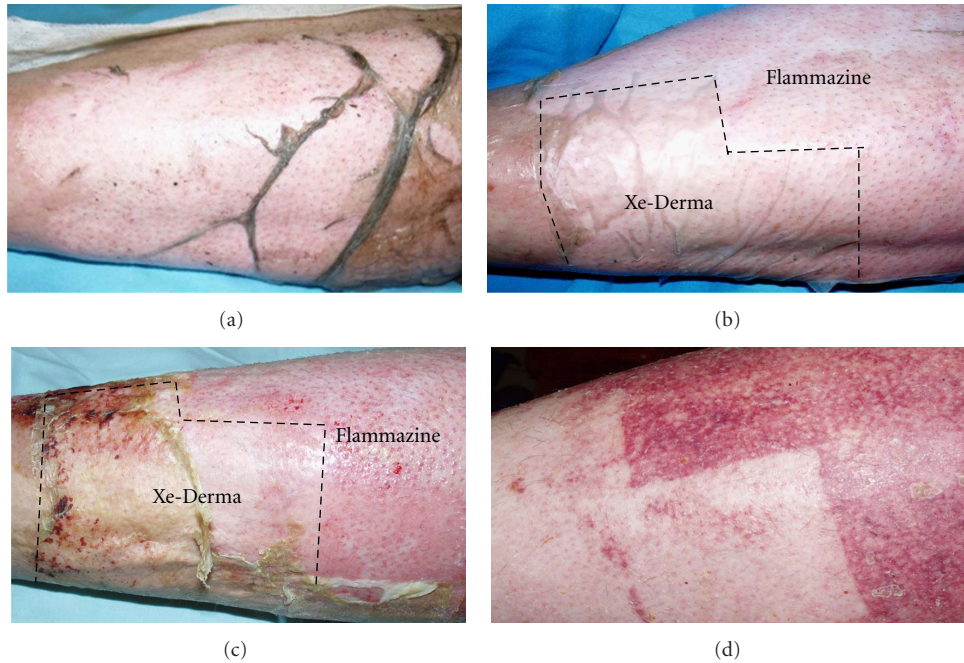


FIGURE 2: The effect of XD compared to antibacterial cream Flammazine in a patient burned by acetone steam (deep dermal burn). An example of XD healing effect. (a) Day 1: the burn wound on the leg at the initiation of treatment. (b) XD was applied to the distal part of the leg, and the proximal part was covered with silver sulphadiazine (Flammazine). (c) Day 9: the area under XD healed, while the area under Flammazine did not heal until day 18. The XD dressing was not changed during the treatment, while the Flammazine dressing was changed every second day. (d) Day 20: detail of the healed area. The esthetic result and the speed of healing under XD are notable.

