

616.5-001.17-089.843:615.361

BIOLOGICKÉ KRYTY PRO LÉČBU POPÁLENÝCH - VLASTNÍ ZKUŠENOSTI

¹MUDr. Pavel MĚŘÍČKA, ²pplk. MUDr. Leo KLEIN, CSc., ¹RNDr. Hana STRAKOVÁ, ³MUDr. Martin ŠORMA,

³MUDr. Ladislav PINTÉR, CSc., ³MUDr. Zdena TALÁBOVÁ, ¹Ing. Lubomír VÁVRA

¹Tkáňová ústředna Fakultní nemocnice, Hradec Králové

(ředitel FN: MUDr. I. Drašner)

²Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

(rektor: plk. prof. MUDr. J. Fusek, DrSc.)

³Chirurgická klinika Fakultní nemocnice, Hradec Králové

(přednosta: doc. MUDr. J. Bedrna, CSc.)

Věnováno prof. MUDr. Radaně Königové, CSc. k významnému životnímu jubileu

Kožní banka je součástí Tkáňové ústředny Fakultní nemocnice v Hradci Králové od roku 1953, kdy byl zahájen odběr dermoepidermálních štěpů od zemřelých dárců a jejich konzervace ve vlhké komůrce při teplotě +4 °C. V 60. letech byla zavedena konzervace dermoepidermálních a chorioamniových štěpů lyofilizací, v 70. letech byla tato metoda doplněna o sterilizaci hotových konzerv gama zářením v dávce 25 kGy. Zpočátku banka intenzivně spolupracovala se vznikajícími centry léčby popálených v Praze, Ostravě a Košicích, a to jak účastí na výzkumných projektech, tak zasláním tkáňových konzerv (1, 2). Poté, co si tato pracoviště zřídila vlastní banky, byly štěpy zaslány především na traumatologické oddělení nemocnice v Pardubicích.

Nový impuls pro rozvoj kožní banky přineslo otevření oddělení plastické chirurgie a popálenin v nově vybudovaném Bedrnově pavilonu chirurgických oborů ve FN v Hradci Králové v roce 1985.

Dlouhodobým cílem navázané spolupráce bylo zajistit pro nové pracoviště dostatečné spektrum biologických krytů umožňujících provádění léčebných postupů obvyklých na specializovaných pracovištích popáleninové medicíny. To vyžadovalo rozšířit naši nabídku biologických krytů o různé konzervované alotransplantáty a xenotransplantáty a později zavedení metody kultivace epidermálních keratinocytů. Je všeobecně známo, že definitivní krytí popálené plochy vždy vyžaduje použití autologního štěpu a alotransplantát nebo xenotransplantát může být jen dočasným řešením. Alternativou autotransplantace je krytí popálené plochy kultivovanými autologními keratinocyty (3, 4). Budoucnost zřejmě patří kompozitním štěpům složeným z autologní keratinocytární blány kombinované s alogenním nebo umělým ekvivalentem dermální vrstvy. V této práci podáváme přehled našich zkušeností s přípravou biologických krytů pro různé způsoby aplikace u popálených.

intervalech. Takto byly používány námi připravené lyofilizované alogenní dermoepidermální štěpy, lyofilizované chorioamniové štěpy a xenogenní dermoepidermální štěpy konzervované ve vlhké komůrce nebo při teplotě -80 °C.

Alogenní dermoepidermální štěpy byly odebírány od zemřelých dárců za aseptických podmínek na vlastním odběrovém sále Tkáňové ústředny. Jednotlivé pruhy odebrané dermatomem (Howmet Air Dermatome Howmet Corp. Med. Div., Canada) byly dále zpracovávány v boxu s laminárním prouděním a lyofilizovány v transfučních lahvích metodikou vypracovanou Hegerem (5). Hotové konzervy byly sterilizovány gama zářením v dávce 25 kGy v SVÚT Veverská Bítýška. Před použitím byly štěpy rehydratovány po dobu 20 minut ve sterilním fyziologickém roztoku. Podobným způsobem byly připravovány a používány i chorioamniové štěpy získané z placent odebíraných na porodním sále gynekologické kliniky FN v Hradci Králové.

