

# PRÍPRAVA A POUŽITIE TRANSPLANTÁTOV ACELULÁRNEJ ALODERMY V POPÁLENINOVEJ, REKONŠTRUKČNEJ A PLASTICKEJ CHIRURGII.

**J. Koller<sup>1</sup>, M. Hajská<sup>1</sup>, D. Palenčár<sup>2</sup>, M. Kuniaková<sup>1</sup>,  
N. Šarközyová<sup>1</sup>, J. Dragúňová<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Klinika popálenín a rekonštrukčnej chirurgie LF UK, Nemocnica Ružinov

<sup>2</sup>Klinika plastickej chirurgie LF UK Nemocnica Ružinov

# Transplantáty kože alogénneho pôvodu

sa používajú viaceré desaťročia najmä

v popáleninovej medicíne ako

## náhrady kože na dočasné prekrytie rán.

- poskytujú **bariéru** proti prenikaniu mikroorganizmov
- výrazne **znižujú bolesť** rán
- **zabraňujú stratám tekutín a bielkovín** cez otvorenú ranu a chránia ranu pred vysychaním
- majú schopnosť **stimulovať epitelizáciu** z okrajov rany a zo zvyškov epidermálnych elementov pri neexcidovaných popáleninách hlbokého II. stupňa
- **znižujú energetické straty** organizmu
- **pripravujú rany na definitívne prekrytie**

**Nevýhodou** alogénnych transplantátov je ich **antigenicita vyvolaná bunkami**, ktoré ich osídľujú, čo následne spôsobuje ich **rejekciu**.

### **BUDEME HOVORIŤ O:**

- 1. Príprave** alogénnej acelulárnej dermálnej náhrady v tkanivovej banke
- 2. Klinickom a inom použití** kryokonzervovaných acelulárnych alogénnych dermálnych transplantátov (AcelAlo)

# DOTERAZ POUŽÍVANÉ METÓDY NA ODSTRÁNENIE BUNIEK Z DERMÁLNYCH NÁHRAD

- Fyzikálne:** - zmrazovanie/ rozmrazovanie
- Chemické:** - kombinácia dispázy a Tritonu  
- kombinácia NaCl s SDS (sodiumdodecylsulfát)
- Kombinované:** - kombinácia rozmrazovania, dispázy,  
Tritonu, SDS aj NaCl

Tieto **metódy sú pomerne drastické** a môžu mať za následok aj **zvyškovú toxicitu** a preto **nemusia byť vhodné pre použitie na prípravu matrice na kultiváciu buniek.**

# KOMERČNE DOSTUPNÉ PRODUKTY

**AlloDerm<sup>®</sup>, MatriDerm<sup>®</sup>, Zenoderm<sup>®</sup>**  
**(deepidermizovaná derma bovínneho pôvodu)**

**Tieto produkty v slovenskej medicíne nenašli  
širšie uplatnenie najmä kvôli  
vysokej cene a komplikovanému dovozu.**

# NOVÝ SPÔSOB PRÍPRAVY AcelAlo

- Využíva známu metódu **oddelenia epidermy trypsínom**
- **Eliminuje následné používanie detergentov**
- Odstránenie bunkových komponentov zaisťuje vystavenie dermy **HYPOTONICKÉMU PROSTREDIU.**

## **STERILNÁ DESTILOVANÁ VODA**

je hypotonická, šetrná k dermálnym komponentom, ale na základe našich predchádzajúcich skúseností by mala bunkové komponenty dôkladne odstrániť. Aplikácia destilovanej vody namiesto agresívnych detergentov by mala zaručiť **významne nižšiu toxicitu produktu** a teda jeho **vhodnosť ako nosiča pre kultiváciu buniek.**

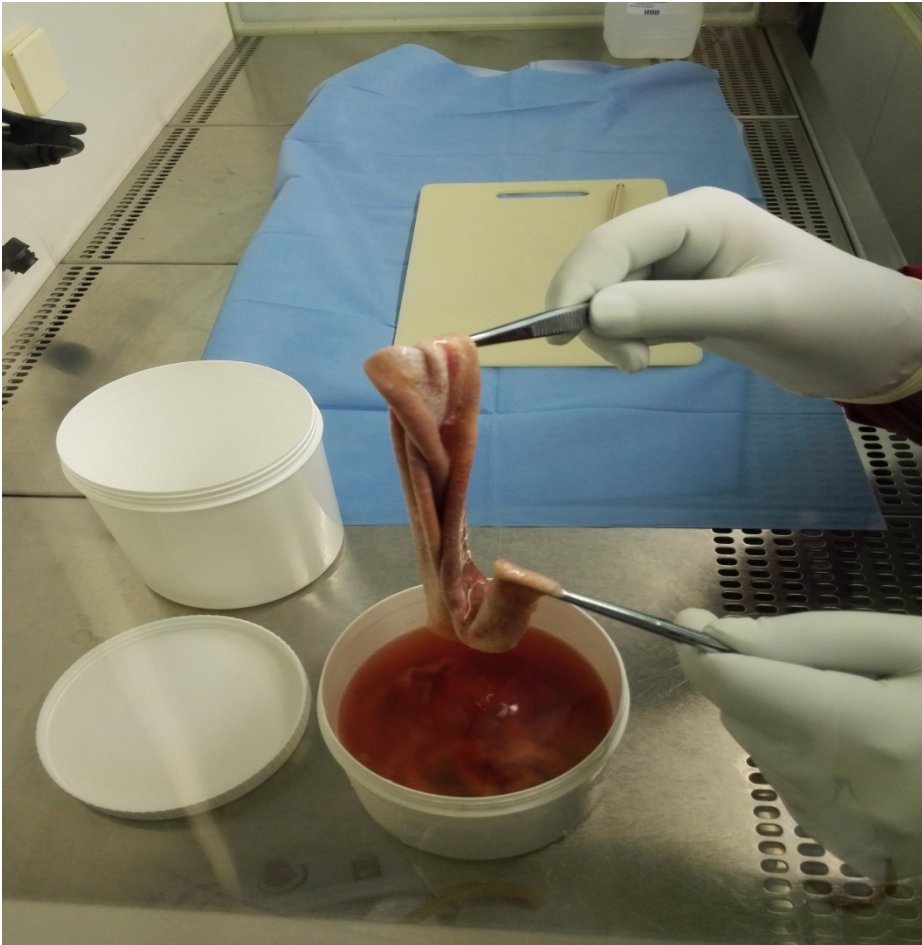
# POSTUP PRÍPRAVY 1.