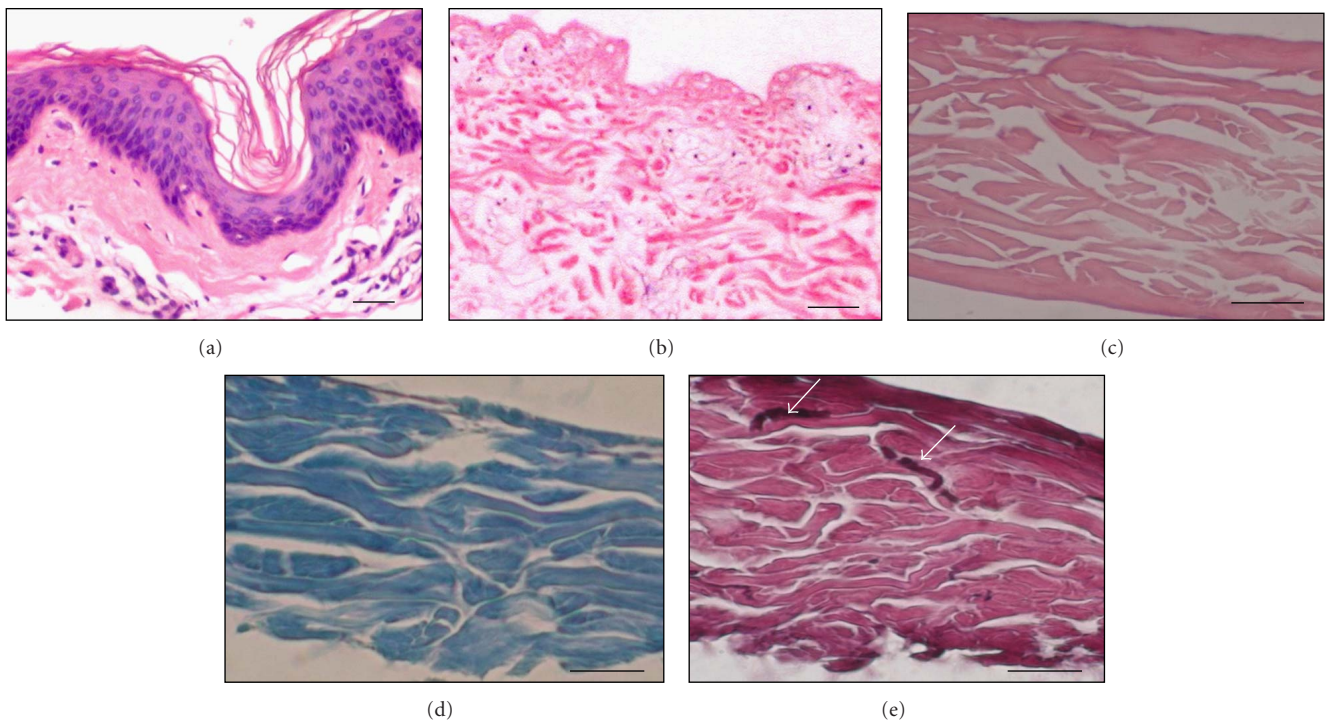


FIGURE 3: Structure of XD. Histological sections of (a) porcine skin, (b) acellular xenodermis immediately after removal of epidermis and other cells, (c) XD (hematoxylin and eosin), (d) XD stained with trichrome shows the majority of collagen fibres (blue), (e) XD stained with Gieson/orcein stain shows fragments of elastic fibres (arrows). Bar—30 μ m.

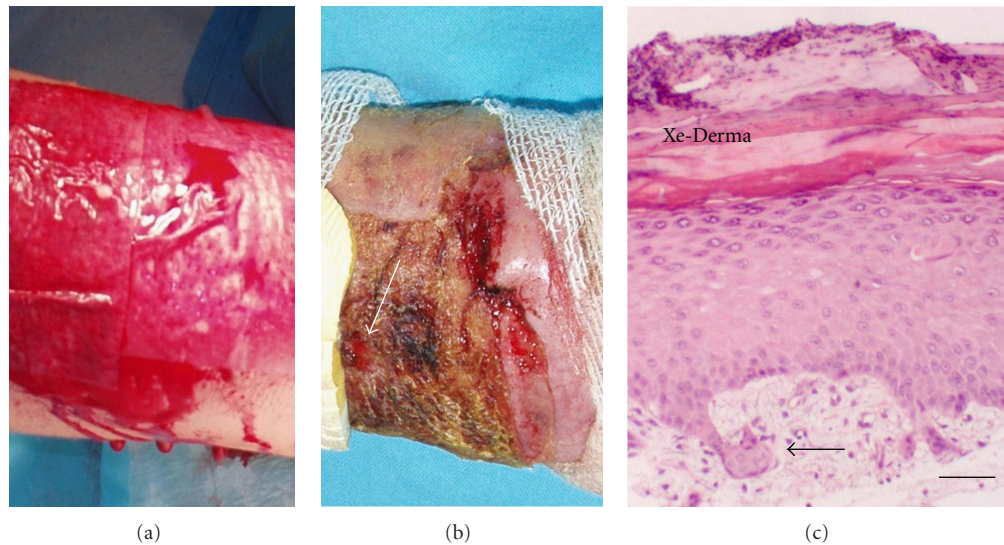


FIGURE 4: Xe-Derma used to cover areas after necrectomy to prepare the wound for autografting. (a) Temporary cover of an area after necrectomy originally evaluated as 3rd degree burn. XD was adhered immediately and stopped bleeding instantly. (b) XD incrusted by fibrin absorption (arrow—the point of biopsy on day 8). (c) Histology taken on day 8 showed fully differentiated epidermis without or with low development of rete ridges (arrow). Bar—50 μm .

