

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Užití biologických materiálů k náhradě tkání v plastické
chirurgii

MUDr. Ondřej Měšťák

2013

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

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

Školící pracoviště: Klinika plastické chirurgie 3. lékařské fakulty UK

Školitel: MUDr. Andrej Sukop, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

ABSTRAKT V ČEŠTINĚ	3
ABSTRAKT V ANGLIČTINĚ	5
ÚVOD	7
HYPOTÉZY	8
MATERIÁL A METODIKA	8
DISKUSE	13
ZÁVĚR	16
POUŽITÁ LITERATURA	17
PUBLIKACE IN EXTENSO, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTACE	19
PUBLIKACE IN EXTENSO BEZ VZTAHU K TÉMATU DISERTACE	19

Abstrakt v češtině

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 lišící se původem a zpracováním. 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 tkáně příjemce. Dalším cílem bylo zjištění vlivu obohacení acelulární prasečí dermis o kmenové buňky na histologický nálezu a pevnost vrůstání do tkáně 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 histologických parametrech síla pouzdra, reakce na cizí těleso, celularizace a vaskularizace. U *nesíťovaných* materiálů obohacených o kmenové buňky byla síla vrůstání do hostitelských tkání signifikantně vyšší.

Porovnání 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 *nesíťované* materiály disponují lepší biokompatibilitou a umožňuje vyšší vaskularizaci a celulární penetraci než *síťované*. Osídlení biologických sítěk mezenchymálními kmenovými buňkami nevedlo k signifikantnímu zvýšení vaskularizace u žádného materiálu. U

nesítovaných materiálů 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 v angličtině

Background: Biological meshes are biomaterials consisted of extracellular matrix and 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: 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

Úvod

Extracelulární matrice jsou biologické materiály stále častěji užívané v tkáňovém inženýrství a rekonstrukční chirurgii. Jsou odvozené od živočišných tkání, jako např. speciálně zpracovaných srdečních chlopní, 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^{1,2}.

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 oblastech³, augmentaci měkkých tkání a rekonstrukcích prsu⁴.

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. Složení extracelulárních matric je unikátní v každé tkáni.

Kmenové buňky jsou nediferencované buňky, které se mohou dlouhodobě dělit, aniž by se diferencovaly. Mají schopnost sebeobnovy a diferenciaci. 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 tkáně⁵.

Nejdůležitějším krokem zpracování extracelulárních matric je decelularizace k odstranění cizích celulárních antigenů, které způsobují rejekci tkáně. V závislosti na dalším zpracování můžeme rozdělit tyto biologické materiály na síťované a nesíťované. Výrobci provádějí síťování materiálů s cílem zvýšení jejich pevnosti. Nevýhodou síťování je snížení biokompatibility a slabší vrůstání do tkání příjemce. Dlouhou dobu probíhá diskuze do jaké míry síťování tyto vlastnosti ovlivňuje.

Cíle práce

Cílem práce bylo srovnání síťované a nesíťované acelulární prasečí dermis na dlouhodobém modelu břišní kýly na malém zvířeti 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.

Hypotézy

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 silnějšímu 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.

Materiál a 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. Těmito buňkami jsme obohatili část materiálu k implantaci. Identitu kmenových buněk jsme ověřili jejich diferenciací v adipocyty a chondrocyty.

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. Ke srovnání byla užitá komerčně dostupná

sítovaná 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 sítována hexamethylen diisocyanátem.

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 (onlay) 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) sítovaná acelulární prasečí dermis, 3. skupině (n=6) nesítovaná acelulární prasečí dermis obohacená o ADSC a 4. skupině (n=6) sítovaná acelulární prasečí dermis obohacená o ADSC. Ránu jsme zažili s užitím Vicrylu 3/0 (Ethicon Inc., USA). Pooperační analgézie 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. 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. Přední a zadní část byla histologicky vyšetřena. Prostřední část (15mm silný proužek) byla mechanicky testována.

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. 1).

Mechanické vlastnosti byly testovány na přístroji Inspekt table (Hagewald &Peschke, Německo). Každý vzorek byl v přístroji Inspekt table orientován

horizontálně s fixací obou konců do čelistí. Tloušťka vzorků byla hodnocena přístrojem Mitutoyo ABSOLUTE (Mitutoyo Inc., Japan).