## Odber kože z kadaverózneho darcu

Podľa platných Štandardných pracovných postupov CTB



# POSTUP PRÍPRAVY 2.



- Laváž v antibiotikách  
(dekontaminácia)



- Trypsín /EDTA

laboratórna teplota cez noc

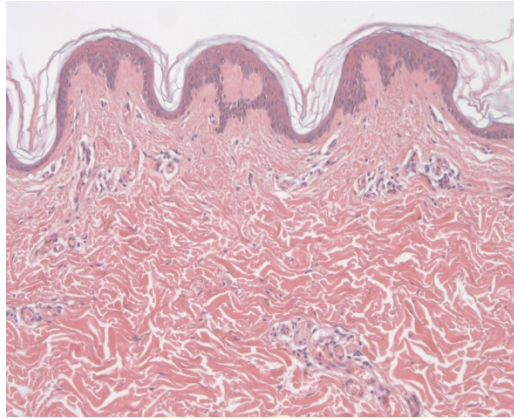


- Trypsín /EDTA

1 hod 37<sup>0</sup> C

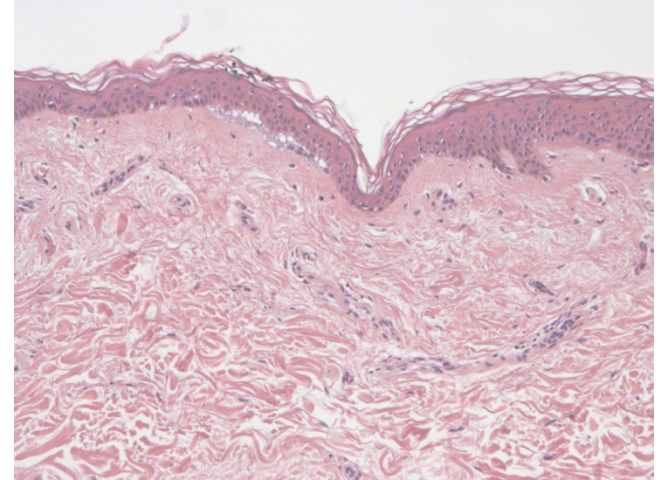


# Ložiskové odštiepenie epidermy od BM



1. Odobratá koža

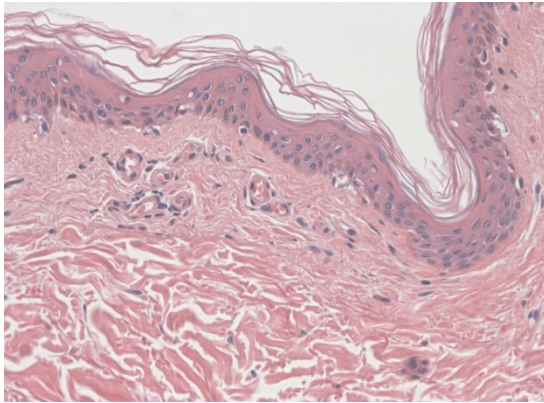
Trypsín + EDTA



2.

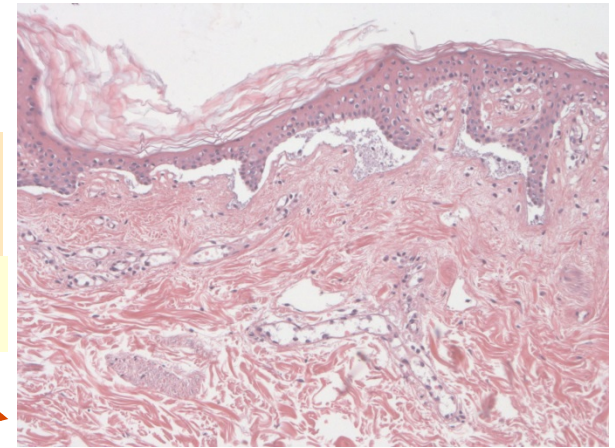
Trypsín/EDTA

Mechanické odstránenie epidermy



3.

Ložiskové štiepenie epidermy od BM

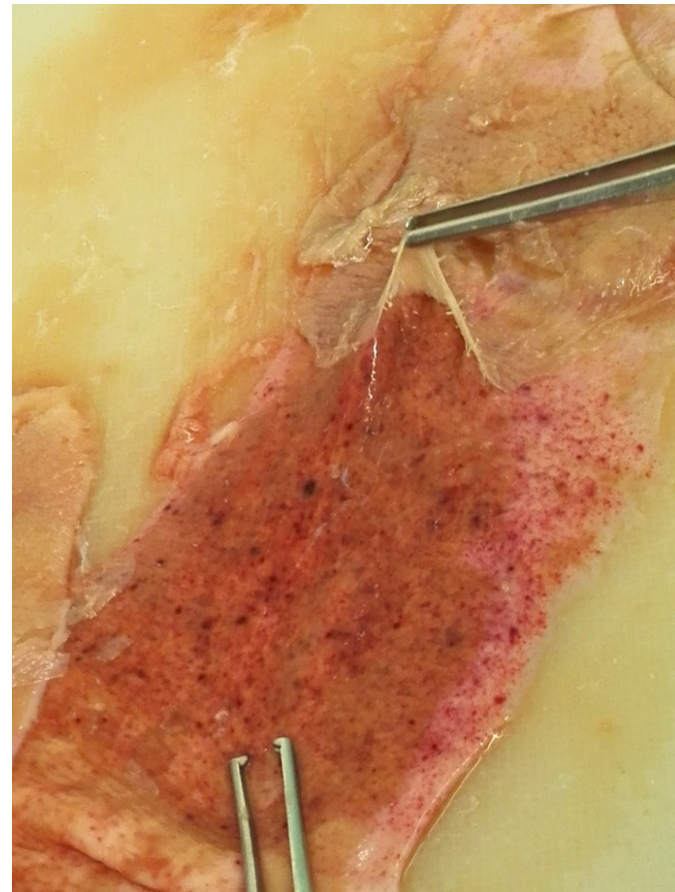
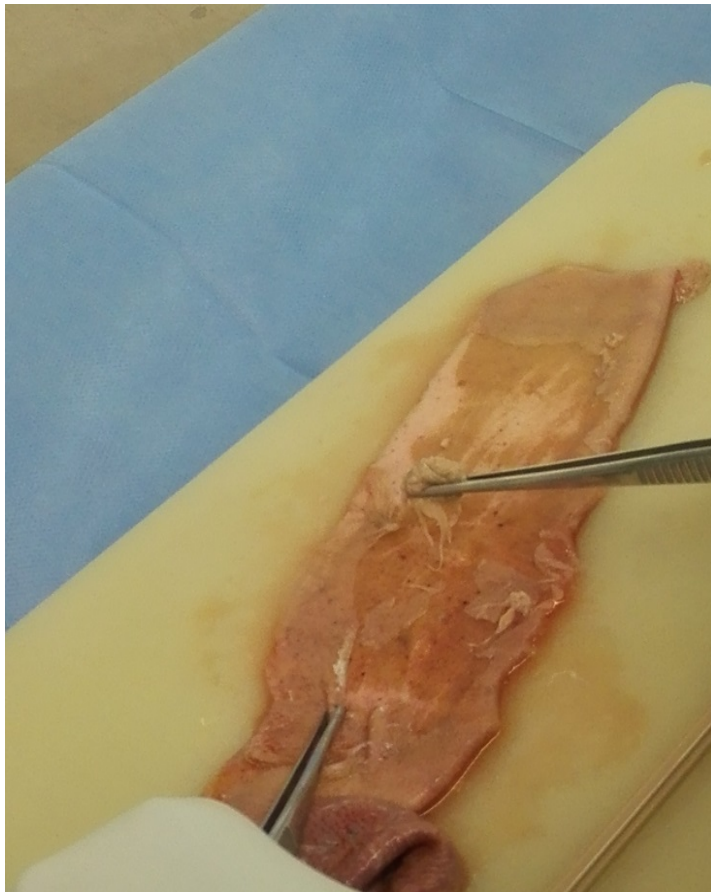


4.