TABLE 1: Keratinocyte differentiation *in vitro* and *in vivo*.

Antibody to	Reaction with keratinocytes on XD	Figure no.	Reaction with freshly healing skin epithelia	Figure no.
HMW CK	All keratinocytes	Figure 6(a)/(A2)	All keratinocytes	Figure 6(a)/(A3)
Involucrin	Granular and horny layer	Figure 6(b)/(B2)	Granular and horny layer	Figure 6(b)/(B3)
p63	Basal and suprabasal keratinocytes, adnexa remnants	Figure 6(c)/(C2)	Basal keratinocytes and islands inside the XD matrix	Figure 6(c)/(C3)
CD29	Basal cells, adnexa remnants	Figure 6(d)/(D2)	Basal cells and islands inside the XD matrix	Figure 6(d)/(D3)

Immunocytochemical markers of keratinocyte differentiation of keratinocytes cultured on XD eight days after lifting to the air-medium interface and in the freshly healing deep dermal wound eight days after treatment with XD.

2.6. *Immunohistochemical Staining.* The standard immunohistochemical technique was performed using antibodies for the detection of high-molecular-weight cytokeratins (HMW CKs, clone 34 β E12, Dako, Denmark), nuclear antigen p63 (Ab-1, clone 4A4, NeoMarkers, Fremont, CA, USA), CD29 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), and involucrin (Novocastra, UK). N-Histofine immunohistochemical staining reagent (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) and 3-3'-diaminobenzidine as a chromogen were used to visualize the immunohistological reaction.

3. Results

3.1. *Biomechanical Properties and Structure of XD.* XD was prepared from xenografts as dry acellular porcine dermis (Figure 1). After rehydration, the biomechanical features of XD (elasticity, adherence, and haemostatic effect) resemble those of normal human skin. Thickness of hydrated XD was 0.25–0.35 mm. Tensile strength was between 6.6 ± 1.2 MPa.

Histological slides stained with hematoxylin and eosin and by van Gieson/orcein method showed that XD is a 3D matrix formed of a natural biological network of collagen fibres and fragments of elastic fibres (Figure 3).

3.2. *Histological Examinations In Vivo and In Vitro.* *In vivo:* in wounds treated with XD, histological studies one week after application revealed neoepidermis without or with low development of rete ridges. XD remained attached to the wound (Figure 4). In wounds treated with Grassolind, no epidermis was formed.

In vitro: keratinocytes that were grown submerged in the medium formed 1-2 cell layers on the XD matrix (Figures 5(a) and 5(c)). After the cultures were lifted to the air-liquid interface, the epidermis became stratified and formed 5–15 cell layers in the course of one week (Figures 5(b) and 5(d)). The multilayered structure closely resembled well-differentiated epidermis *in vivo* composed of distinct basal, spinous, granular, and cornified layers (Figure 5).