Tensiometricky byla hodnocena síla nutná k přetržení vzorku, 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 několika hodnotami. Maximální síla nutná k přetržení vzorku byla vyjádřena v newtonech (N). Maximální síla vztažená na velikost průřezu (napětí) byla hodnocena v megapascálech (MPa).

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

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 fibro-elastickými 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. 1: Semikvantitativní histopatologické hodnocení explantátů jak je popsáno v ISO 10993-6

Výsledky

Kultivace buněk, diferenciací 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). Diferenciací v adipocyty: v buňkách byla pozorována akumulace vakuol bohatých na lipidy. Nakonec se lipidové vakuoly spojily a zaplnily buňky. Diferenciací v osteoblasty: buňky vytvořily shluhy buněk, které byly obarveny alizarinskou červení.

Histologické nálezy

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

Všechny materiály vykazovaly celularizaci 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. 2, 3).

Parametr	Sítovaná	Sítovaná + kmenové buňky	p-hodnota
Celularizace	1,25	1,333	1
Vaskularizace	1,75	1,167	0,375
Síla pouzdra	0,333	1	0,83

Tab. 2: 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	0,8	1	0,638

Tab. 3: Srovnání histologických parametrů nesítovaných materiálů s obohacením a bez obohacení kmenovými buňkami

Průměrná celularizace ve skupině síťované 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 nesíťované acelulární prasečí dermis bez obohacení kmenovými buňkami byla 2 a ve skupině s obohacením kmenovými buňkami 1,2 ($p=0,455$). Výsledky byly statisticky nevýznamné.

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 neobohacené o kmenové buňky byla na stupni 2 a ve skupině obohacené o kmenové buňky byla na stupni 1,4 ($p=0,542$). Výsledky byly statisticky nevýznamné.

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 ($p=0,638$). Výsledky nebyly statisticky významné.

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

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

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

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. To napovídá, že ztlustění kapsul může být reverzibilní.

MECHANICKÉ TESTOVÁNÍ

Srovnání materiálů s obohacením a bez obohacení o kmenové buňky ve 3 měsících

Síla vrůstání *síťované* acelulární prasečí dermis obohacené o kmenové buňky byla vyšší než u materiálů, které nebyly obohacené 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.

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

V průběhu testovací doby napětí a síla vzorků do ruptury narůstaly. Místo přerušeni vzorků bylo srovnatelné u všech implantátů.

3 měsíce od implantace, *nesíťované* acelulární prasečí dermis disponovaly signifikantně vyšším napětím potřebným pro rupturu vzorku (0,75 vs. 0,59 MPa; $p=0,007$). 6 měsíců po implantaci byly rozdíly mezi *nesíťovanou* acelulární prasečí dermis a *síťovanou* acelulární 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 *nesíťované* acelulární prasečí dermis stoupala od 3 měsíců (0,75 MPa) do 12 měsíců (3,06 MPa) od implantace. Pevnost *síťované* acelulární prasečí dermis také stoupala z 0,59 MPa ve 3 měsících na 1,58 MPa ve 12 měsících po implantaci.

Diskuse

V posledních letech dochází k rozšíření užití biologických biomateriálů ve formě extracelulárních matric pro rekonstrukci břišní stěny. Stále existuje nedostatek experimentálních i 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 doplnění chybějících dat jsou studie experimentální.

Biologické sítě disponují vysokou biokompatibilitou, abilitou inkorporace do tkáně příjemce a schopností vaskularizace, která zvyšuje jejich rezistenci k infekcím. Užívají se v celém spektru chirurgických výkonů, ale jejich nejčastější klinickou indikací zůstává rekonstrukce břišní stěny.

Stabilita a jiné vlastnosti biologických sítěk jsou výrazně ovlivněny chemických a fyzikálních zpracování při produkci. Jednou z nejvíce užívaných možností zvýšení biostability biologických sítěk je síťování (cross-linking). Pokusy výrobců biologických sítěk zvýšit tímto jejich pevnost může vést k narušení biokompatibility a snížení síly vrůstání sítěk do tkáně příjemce. Materiály se stanou příliš kompaktními aby do nich mohly vrůstat cévy a jiné tkáně. To má za následek slabší spojení mezi materiálem a tkáně příjemce, například břišní stěnou.