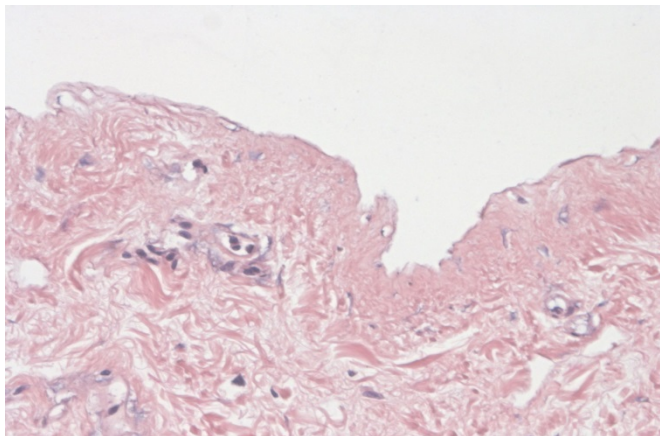
Ložiskové štiepenie epidermy od BM

# POSTUP PRÍPRAVY 3

## MECHANICKÉ ODSTRAŇOVANIE EPIDERMY

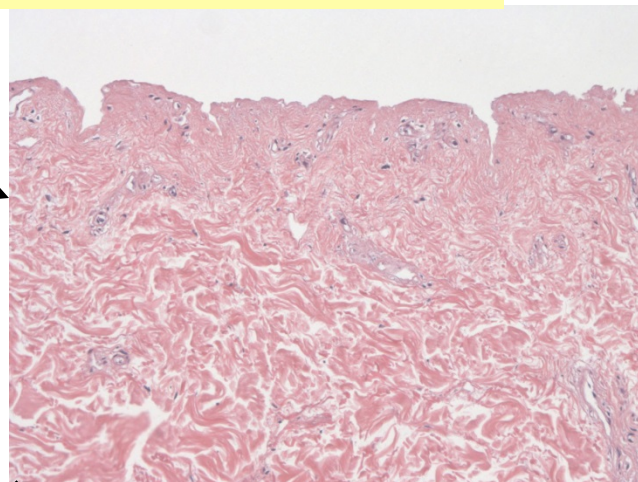


# DECELULARIZÁCIA 4.

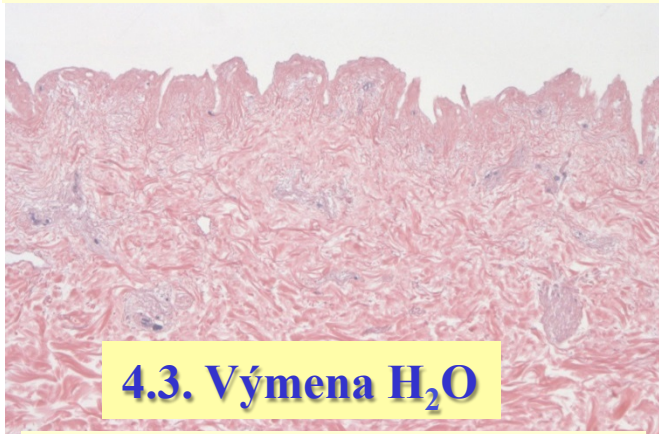


**4.1. Výmena H<sub>2</sub>O**

Epiderma uvoľnená, drží sa iba na vrcholoch papíl (cca 10%), bunky kožných adnex sú živé, aj vlasové folikuly a niektoré cievy