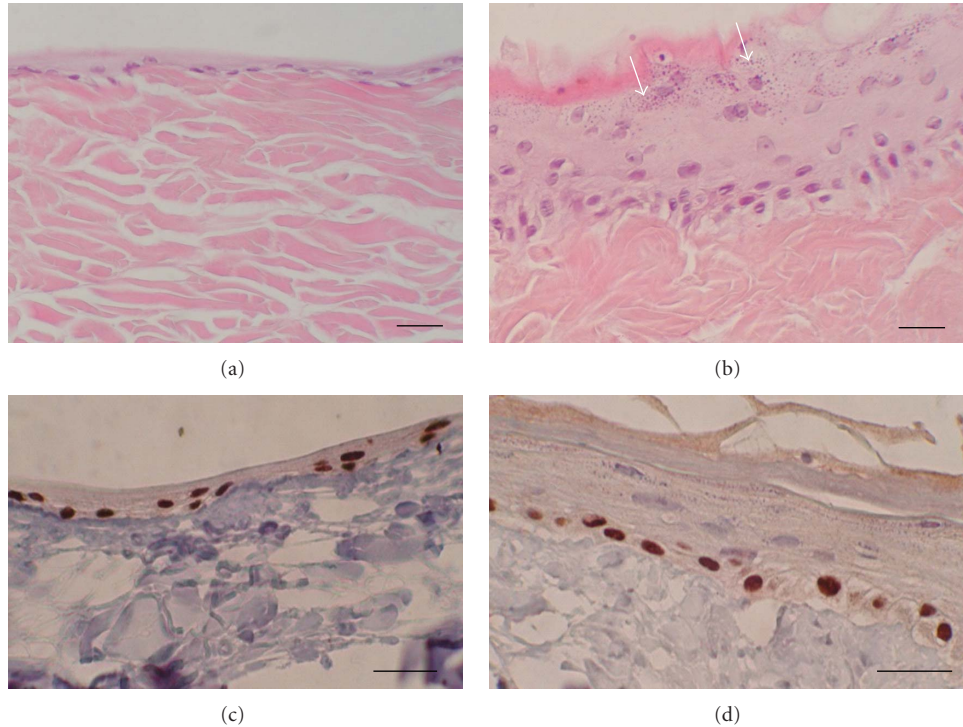


FIGURE 5: Keratinocytes cultured and differentiated on XD. (a) Keratinocytes grown submerged formed 1-2 layers on XD. (b) Keratinocytes grown at the air-liquid interface formed the basal, spinous, and granular layers. Keratohyalin granules (arrows) in the granular layer are notable. (c) Keratinocytes grown submerged stained immunocytochemically for p63 (nuclear protein p63 is expressed in basal cells). (d) Keratinocytes grown at the air-liquid interface stained for p63. Bars—30 μ m.

3.3. *Expression and Distribution of Keratinocyte Differentiation Markers.* Paraffin sections of the normal skin, recombined skin (keratinocytes cultured on XD at the air-liquid interface), and of the wounds treated with XD or Grassolind were analyzed using a panel of antibodies detecting selected markers of keratinocyte differentiation. The reactivity of the antibodies in the cultured keratinocytes and in the freshly healing skin is shown in Table 1. Immunohistochemical staining of HMW CK, involucrin, p63, and CD29 of keratinocytes cultured on XD confirmed the organization and differentiation of keratinocytes similar to that of normal epidermis (Figure 6). HMW CK was strongly expressed in all keratinocytes cultured on XD (Figure 6(a)/(A2)). Involucrin was expressed in the granular and horny layers (Figure 6(b)/(B2)). CD29 was positive in the basal layer of keratinocytes (Figure 6(d)/(D2)). A similar differentiation pattern was observed in the newly formed epidermis after treatment with XD (Figure 6(a)/(A3), Figure 6(b)/(B3), Figure 6(d)/(D3)). The wound treated with Grassolind did not epithelize, although adnexa remnants or individual keratinocytes were identified in the biopsies (Figure 6(a)/(A4), Figure 6(c)/(C4)).

The nuclear protein p63 was expressed *in vitro* in all keratinocytes of the submerged cultures and in the basal layer of the cultures grown at the air-liquid interface (Figure 6(c)/(C2)). *In vivo*, p63 was expressed not only in the basal layer but also in a subpopulation of suprabasal cells (Figure 6(c)/(C3)). Keratinocytes *in vitro* occasionally

migrated into the XD matrix and formed solid nests or islands (Figure 6(c)/(C2), Figure 6(d)/(D2)) resembling gland-like structures (Figure 6(c)/(C3), Figure 6(d)/(D3)).

3.4. *Keratinocyte Growth on Biopad.* In the control sample, human keratinocytes were simultaneously cultured on Biopad. After two weeks of cultivation (one week submerged and one week at the air-liquid interface), the cells showed chaotic distribution. They migrated into the Biopad structure composed of fragile collagen fibers. Within the inner structure of this collagen, the cells were terminally differentiated, as shown by staining for involucrin (Figure 7).