V literatuře jsou popsány velmi kontroverzní názory na užití síťovaných a nesíťovaných biologických sítěk v experimentální i klinické praxi. Některé studie naznačují, že síťované extracelulární matrice jsou dlouhodobě stabilní s vysokou biokompatibilitou *in vivo*^{3,6-12}. Jiné studie tvrdí, že jsou síťované materiály mnohem méně biokompatibilní, nevhodné k aplikaci v klinické praxi¹³⁻¹⁵ a potenciálně rizikové k rejekci¹⁶. Většina studií byla financována společnostmi produkujícími tyto materiály. Navíc, studie testovaly materiály po dobu několika týdnů nebo měsíců. Podobné parametry uvedené studie devalvují.

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 matic.

Nesíťované acelulární prasečí dermis byly makroskopicky degradovány 3 měsíce od implantace, ale tato degradace nenarůstala dále mezi 3. a 12. měsícem od implantace. 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 sítky většinou selhávají spíše v oblasti spoje sítky se svalovou fascií než v oblasti vlastní sítky. Časné vytvoření silného spoje mezi sítkou a fascií je důležité pro snížení rizika rekurence kýly ve vztahu k potenciální separaci rozhraní sítky – fascie¹⁴.

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 zatížení¹⁷.

V literatuře existuje několik studií sledující kombinaci kmenových buněk s biologickými sítkami. Zhao¹⁸ popisuje acelulární dermální matrix osídlenou autologními buňkami kostní dřeně při užití k rekonstrukci břišní stěny u králíka. Jiná studie od japonských autorů¹⁹ hodnotila resorpci acelulární dermální matrice osídlené autologními kmenovými buňkami derivovanými z tukové tkáně. V obou studiích bylo popsáno, že samostatné biologické sítky 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 síťování v současnosti jediným přístupem ke zpomalení degradace biologických sítěk⁷. 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. Na druhou stranu, kmenové buňky derivované z tukové tkáně jsou velmi snadno přístupné. Jejich odběr disponuje minimální morbiditou dárcovského místa. Existují nástroje k izolaci kmenových buněk z tukové tkáně přímo na sále²⁰.

Na rozdíl od výsledku výše zmíněných autorů^{18,19}, velký počet literálních pramenů demonstruje mimořádně dobré klinické vlastnosti

biologických sítěk bez osídlení kmenovými buňkami, včetně komplikovaných případů²¹⁻²³. 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 tkáně příjemce se potvrdilo pouze u nesíťované acelulární prasečí dermis. Zlepšení vaskularizace po obohacení kmenovými buňkami se nepotvrdilo u žádného z obou materiálů.

Dle našeho názoru je izolace a osídlení kmenových buněk na sítě 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 vrůstáním do tkáně příjemce a zlepšení pevnosti srůstu s břišní stěnou. Oba materiály si zachovaly pevnost v průběhu celé doby testování. Vyšší míra celulární penetrace pozorovaná při histologickém vyšetření korelovala se silnějším vrůstáním do tkáně 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 tkáně příjemce. U nesíťované acelulární prasečí dermis se po přidání kmenových buněk síla vrůstání do tkáně příjemce signifikantně zvýšila. S ohledem na fakt, že izolace a obohacení biologických sítěk kmenovými buňkami je velmi komplexní procedura, neshledáváme dostatečné výhody tohoto obohacení v klinické praxi.