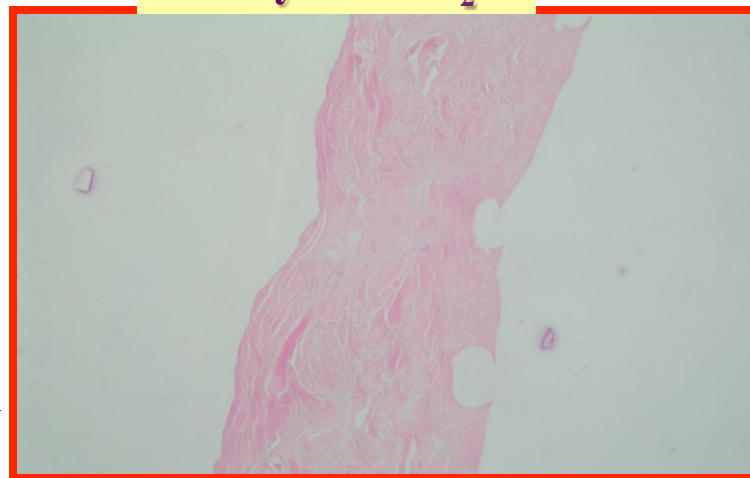


**4.2. Výmena H<sub>2</sub>O**



**4.3. Výmena H<sub>2</sub>O**

Holá BM, v derme iba ojedinelé živé bunky v potných žliazkach



**4.5. Po úplnej decelularizácii  
5x výmena H<sub>2</sub>O**

## **5. Laváž v antibiotikách**

**cez noc, laboratórna teplota**

**(Gentamycín 240 mg; Vankomycín 50 mg;**

**Candibene 20 ml 1% roztoku;**

**Penicilín 2x 10<sup>6</sup> U)**

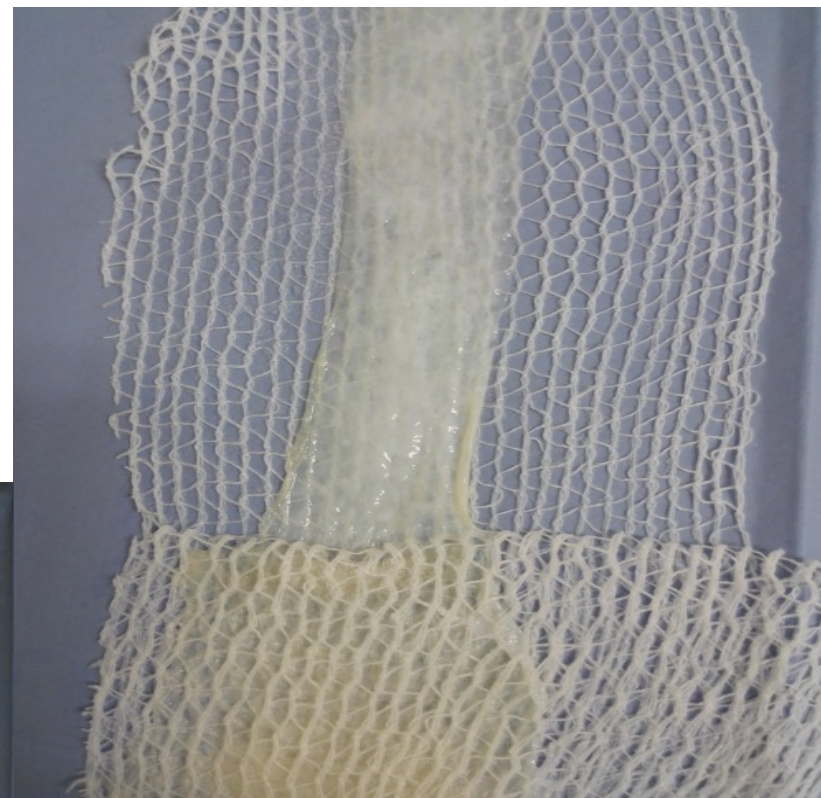
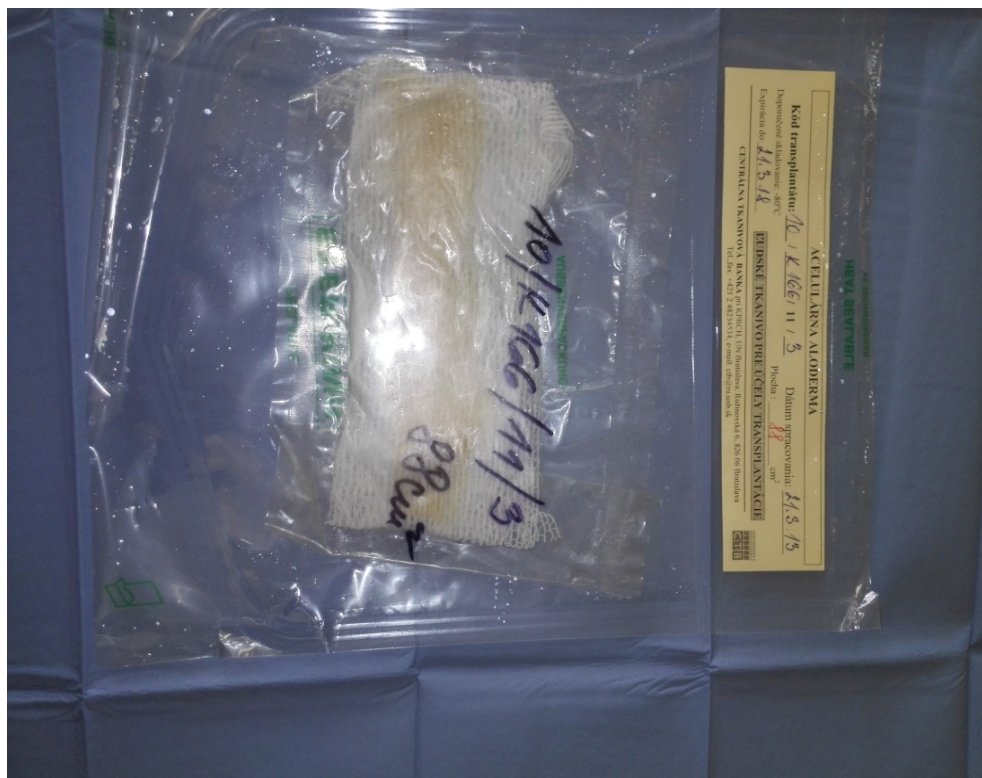
**Odber vzoriek na testy sterility**



## **6. Balenie a uskladnenie**

# 7. Balenie

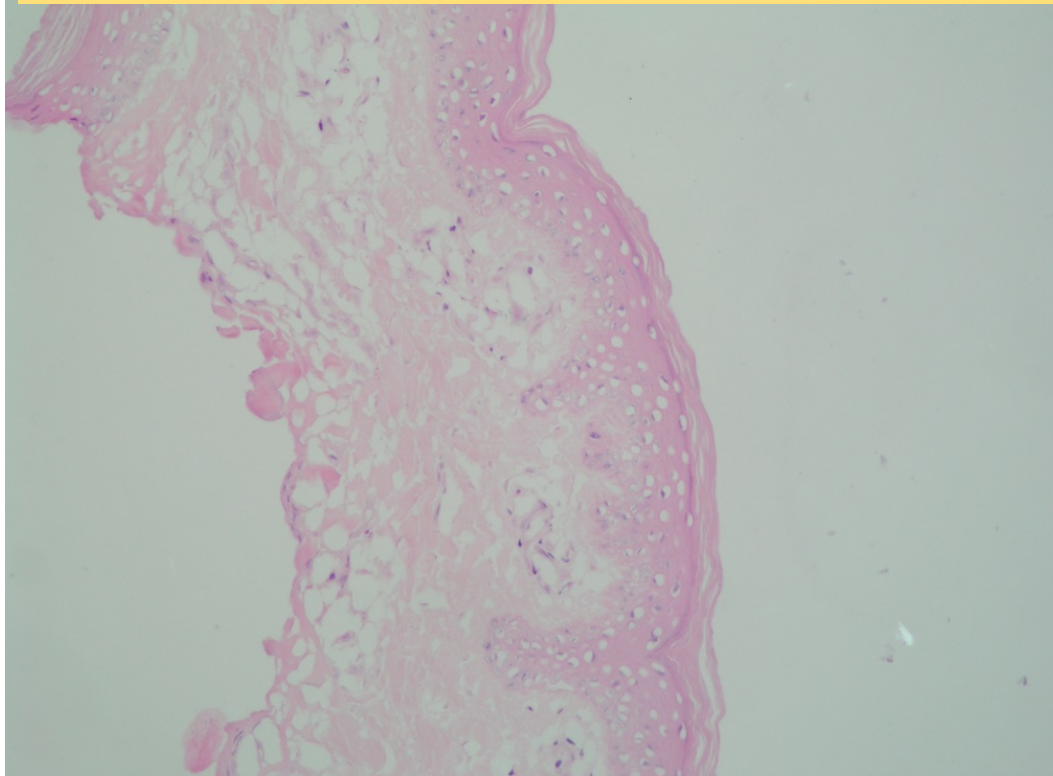
2 obaly: Steriking – sterilný  
CoverBag