4. Discussion

Xenografts have been used in the Prague Burn Centre since 1973 [13] for treatment of burns and other acute and chronic skin defects [11]. After 32 years of extensive use, the utilization of porcine xenografts was discontinued due to the regulations of the European Union. Since then, various synthetic materials have been used as temporary covers, but they are not comparable to xenografts because they do not display a similar level of biological activity.

Cell-free pig dermis was initially developed in our laboratory as a substrate for the cultivation of human keratinocytes [6]. The previously constructed recombined human/pig skin was used as a delivery system for the keratinocytes applied to accelerate the healing process [7–9].

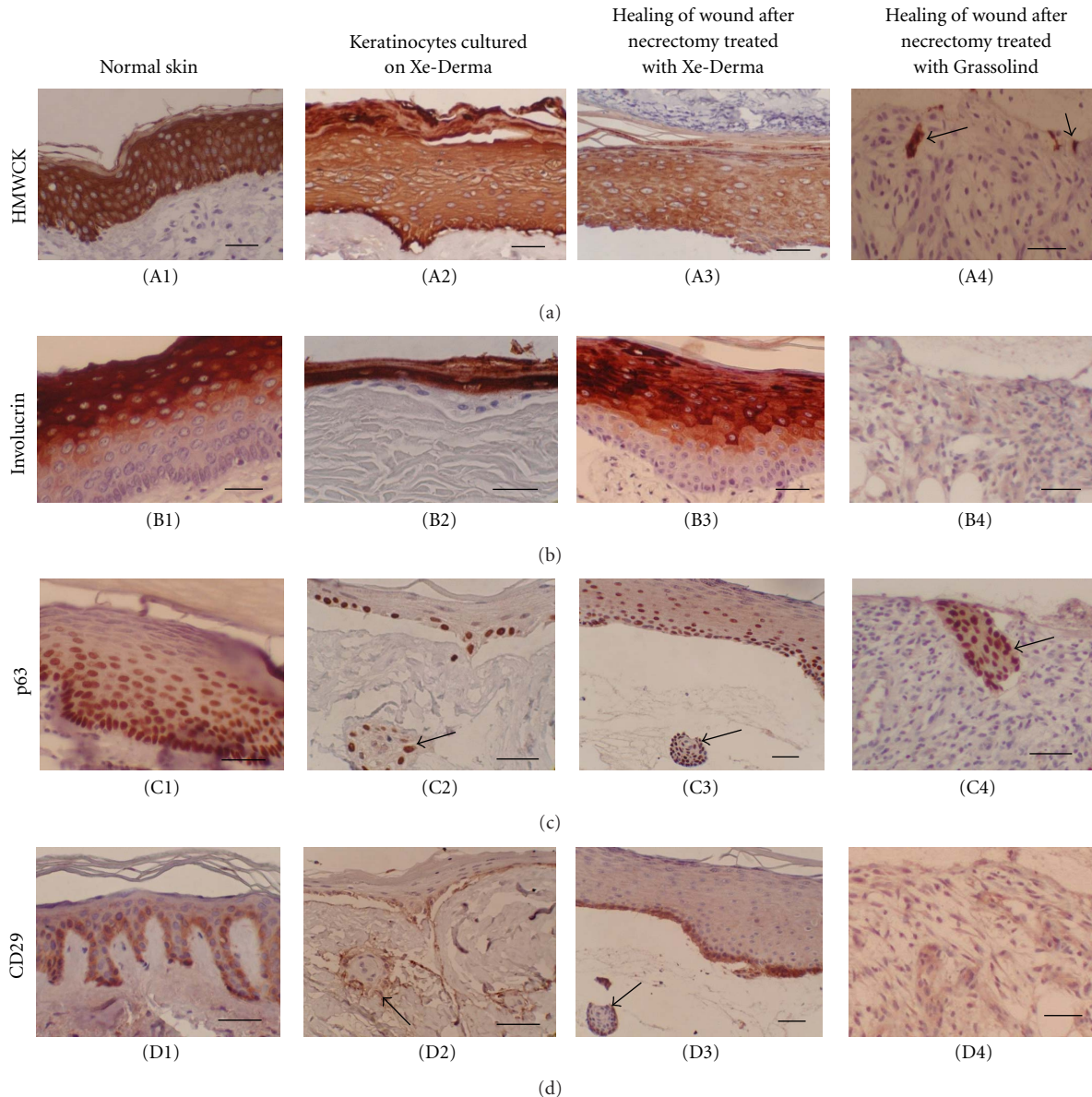


FIGURE 6: Expression of differentiation markers of the keratinocytes cultured on XD at the air-liquid interface (A2, B2, C2, D2) compared to the normal skin (A1, B1, C1, D1), to freshly healing wound after necrectomy treated with XD (A3, B3, C3, D3), and to freshly healing wound after necrectomy treated with Grassolind (A4, B4, C4, D4). The wounds after necrectomy were covered with XD (column 3) or tulle gras Grassolind (column 4). On day 8 after treatment, biopsies were taken. The expression of differentiation markers HMW CK (a), involucrin (b), p63 (c), and CD29 (d) was compared in the normal skin (column 1), in keratinocytes cultured on XD (column 2), in the wound treated with XD (column 3), and in the wound treated with Grassolind as a control (column 4). The figures show that keratinocyte growth, and differentiation *in vitro* on XD (column 2) and *in vivo* epithelization under XD (column 3) is similar and that the wound covered with XD formed epidermis within one week (column 3), while the wound covered with Grassolind did not epithelize (column 4), although remnants of keratinocytes (A4) or adnexa remnants (C4) are visible in the dermis (arrows). Note that cells migrated into the XD matrix formed islands resembling primitive gland-like structures (C2, D2—arrows); they are p63⁻ in the centre and p63⁺ at the outer margin of the colony (compare to gland remnants in C3 and D3—arrows). Bars—50 μ m.

However, dried xenodermis itself without keratinocytes has shown excellent healing properties.

The bioactivity of decellularized dermis materials can be demonstrated by a cell culture assay [14]. More detailed information on the cell behavior should contribute to the elucidation of the healing mechanism of the skin

substitute. Our study has shown that XD, similarly as its laboratory predecessor cell-free pig dermis [6], is an appropriate substrate for keratinocyte attachment, growth, and differentiation. Morphological differentiation of keratinocytes has been achieved in organotypic culture systems grown at the air-liquid interface on various dermal-like

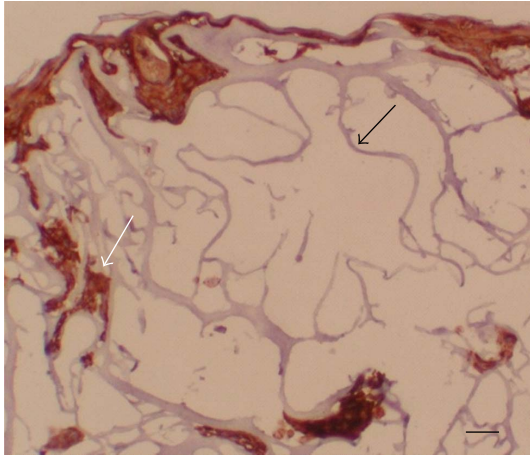


FIGURE 7: Keratinocytes cultured on Biopad (equine collagen). Note the fragile collagen fibers (black arrow) and the chaotic distribution of the irregular groups of keratinocytes. Immunohistological detection of involucrin shows terminally differentiated keratinocytes in the inner structure of Biopad (white arrow). Bar—30 μ m.