V tabulce 1 jsou shrnuty údaje o použití těchto štěpů na traumatologickém oddělení v Pardubicích v letech 1982-1985 (6). Celkem bylo použito 3,41 m² štěpů u 32 pacientů.

Tabulka 1

Plocha lyofilizovaných dermoepidermálních a chorioamniových alotransplantátů použitých v letech 1982-1985 na traumatologickém oddělení nemocnice v Pardubicích

Klasifikace	Počet nemocných	Použitá plocha štěpů (m ²)
Lehce popálení	11	0,43
Středně těžce popálení	15	1,01
Těžce popálení	6	1,97
Celkem	32	3,41

Po zahájení spolupráce s nově otevřeným oddělením plastické chirurgie a popálenin v r. 1985 došlo ke značnému nárůstu požadavků na množství krytů používaných jako biologický obvaz. Z tohoto důvodu jsme na našem pracovišti zavedli metodu přípravy a konzervace prasečích xenotransplantátů vypracovanou Moserovou

Metodika, soubor nemocných a výsledky

a) Kryty používané jako biologický obvaz

Při tomto způsobu aplikace se štěpy nenechají přilíhovat a vyměňují se v pravidelných, nejčastěji třídních

a spol. (7). Prasečí krupony jsme získávali v Masokomбинátu Březrad (nyní Salma) a Skaličanu Česká Skalice. Po oholení a dezinfekci kruponu byly štěpy odebírány transplantacním nožem nebo žiletkou Humbyho nože, dekontaminovány v roztoku antibiotik a konzervovány ve vlhké komůrce po dobu 10 dnů při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$. U části štěpů byla prováděna kryokonzervace. Štěpy byly inkubovány v 15% roztoku glycerolu ve fosfátovém ústojném roztoku (PBS) po dobu 2 hodin a poté zmrazovány neřízeně v Petriho miskách uložením do zmrazovacího zařízení o teplotě -70°C až -75°C (NZ 350/75 Frigera Kolín, ČR) (9).

Štěpy byly používány jednak u popálenin II. stupně a vyměňovány, dokud nedošlo ke spontánní epitelizaci, nebo jako dočasný kryt po nekrektomii u popálenin III. stupně. V letech 1986-1991 bylo na spolupracující pracoviště vydáno 120 m² těchto štěpů, z toho 96,5 m² bylo použito ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové (tabulka 2). Průměrná spotřeba štěpů u 1 pacienta hodnocená u souboru 172 popálených (79 dospělých a 93 dětí) je uvedena v tabulce 3.

Tabulka 2

Plocha xenotransplantátů vydaných v letech 1986-1991 (m²)

Rok	Chirur. klinika FN Hradec Králové	Odd. dětské chirurgie FN Hradec Králové	Traumat. oddělení nemocnice Pardubice	Chirur. oddělení nemocnice Nový Bydžov	Chirur. oddělení nemocnice Trutnov	Ostatní	Celkem
1986	7,87	2,39	3,01	-	-	0,15	13,42
1987	8,34	1,24	1,51	0,64	0,75	-	12,48
1988	7,54	8,82	3,83	0,54	-	-	20,73
1989	12,89	4,75	1,32	0,61	0,09	0,32	19,98
1990	11,14	8,72	5,17	2,32	-	-	27,35
1991	11,05	11,77	1,92	0,64	0,77	-	26,15
Celkem	58,82	37,69	16,76	4,75	1,61	0,47	120,10

Tabulka 3

Průměrná plocha xenotransplantátů použitých pro léčbu 1 popáleného (1985-1991)