Použitá literatura

1. Primus, F. E. & Harris, H. W. A critical review of biologic mesh use in ventral hernia repairs under contaminated conditions. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* **17**, 21–30 (2013).
2. Montgomery, A. The battle between biological and synthetic meshes in ventral hernia repair. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* **17**, 3–11 (2013).
3. Smart, N. J., Marshall, M. & Daniels, I. R. Biological meshes: a review of their use in abdominal wall hernia repairs. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* **10**, 159–171 (2012).
4. Spear, S. L., Parikh, P. M., Reisin, E. & Menon, N. G. Acellular dermis-assisted breast reconstruction. *Aesthetic Plast Surg* **32**, 418–425 (2008).
5. Gimble, J. M., Katz, A. J. & Bunnell, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* **100**, 1249–1260 (2007).
6. Catena, F. et al. Use of porcine dermal collagen graft (Permacol) for hernia repair in contaminated fields. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* **11**, 57–60 (2007).
7. de Castro Bras, L. E., Proffitt, J. L., Bloor, S. & Sibbons, P. D. Effect of crosslinking on the performance of a collagen-derived biomaterial as an implant for soft tissue repair: a rodent model. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **95**, 239–249 (2010).
8. Gaertner, W. B., Bonsack, M. E. & Delaney, J. P. Experimental evaluation of four biologic prostheses for ventral hernia repair. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **11**, 1275–1285 (2007).
9. Macleod, T. M., Williams, G., Sanders, R. & Green, C. J. Histological evaluation of Permacol as a subcutaneous implant over a 20-week period in the rat model. *British journal of plastic surgery* **58**, 518–532 (2005).
10. Mulier, K. E., Nguyen, A. H., Delaney, J. P. & Marquez, S. Comparison of Permacol and Strattice for the repair of abdominal wall defects. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* **15**, 315–319 (2011).
11. O'Brien, J. A. et al. Long-term histologic and mechanical results of a Permacol abdominal wall explant. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* **15**, 211–215 (2011).
12. Parker, D. M., Armstrong, P. J., Frizzi, J. D. & North, J. H. J. Porcine dermal collagen (Permacol) for abdominal wall reconstruction. *Current surgery* **63**, 255–258 (2006).
13. Ayubi, F. S., Armstrong, P. J., Mattia, M. S. & Parker, D. M. Abdominal wall hernia repair: a comparison of Permacol and Surgisis grafts in a rat hernia model. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* **12**, 373–378 (2008).
14. Butler, C. E. et al. Comparison of cross-linked and non-cross-linked porcine acellular dermal matrices for ventral hernia repair. *Journal of the American College of Surgeons* **211**, 368–376 (2010).
15. Wotton, F. T. Rejection of Permacol(R) mesh used in abdominal wall repair: A case report. *World Journal of Gastroenterology* **15**, 4331 (2009).

16. Petter-Puchner, A. H. et al. Adverse effects associated with the use of porcine cross-linked collagen implants in an experimental model of incisional hernia repair. *The Journal of surgical research* **145**, 105–110 (2008).
17. Clemens van Blitterswijk, P. T. A. L. J. H. D. F. W. R. C. J. D. de B. A. J. S. *Tissue Engineering*. (Elsevier Academic Press, 2008).
18. Zhao, Y. et al. Abdominal Hernia Repair With a Decellularized Dermal Scaffold Seeded With Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Artificial organs* **36**, 247–255 (2011).
19. Orbay, H., Takami, Y., Hyakusoku, H. & Mizuno, H. Acellular Dermal Matrix Seeded with Adipose-Derived Stem Cells as a Subcutaneous Implant. *Aesthetic Plast Surg* **35**, 756–763 (2011).
20. Lin, K. et al. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system. *Cytotherapy* **10**, 417–426 (2008).
21. Butler, C. E. The role of bioprosthesis in abdominal wall reconstruction. *Clinics in plastic surgery* **33**, 199–211– v–vi (2006).
22. Hiles, M., Record Ritchie, R. D. & Altizer, A. M. Are biologic grafts effective for hernia repair?: a systematic review of the literature. *Surgical innovation* **16**, 26–37 (2009).
23. Iannitti, D. A. et al. Technique and outcomes of abdominal incisional hernia repair using a synthetic composite mesh: a report of 455 cases. *Journal of the American College of Surgeons* **206**, 83–88 (2008).

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

S impakt faktorem

Mestak O, Matouskova E, Spurkova Z, Benkova K, Vesely P, Mestak J, Molitor M, Pombinho A, Sukop A.

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.