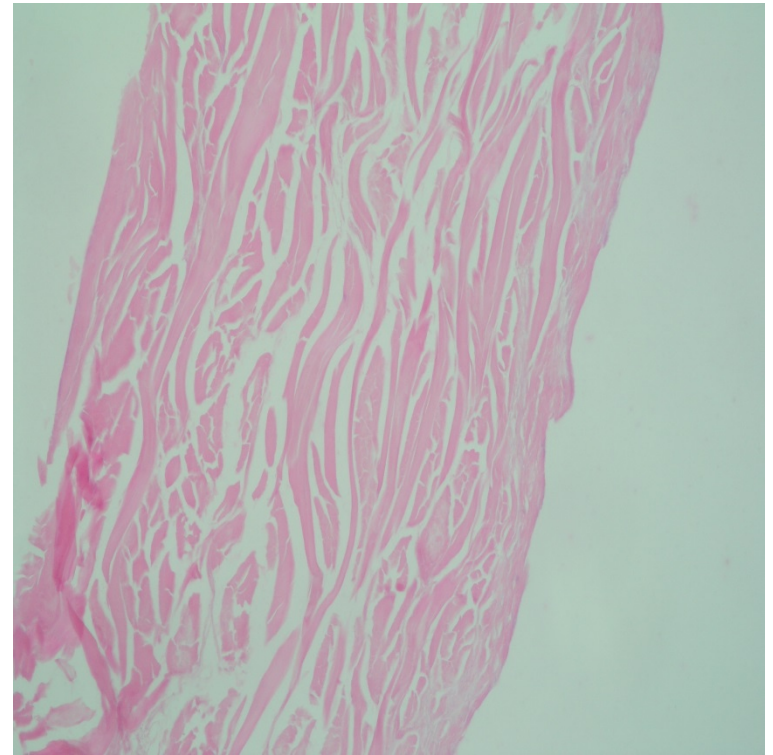
# 8. SKLADOVANIE

hlboko mraziaci box na  $-70^{\circ}\text{C}$

# ACELULÁRNA XENODERMA

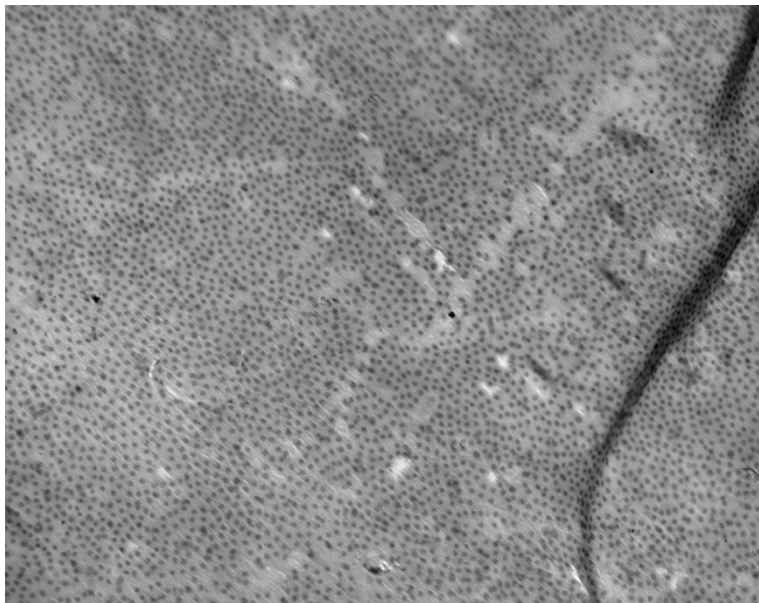


**Odobraný xenotransplantát**



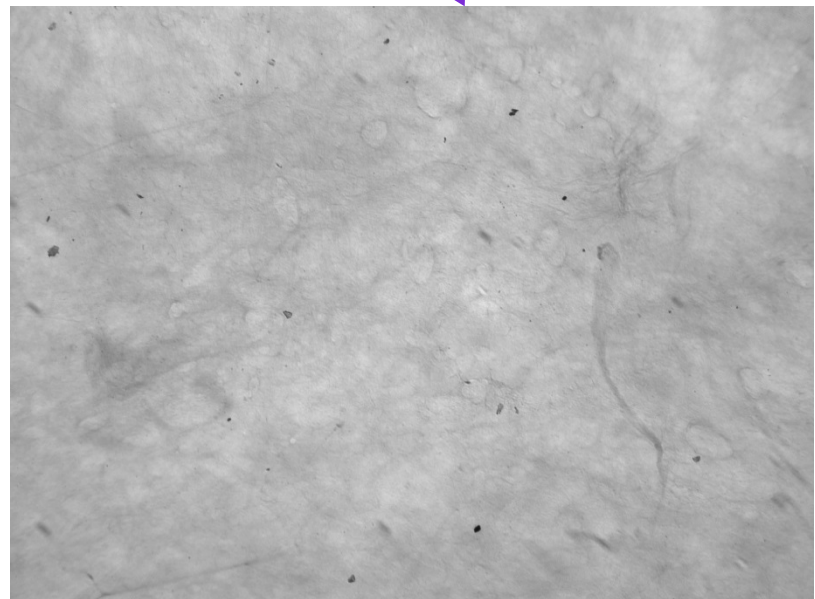
**Acelulárna xenoderma**

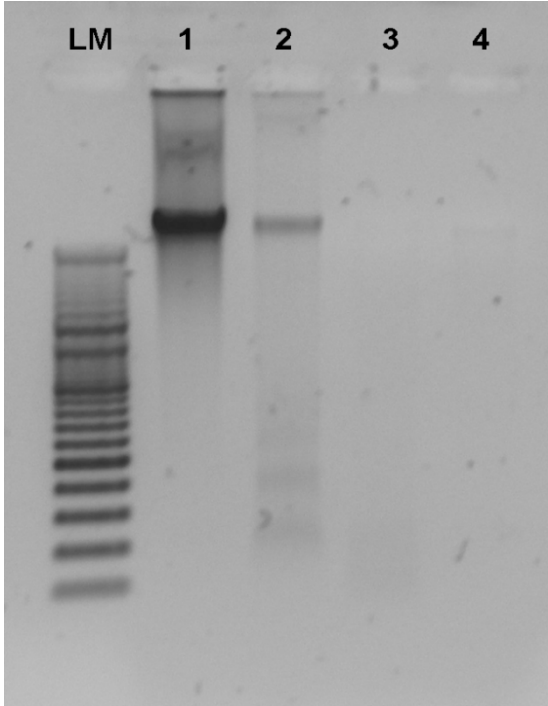
# ACELULÁRNA AMNIOVÁ MEMBRÁNA (AM)



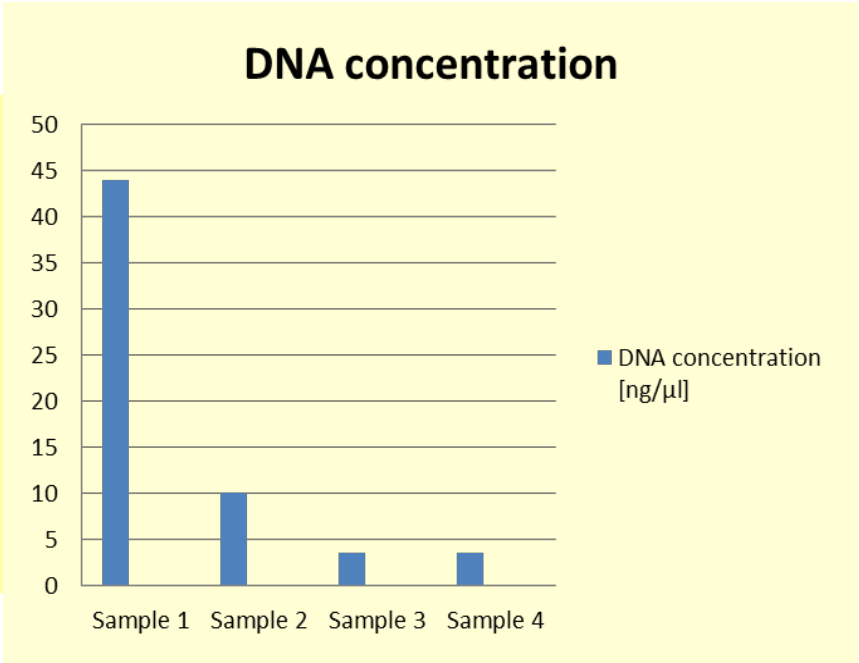
**AM PO ODBERE**

**DECELULARIZOVANÁ  
AM**





**Množstvo zbytkovej DNA po jednotlivých premytiach**



- Vzorka 1: Aloderma
- Vzorka 2: 1x premytie v H<sub>2</sub>O
- Vzorka 3: 4x premytie
- Vzorka 4: po 5. premytiach