Klasifikace	Dospělí			Děti		
	počet	plocha m ²	SD m ²	počet	plocha m ²	SD m ²
Lehce popálení	14	0,07	0,04	0	0	0
Středně těžce popálení	32	0,27	0,27	28	0,11	0,11
Těžce popálení	33	1,01	0,67	36	0,67	0,25
Kriticky popálení	0	-	-	29	0,46	0,43

b) Kryty pro dočasnou kožní náhradu

Zatímco při použití štěpů jako biologického obvazu nedochází k přihojení štěpu a tím ani k dočasnému uzavření popálené plochy a nemocný je vystaven nutnosti opakovaných převazů v celkové anestezii, metoda dočasné transplantace kůže tyto nevýhody odstraňuje (8). Rána se přihojením štěpu dočasně uzavře a kryt

se odstraní až před předpokládanou rejekcí. Autotransplantaci pak lze provést na čistou plochu prostou mikrobiální kontaminace. Metoda však předpokládá dostatečnou zásobu vitálních allotransplantátů (konzervovaných hypotermicky nebo kryokonzervovaných). Tyto metodiky jsme zavedli v letech 1986-1987 (9). Odebrané a dekontaminované štěpy byly skladovány buď ve vlhké komůrce při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 dnů, nebo inkubovány v 15% roztoku glycerolu v PBS, poté ukládány do sáčků z laminované fólie a řízeně zmrazovány v kovových kazetách zhotovených ve Výzkumném ústavu potravinářské a chladicí techniky v Hradci Králové. Kazety byly skladovány v kapalném dusíku v kontejnerech IKB 32 STS Říčany. Takto připravené štěpy byly použity u několika rozsáhle popálených pacientů (10).

c) Kultivovaný kožní kryt

Alternativní přístup k léčbě rozsáhlých popálenin představuje použití autologních kultivovaných keratinocytů. Metodiku jsme zavedli v r. 1993 po předchozím školení 2 pracovníků na klinikách v Praze a v Aachenu (SRN) a za finanční podpory IGA MZ ČR (grant IGA MZ ČR č. 1184-2/1992-1993). Ke kultivaci jsme použili modifikovanou metodu podle Greena. Malé kousky kůže (2-4 cm²) byly odebírány Humbyho nožem, skalpelem nebo dermatomem a dopraveny do Tkáňové banky v médiu D-MEM s 10 % bovinního fetálního séra. Zde byla kůže rozřezána na malé proužky o šířce 2-3 mm, trypsinována při $+4^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 hodin. Epidermis byla poté separována od dermis a buňky získané jak z epidermální, tak dermální vrstvy byly naočkovány na ozářenou kulturu 3T3 buněk v množství 1,5 až 3 x 10⁶ buněk na 1 kultivační láhev o ploše dna 80 cm². Buňky byly kultivovány při 37 °C v atmosféře 5% CO₂ v médiu obsahujícím epidermální růstový faktor, dokud nebylo dosaženo subkonfluentní epitelální vrstvy. Transplantabilní (konfluentní) epitelální blány

Tabulka 4

Klinická aplikace kultivovaných autologních keratinocytů

Nemocný	Diagnóza	Datum odběru	Celková doba kultivace (dny)	Datum aplikace	Plocha štěpů (cm²)
I. J., žena 1963	popálenina 42 %	9. 6. 93	18-19	29. 6.	600
		25. 6. 93	24	19. 7.	240
		29. 6. 93	18-20	19. 7.	1140
Celková aplikovaná plocha					1980
V. B., muž 1977	traumatický defekt	29. 9. 94	22	21. 10.	45
M. Ř., muž 1977	Lyellův syndrom	11. 10. 94	20	31. 10.	495
		7. 11. 94	27 +)	7. 11.	360
			21	28. 11.	800
					252
Celková aplikovaná plocha					1907

+) terciární kultura

byly získány ze sekundárních kultur. Před použitím byly blány uvolněny ode dna kultivační misky dispázou, přichyceny na mastný tyl a transportovány na oddělení v Petriho miskách s médiem D-MEM bez séra. Klinická aplikace keratinocytárních blan byla doposud provedena u 3 pacientů, z toho 1 popáleného (tabulka 3). Celková doba kultivace nepřesáhla 24 dnů.