substrates [15–17]. The cultured human keratinocyte/Xe-Derma organotypic skin model was studied using the criteria of tissue morphology and the presence and distribution of selected keratinocyte differentiation markers. The results were compared to the healing of deep dermal wounds after necrectomy covered with the XD dressing. The morphology of the keratinocyte-derived epidermis cultured *in vitro* at the air-liquid interface was very similar to the neoepidermis formed *in vivo* in the deep dermal burn from the remnants of keratinocytes in the residual skin adnexa. The expression and distribution of the markers HMW CK, CD29, and involucrin in keratinocytes cultured *in vitro* at the air-liquid interface corresponded to those expressed in the epidermis *in vivo*. The p63 nuclear antigen was expressed in the *in vitro* cultured epidermis in the basal layer only. In the neoepidermis developed *in vivo*, the p63 nuclear antigen was expressed in basal cells and in a fraction of suprabasal cells. Protein p63 is a marker of progenitor and transit-amplifying cells that are essential for the proliferative potential in the stratified epithelia [18–20]. This protein plays an important role in keratinocyte differentiation [20].

Cells usually do not grow on skin covers. Exceptions are biological covers including collagens; however, the attachment and cell proliferation depend on the particular structure, purity, type of storing, type of sterilization, and so forth. Differentiation of keratinocytes takes place only on materials similar to the normal dermis, usually in the presence of mesenchymal cells. We have tested several types of synthetic wound covers (e.g., Grassolind, Viacell, AskinaThinSite, Inadine, etc.) with negative results for cell growth. Limited cell growth was achieved on adhesive dressing Suprathel. Biopad was selected as comparative material for keratinocyte cultivation as it represents sponge-shaped (3D structured) pure collagen.

The fact that keratinocytes cultured on XD organized themselves in a manner similar to that of normal skin, while

those cultured on the equine collagen Biopad grew in a disorderly fashion, supports our assumption that the natural biological structure of the dermis plays an important role in formation of the epidermal architecture. Signals from the underlying mesoderm seem to be required to trigger the discrete functions of p63 and other proteins in the ectoderm that play a key role in keratinocyte commitment, differentiation, and regeneration [20].

Our results are in accordance with the results of Feng et al. [21] documenting that porcine acellular dermal matrix used to cover deep second-degree burns preserves residual dermal tissue and epithelium and helps to accelerate the regeneration of epithelial and stem cells, thus shortening the healing time, remodeling skin structure, and consequently preventing hypertrophic scars at inception. One shot therapy without dressing exchange avoids secondary injury to the wound [21].

5. Conclusion

The firm natural structure of XD stimulates proliferation and differentiation of human primary keratinocytes. The keratinocytes cultured on XD organized themselves in a manner similar to that of normal skin, while those cultured on the equine collagen Biopad grew in a disorderly fashion. These results support our assumption that the natural biological structure of the dermis plays an important role in wound epithelization and formation of the epidermal architecture. The healing effects of XD result from the support of proliferation, migration, and differentiation of the patient's keratinocytes.

Abbreviations

XD: Xe-Derma
 HMEM: Minimum essential medium in Hanks' salts
 HMW CK: High-molecular-weight cytokeratins.

Disclosure

E. Matouskova is an associated scientist of MEDICEM Institute. The rest of authors have nothing to disclose.

Acknowledgment

This work was supported by Grant no. NS 10507-3 of the Ministry of Health of the Czech Republic.

References

- [1] M. Hiles, R. D. Record Ritchie, and A. M. Altizer, "Are biologic grafts effective for hernia repair? A systematic review of the literature," *Surgical Innovation*, vol. 16, no. 1, pp. 26–37, 2009.
- [2] D. M. Parker, P. J. Armstrong, J. D. Frizzi, and J. H. North Jr., "Porcine dermal collagen (Permacol) for abdominal wall reconstruction," *Current Surgery*, vol. 63, no. 4, pp. 255–258, 2006.
- [3] M. Y. Nahabedian, "AlloDerm performance in the setting of prosthetic breast surgery, infection, and irradiation," *Plastic*