**DETEKCIA ZBYTKOVEJ DNA -VZORKY**

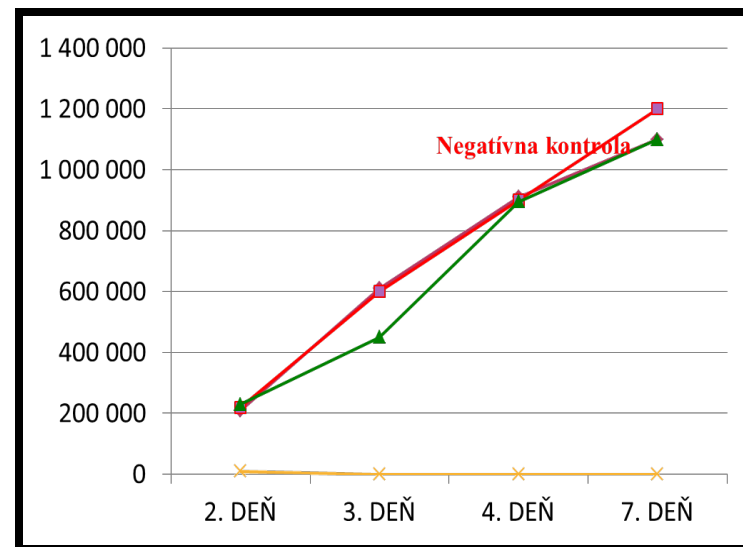
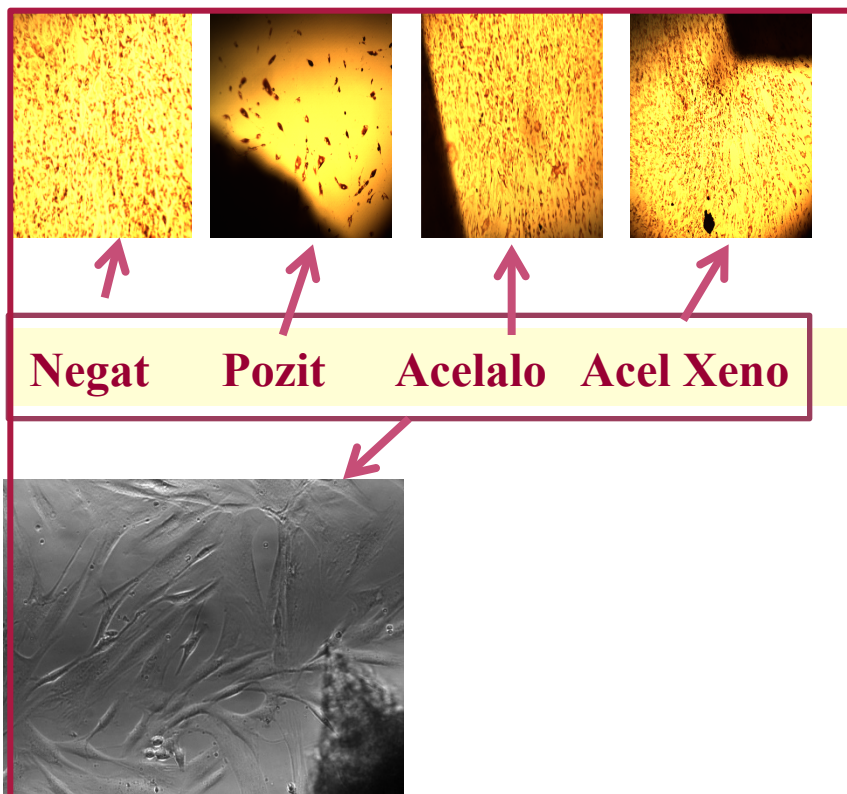
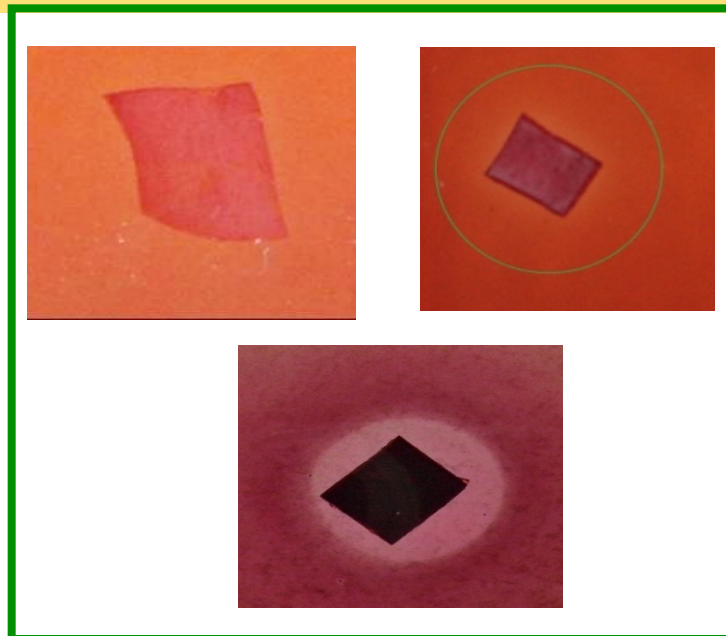
Visualization of DNA fragments in 1% agarose gel  
 LM=Length ladder,  
 Sample 1: Allodermis  
 Sample 2: 1x washing by H<sub>2</sub>O  
 Sample 3: 4x washing  
 Sample 4: after 5x washing

**Množstvo DNA vo vzorkách 3 a 4 (4x a 5x premytie) je menšie, ako 4 ng/μl. Toto predstavuje hodnoty pre negatívnu kontrolu**



# TESTOVANIE CYTOTOXICITY

1. Test difúzie v agarovom géli
2. Test kontaktnej inhibície
3. Rastová krivka



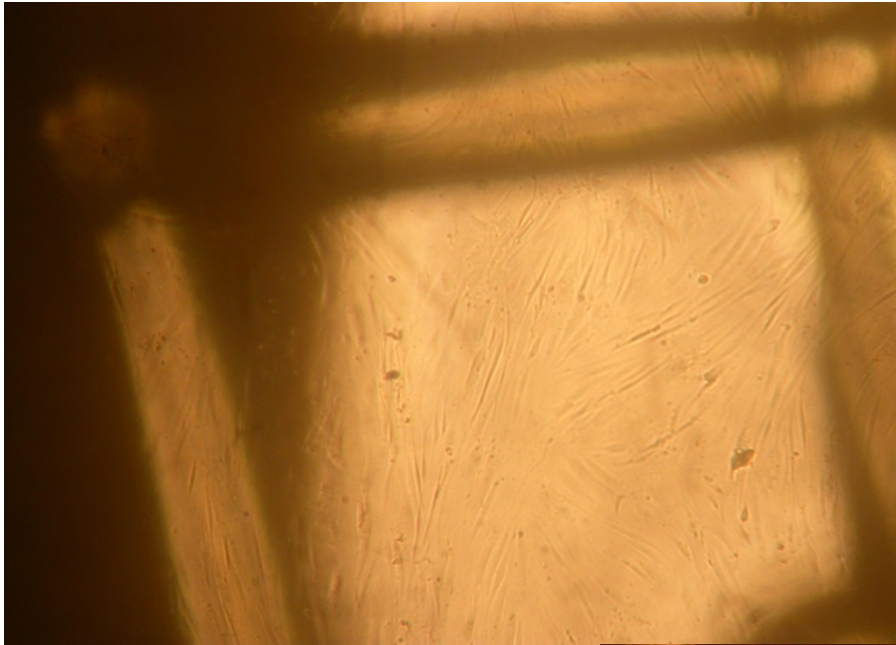
# PREDBEŽNÉ VÝSLEDKY I.