U případu Lyellova syndromu byla použita i terciární kultura získaná za 27, respektive 30 dnů po odběru (tabulka 4). Keratinocytární blány byly použity převážně na pokrytí odběrových ploch, a to s dobrým klinickým efektem.

Diskuse a závěry

Nejvíce zkušeností jsme v uplynulých 10 letech získali s přípravou a aplikací xenogenních dermoepidermálních štěpů (11). Jejich nevýhodou je však vysoká spotřeba štěpů (tabulka 4), která může být enormní za situace hromadné katastrofy. Z tohoto důvodu jsme věnovali stálou pozornost problematice vytvoření dostatečné zásoby těchto krytů (12). Původně používanou metodu kryokonzervace v Petriho miskách jsme v posledních 2 letech nahradili konzervací v sáčcích Steriking (Wipak Medical, Finsko), které jsou řízeně zmrazovány v přístroji Kryo-10 Planer, Velká Británie. Štěpy jsou skladovány při teplotě -80°C v zařízení REVCO ULT 1786, USA, které je proti poklesu teploty zajištěno náhradním chlazením kapalným dusíkem. Nový způsob adjustace štěpů zlepšuje podmínky při rozmrazování (do lázně o teplotě $+37^{\circ}\text{C}$ se vloží celý sáček) a při aseptické manipulaci při použití štěpů. Rovněž jsou značně sníženy nároky na skladovací prostory a tím i na spotřebu energie.

Stejná metodika konzervace a skladování je nyní používána i pro alogenní dermoepidermální štěpy.

Lyofilizované dermoepidermální a chorioamniové štěpy byly používány do poloviny 80. let (2, 6). Přednost byla dávana dermoepidermálním štěpům, neboť chorioamniové se někdy na popálené ploše rozpouštěly (6). Původní metodika lyofilizace v transfuzních lahvích (5) byla nyní nahrazena plošnou lyofilizací štěpů a adjustací v obalu Steriking (Wipak Medical, Finsko). Nespornou předností těchto štěpů je možnost splnit lékopisná kritéria sterility a možnost skladování konzerv při pokojové teplotě. Kliničtí spolupracovníci však většinou dávají přednost vitálním štěpům. V budoucnosti nelze vyloučit opětovné zvýšení zájmu o lyofilizované štěpy, např. v kombinaci s autologním kultivovaným epitelálním krytem.

Značný technologický pokrok pro nás znamenal zavedení metody kultivace autologních keratinocytů. Překážkou jejich použití však může být dlouhá kultivační doba, takže jsme se setkali i s případy, kdy blány byly k dispozici teprve v době, kdy byl pacient již klinicky zhojen. Ke stimulaci hojení popálené plochy lze však použít i kryokonzervované alogenní kultivované

keratinocytární blány nebo blány vypěstované z kryokonzervovaných primokultur (13). Podmínkou použití je opakované sérologické vyšetření dárce na HIV po 180 dnech po odběru.

Hlavním nedostatkem kultivovaných autologních krytů je však absence dermální vrstvy, což omezuje jejich použití u hlubokých popálenin. Dermální komponenta totiž brání tvorbě hypertrofických granulací a současně umožňuje tvorbu normálního dermoepidermálního spojení, které je při použití samotných keratinocytů dlouhou dobu po transplantaci ploché. Pokožka je pak fragilní s tendencí k tvorbě puchýřů (14). Za perspektivní považujeme 2 přístupy jak tento problém překonat. Prvním je metodika popsána Cuonem (15). Na nekrektomovanou plochu se provede klasická dočasná transplantace alogenního dermoepidermálního štěpu. Po jeho přihojení se chirurgicky odstraní pouze epidermis a na takto připravenou plochu se transplantuje kultivovaný kryt. Druhou možností je příprava kompozitního dermoepidermálního štěpu in vitro a jeho následná transplantace. Tato metodika je ve stadiu experimentu na řadě pracovišť, která se problematikou biologických krytů zabývají, a je rovněž tématem jednoho z našich výzkumných programů.