- and *Reconstructive Surgery*, vol. 124, no. 6, pp. 1743–1753, 2009.
- [4] B. S. Atiyeh, S. N. Hayek, and S. W. Gunn, “New technologies for burn wound closure and healing—review of the literature,” *Burns*, vol. 31, no. 8, pp. 944–956, 2005.
- [5] I. Jones, L. Currie, and R. Martin, “A guide to biological skin substitutes,” *British Journal of Plastic Surgery*, vol. 55, no. 3, pp. 185–193, 2002.
- [6] E. Matouskova, D. Vogtova, and R. Königova, “A recombined skin composed of human keratinocytes cultured on cell-free pig dermis,” *Burns*, vol. 19, no. 2, pp. 118–123, 1993.
- [7] E. Matouskova, S. Bucek, D. Vogtova et al., “Treatment of burns and donor sites with human allogeneic keratinocytes grown on acellular pig dermis,” *British Journal of Dermatology*, vol. 136, no. 6, pp. 901–907, 1997.
- [8] E. Matouskova, L. Broz, E. Pokorna, and R. Königova, “Prevention of burn wound conversion by allogeneic keratinocytes cultured on acellular xenodermis,” *Cell and Tissue Banking*, vol. 3, no. 1, pp. 29–35, 2002.
- [9] E. Matouskova, L. Broz, V. Stolbova, L. Klein, R. Königova, and P. Vesely, “Human allogeneic keratinocytes cultured on acellular xenodermis: the use in healing of burns and other skin defects,” *Bio-Medical Materials and Engineering*, vol. 16, supplement 4, pp. S63–S71, 2006.
- [10] R. Zajicek, E. Matouskova, L. Broz, R. Kubok, P. Waldauf, and R. Königova, “New biological temporary skin cover Xe-Derma in the treatment of superficial scald burns in children,” *Burns*, vol. 37, no. 2, pp. 333–337, 2011.
- [11] R. Zajicek, L. Broz, L. Klein et al., “Xe-Derma: a new biological cover for treatment of acute and chronic wounds,” *Hojení Ran*, vol. 2, no. 2, pp. 18–27, 2008 (Czech).
- [12] J. G. Rheinwald and H. Green, “Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells,” *Cell*, vol. 6, no. 3, pp. 331–334, 1975.
- [13] B. Dvorankova, L. Broz, L. Pafcuga, Z. Kapounkova, and R. Königova, “The role of skin bank in the treatment of severely burnt patients,” *Acta Chirurgiae Plasticae*, vol. 46, no. 2, pp. 51–55, 2004.
- [14] D. M. Hoganson, E. M. O’Doherty, G. E. Owens et al., “The retention of extracellular matrix proteins and angiogenic and mitogenic cytokines in a decellularized porcine dermis,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 26, pp. 6730–6737, 2010.
- [15] E. Bell, H. P. Ehrlich, D. J. Buttle, and T. Nakatshji, “Living tissue formed “in vitro” and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness,” *Science*, vol. 211, no. 4486, pp. 1052–1054, 1981.
- [16] M. Prunieras, M. Regnier, and D. Woodley, “Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 81, supplement, pp. 28s–33s, 1983.
- [17] E. Matouskova, I. McKay, C. Povysil, R. Königova, A. Chaloupkova, and P. Vesely, “Characterization of the differentiated phenotype of an organotypic model of skin derived from human keratinocytes and dried porcine dermis,” *Folia Biologica*, vol. 44, no. 2, pp. 59–66, 1998.
- [18] G. Pellegrini, E. Dellambra, O. Golisano et al., “p63 identifies keratinocyte stem cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 6, pp. 3156–3161, 2001.
- [19] M. Senoo, F. Pinto, C. P. Crum, and F. McKeon, “p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia,” *Cell*, vol. 129, no. 3, pp. 523–536, 2007.
- [20] M. I. Koster and D. R. Roop, “The role of p63 in development and differentiation of the epidermis,” *Journal of Dermatological Science*, vol. 34, no. 1, pp. 3–9, 2004.
- [21] X. Feng, J. Tan, Y. Pan et al., “Control of hypertrophic scar from inception by using xenogenic (porcine) acellular dermal matrix (ADM) to cover deep second degree burn,” *Burns*, vol. 32, no. 3, pp. 293–298, 2006.