Artif Organs. 2013 Dec 4. doi: 10.1111/aor.12224. [Epub ahead of print]

IF= 1.964

Zajicek R, Mandys V, Mestak O, Sevcik J, Königova R, Matouskova E.

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

ScientificWorldJournal. 2012;2012:727352. Epub 2012 May 3.

IF=1,524

Bez impakt faktoru

Kulhánek J, Mestak O.

[Reconstruction of complex abdominal wall defects using the component separation technique].

Rozhl Chir. 2013 Fall;92(11):640-3. Czech. PubMed PMID: 24299286.

Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace

S impakt faktorem

Mestak, Ondrej, Jan Mestak, and Jiri Borsky.

"Hyperprolactinaemia: A cause of severe postoperative complication after reduction mammoplasty."

Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery 0 (2013): 1-2.[Epub ahead of print]

IF= 0.539

Mestak O, Kullac R, Mestak J, Nosek A, Krajcova A, Sukop A.

Reply: evaluation of the long-term stability of sheath plication.

Plast Reconstr Surg. 2013 May;131(5):852e. doi: 10.1097/PRS.

0b013e318287a02a. PubMed PMID: 23629132.

IF = 3,3

Kulhanek J, Mestak O.

Treatment of umbilical hernia and recti muscles diastasis without a periumbilical incision.

Hernia. 2013 Aug;17(4):527-30. doi:10.1007/s10029-013-1047-1.

IF=1.843

Mestak O, Kullac R, Mestak J, Nosek A, Krajcova A, Sukop A.

Evaluation of the long-term stability of sheath plication using absorbable sutures in 51 patients with diastasis of the recti muscles: an ultrasonographic study.

Plast Reconstr Surg. 2012 Nov;130(5):714e-9e.

IF = 3,3

Mestak O, Mestak J, Pokorna K, Bruna J, Sukop A. Unusual regression of severe recurrent lymphatic malformation of a face after contraception and pregnancy.

Gynecol Endocrinol. 2012 Oct;28(10):764-6.

IF= 1.461

Mestak J, Sukop A, Mestak O.

Use of deepithelialized flap in mammoplasties: simple method with excellent results.

Aesthetic Plast Surg. 2011 Dec;35(6):1106-11.

IF = 1.252

Sukop A., Naňka O., Tvrdek M., Dušková M., Budka Š., Měšťák O.,
Hauschwitzová L.

Clinical Anatomy of the Dorsal Venous Network in Fingers with Regard to Replantation

Clinical Anatomy 2007 Jan;20(1):77-81

IF=0,6

Bez impakt faktoru

Mestak, O., Mestak, J., Bohac, M., Edriss, A., Sukop, A.
"Breast Reconstruction after a Bilateral Mastectomy Using the BRAVA
Expansion System and Fat Grafting."
Plastic and Reconstructive Surgery–Global Open 1.8 (2013): e71.

Ryska, O., Šerclová, Z., Měšťák, O., Matoušková, E., & Veselý, P.
Experimentální model perianální píštěle na malém laboratorním zvířeti.
Gastroenterologie a hepatologie 2013; 67(4).

Ryska, O., Serclova, Z., Mestak, O., Matouskova, E., & Vesely, P.
*Sborník abstrakt. P340 Therapy of intestinal fistula with autologous adipose
tissue derived stem cells doesn't lead to fistula closure in animal model–first
results.*
Journal of Crohn's and Colitis, 7, S146.

Urban K, Kment L, Měšťák J, Krajcová A, Mestak O.
OUR EIGHT-YEAR EXPERIENCE WITH BREAST RECONSTRUCTION USING
ABDOMINAL ADVANCEMENT FLAP (207 RECONSTRUCTIONS).
Acta Chir Plast. 2012 Winter;54(2):63-66.

Mestak O, Zimovjanová M.
[Breast reconstruction by autologous fat transfer].
Rozhl Chir. 2012 Jul;91(7):373-7. Czech. PubMed PMID: 23078255.

Mestak J, Mestak O.
Miniabdominoplasty.
Acta Chir Plast. 2010;52(1):23-6.

Pros Z, Mestak J, Mestak O.
Synmastia - an unusual complication of augmentation mammoplasty
Acta Chir Plast. 2008;50(3):85-8.