Souhrn

Autoři uvádějí vlastní zkušenosti s přípravou biologických kožních krytů a jejich použitím při léčbě popálených. Nejvíce zkušeností bylo v posledních 10 letech získáno s xenogenními dermoepidermálními štěpy. Lyofilizované alogenní dermoepidermální a chorioamniové štěpy byly používány do první poloviny 80. let. Pro dočasnou transplantaci kůže jsou k dispozici kryokonzervované alogenní dermoepidermální štěpy skladované při teplotě -80°C . Kultivované autologní keratinocyty jsou používány od r. 1993. Příprava kompozitního dermoepidermálního štěpu je ve fázi experimentu.

Literatura

1. KLEN, R. et al.: Experimental Study of Factors Influencing Take and Survival of Human Skin Homografts. *Plast. reconstr. Surg.*, 41, 1968, s. 471-476.
2. KLEN, R. - SKALSKÁ, H.: A Comparison of Dermoepidermal and Chorion-Amniotic Grafts in the Treatment of Burns. *Acta Chir. plast.*, 18, 1976, s. 225-232.
3. GREEN, H. et al.: Growth of Cultured Epidermal Cells into Multiple Epithelia Suitable for Grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1979, s. 5665-5668.
4. KÖNIGOVÁ, R. et al.: First Experiences with Clinical Application of Cultured Auto-epithelium Grafts. *Acta Chir. plast.*, 31, 1989, s. 193-200.
5. HEGER, J.: Lyofilizace tkáňových štěpů pro transplantace. [Kandidátská disertační práce]. Hradec Králové 1973.-Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta.
6. MĚŘÍČKA, P. et al.: Unsere Erfahrungen mit der Anwendung von abiotisch konservierten dermoepidermalen und Chorion-amnion Transplantaten bei Heilung von Verbrennungen. *Probl. Hematol. Transf. Transplant.*, 13, 1986, s. 361-369.

7. MOSEROVÁ, J. - HOUŠKOVÁ, E.: Kožní ztráty a jejich krytí. Praha, Avicenum 1988. 147 s.
 8. BURKE, J. P. et al.: Temporary Skin Transplantation and Immunosuppression for Extensive Burns. *N. Engl. J. Med.*, 31, s. 269-271.
 9. MĚŘÍČKA, P. et al.: Cryopreservation of Dermoepidermal Grafts for Treatment of Burns. In: *Proceedings of the 27th International Congress of Refrigeration, Vienna, Austria, 24.-29. 8. 1987, International Institute of Refrigeration Paris, 1987, s. 1-8.*
 10. KLEIN, L. et al.: Význam léčebného postupu u těžce popálených. *Lék. Zprávy LF UK Hradec Králové*, 35, 1990, s. 41-45.
 11. KLEIN, L. et al.: Xenotransplantace v léčbě popálenin. *Voj. zdrav. Listy*, 58, 1989, s. 196-198.
 12. MĚŘÍČKA, P. et al.: Problems encountered in banking biological covers for treatment of burns. In: *Boeckx, W., Moserová, J.: Progress in burn-injury treatment. Proceedings of the 3rd Congress of the European Burns Association, Prague, October 4-7, 1989, Acco, Leuven, Belgium, s. 85-87.*
 13. STRAKOVÁ, H. et al.: Cultivation of Epithelial Sheets from Cryopreserved Keratinocyte Primocultures. *J. Exp. Clin. Cancer Res., Suppl.*, 14, 1995, s. 99-101.
 14. COMPTON, C. et al.: Skin Regenerated from Cultured Epithelial Autografts from Full Thickness Burn Wound from 6 Days to 5 Years after Grafting. *Lab. Invest.*, 60, 1989, s. 600-612.
 15. CUONO, C. et al.: Composite Autologous-Allogeneic Skin Replacement: Development and Clinical Application. *Plast. reconstr. Surg.*, 80, 1987, s. 626-635.
- Klíčová slova: Kožní banka; Dermoepidermální štěpy; Kryokonzervace; Keratinocyty; Popáleniny.
- Do redakce došlo 4. 9. 1995