**Acelulárna aloderma (AcelAlo) ani  
acelulárna xenoderma (AcelXeno) ani  
amnion nevykazovali na bunkových  
kultúrach žiadne známky cytotoxicity**

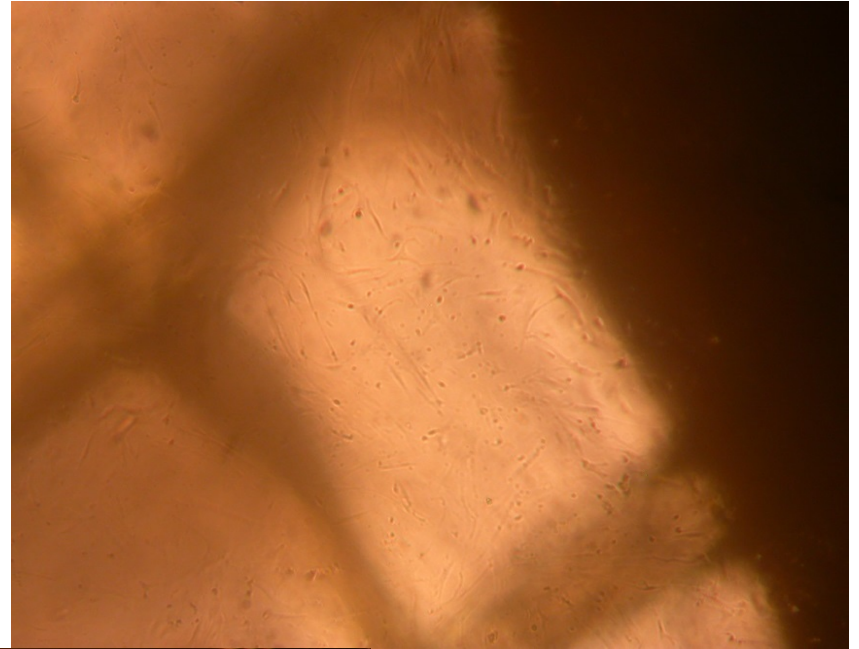
**Potvrdilo sa, že sú vhodným nosičom  
pre in vitro kultiváciu rôznych druhov  
buniek**

Boháč M; Danišovič L; Koller J; Dragúňová J; Varga I: What happens to an acelar dermal matrix after implantation in the human body? A histological and electron microscopic study. Eur. J. of Histochemistry, 2018, 62: 2873

# Rast buniek na acelulárnej aloderme

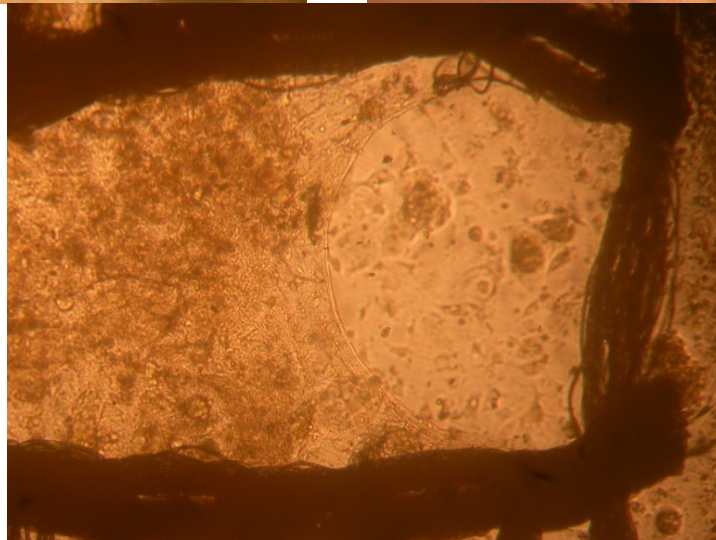


**Dermálne  
fibroblasty**



**MSC**

**Keratinocyty**



# Klinické využitie acelulárnej alodermy (AcelAlo)

## CHIRURGIA

- **Rekonštrukcie prsníkov po mastektómii**
- **Chronické rany po debridemente - diabetická noha**
- **Operácie hernií (náhrada syntetickej sieťky)**
- **Augmentácia Achilovej, patelárnej a inej šľachy**

## INÉ VYUŽITIE

- **Matrica – nosič kultivovaných buniek pre prípravu autológnej náhrady kože plnej hrúbky**
- **Nosič pre liečivá s antimikrobiálnou aktivitou**

# **AcelAlo - matrica pre prípravu autológnej náhrady kože plnej hrúbky**

## **1. 3D in vitro kultivácia buniek na komerčných platničkách s inertným sitkom pre bunkové kultúry**

- malá plocha, neumožňuje prípravu veľkých rozmerov, potrebných pre pacientov
- cena

## **2. Metóda kultivácie na sitkách**

- umožňuje kultivácie väčšej plochy
- zariadenie je lacné

# Kultivácia buniek na sitkách

Použitý materiál: **Petriho miska na tkanivové kultúry**

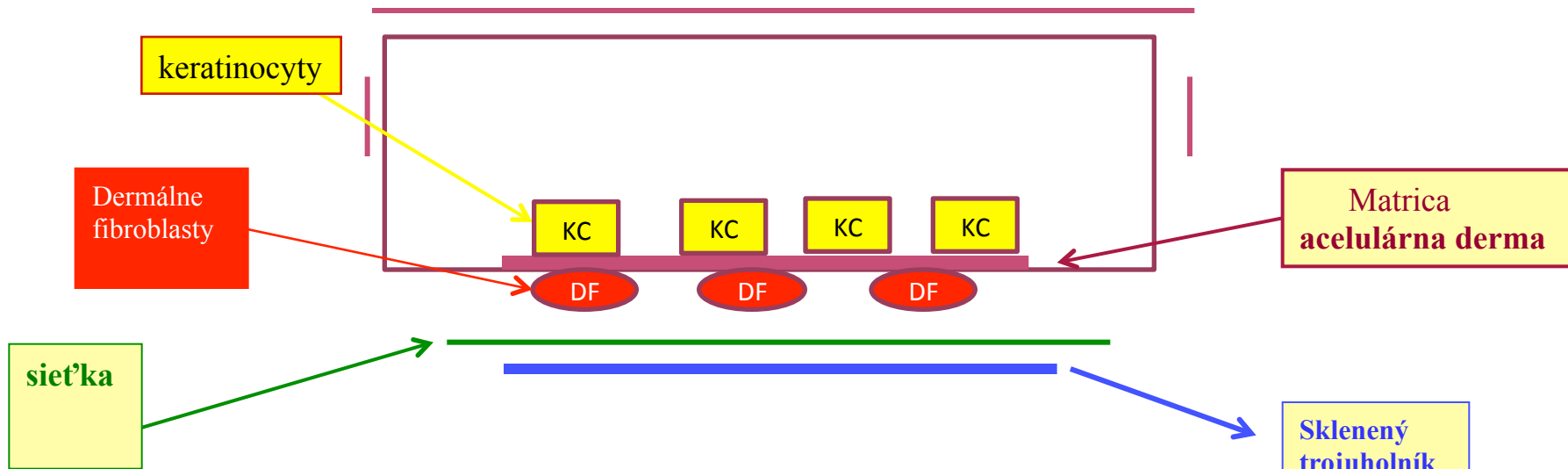
(veľkosť závisí od potrebnej plochy- priemer 6 cm, 10 cm i viac)

**Sklenený trojuholník**

**Sieťka** (non toxic silicone mesh)

**Matrica** (acelulárna aloderma/ xenoderma)

**Bunky:** keratinocyty (KC)/dermálne fibroblasty (DF), MSC)



# AcelAlo – vhodný nosič pre liečivá

Cieľom bolo **impregnovat' AcelAlo antimikrobiálnymi látkami** a sledovať jej **účinnosť** na **in vitro modeloch popáleninových rán kontaminovaných multirezistentnými kmeňmi gramnegatívnych patogénov PSEUDMONAS AERUGINOSA a ACINETOBACTER BAUMANNI.**

## Materiál a metódy:

- a. **In vitro modely popáleninovej rany:** 1. planktonický rast; 2. biofilm
- b. **Topické antimikrobiálne prostriedky:** ACIDUM ACETICUM 1%; Aquitox; Betadine; Kolistin; Octenilin; Prontosan
- c. **AcelAlo** kúsky 5x5 cm, meshované 3:1, 24 hod impregnácia v 100 ml daného roztoku

**NAJVYŠŠIU ÚČINNOSŤ NA SLEDOVANÉ KMENE MALA 1% ACIDUM ACETICUM A TO AKO V PLANKTONICKEJ FORME, TAK AJ V 24 - HODINOVOM BIOFILME.**

# PREDBEŽNÉ VÝSLEDKY II.

**Acelárnna aloderma impregnovaná kyselinou octovou** by mohla byť lacným a účinným doplnkom v popáleninovej chirurgii pri **liečbe rán, kontaminovaných multirezistentnými kmeňmi baktérií.**

Podľa našich predbežných výsledkov je možné **AcelAlo impregnovanú kyselinou octovou použiť súčasne aj na nasadzovanie buniek,** nakoľko kyselina octová **nie je toxická pre bunky.**

To by umožnilo pripraviť **kombinovanú náhradu S DVOMI EFEKTMI SÚČASNE:** **antimikrobiálnym a efektom autológnych buniek**



# PRIMÁRNA REKONŠTRUKCIA PRSNÍKA PO BILATERÁLNA MASTEKTÓMII IMPLANTÁTMI V JEDNOM SEDENÍ



Boháč M; Varga I; Polák Š; Dragúňová J; Fedeleš J; Koller J: Delayed post mastectomy breast reconstruction with allogeneic acellular dermal matrix prepared by a new decellularization method. Cell Tissue Banking 2017, 19(11):1-8

# KAZUISTIKA II.

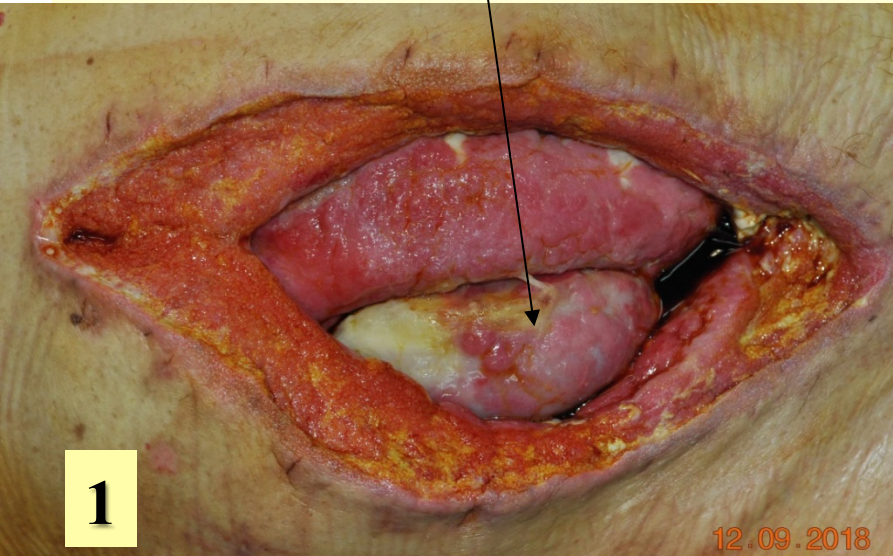
**Sekundárna rekonštrukcia prsníka a dvorca texturovaným implantátom 2 roky po mastektómii**



Boháč et al.2018

# KAZUISTIKA III.

## Záchrana transplantovanej obličky po opakovanej dehiscencii a infekcii laparotomickej rany



### 2 operačné výkony:

1. Debridement, prekrytie obličky xenotransplantátom, NPWT
2. Výmena xenotx za AcelAlo, po mobilizácii okrajov uzáver rany

### 3. Kontrola po 6 mesiacoch

# ZÁVERY I.

- **AcelAlo** do 60 dní po implantácii bolo **rekolonizované autológnyimi bunkami**. (fibroblasty, myofibroblasty a inými typmi – lymfocyty, makrofágy, viacjadrové obrovské bunky, granulocyty, tukové bunky).
- Ešte **rýchlejšie došlo k revaskularizácii AcelAlo**.
- **Lymfatické cievy** (lymphatic vessels) prerastali pomalšie (po 9 mesiacoch detekované iba u jednej z pacientiek), čo naznačuje, **že lymfangiogenéza je pomalší proces, ako angiogenéza**.

Súbor: 22 pacientiek, 26 prsníkov

Boháč M; Varga I; Polák Š; Dragúňová J; Fedeleš J; Koller J: Delayed post mastectomy breast reconstruction with allogeneic acellular dermal matrix prepared by a new decellularization method. Cell Tissue Banking 2017, 19(11): 1-8

# ZÁVERY II.

Bezpečnosť a acelularita produktu AcelAlo, jeho netoxickosť, schopnosť buniek rásť na jeho povrchu, schopnosť byť nosičom pre liečivá, jednoduchosť prípravy a nízka realizačná cena tento materiál predurčujú jednak k použitiu jednak ako matrice pre prípravu plnohodnotnej náhrady kože, jednak pre použitie v klinickej praxi

**ĎAKUJEM ZA POZORNOST**