

Obsah

Seznam zkratk.....	2
C. Vybrané aplikace tkáňového inženýrství.....	3
1. Kožní kryty.....	4
1.1. Stavba a funkce kůže.....	4
1.2. Hojení ran.....	6
1.3. Komerčně dostupné kožní kryty	7
1.4. Nanovláknenné kožní kryty	9
2. Cévní náhrady	12
2.1. Oběhová soustava	12
2.2. Cévní náhrady v klinické praxi	14
2.3. Nanovláknenné maloprůměrové cévní náhrady.....	17
3. Nanovláknenné materiály pro prevenci pooperačních adhezí.....	21
3.1. Úvod.....	21
3.2. Adheze	22
3.3. Komerčně dostupné produkty pro prevenci adhezí.....	23
3.4. Nanovláknenné materiály pro prevenci adhezí.....	23

Seznam zkratek

PCL	Polykaprolakton
PET	Polyethylentereftalát
PLCL	Kopolymer polylaktidu a polykaprolaktonu
ePTFE	Expandovaný polytetrafluoroethylen
IND	Vzdálenost mezi uzly (internodal distance)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PEO	Polyetylenoxid

C. Vybrané aplikace tkáňového inženýrství

Třetí sekce je věnována aplikacím tkáňového inženýrství, konkrétně byly vybrány nanovlákněné kožní kryty, cévní náhrady, glaukomové drenážní implantáty a gastrointestinální aplikace. Tyto aplikace jsou vyvíjeny na Katedře netkaných textilií a nanovlákněných materiálů. Kapitola ukazuje souhrnný pohled na jednotlivé aspekty tkáňového inženýrství. Na začátku každé kapitoly je popsána stavba nahrazované tkáně, jsou rozebrány konvenčně používané materiály pro danou aplikaci a dále je předloženo možné řešení pomocí nanovlákněných materiálů.

1. Kožní kryty

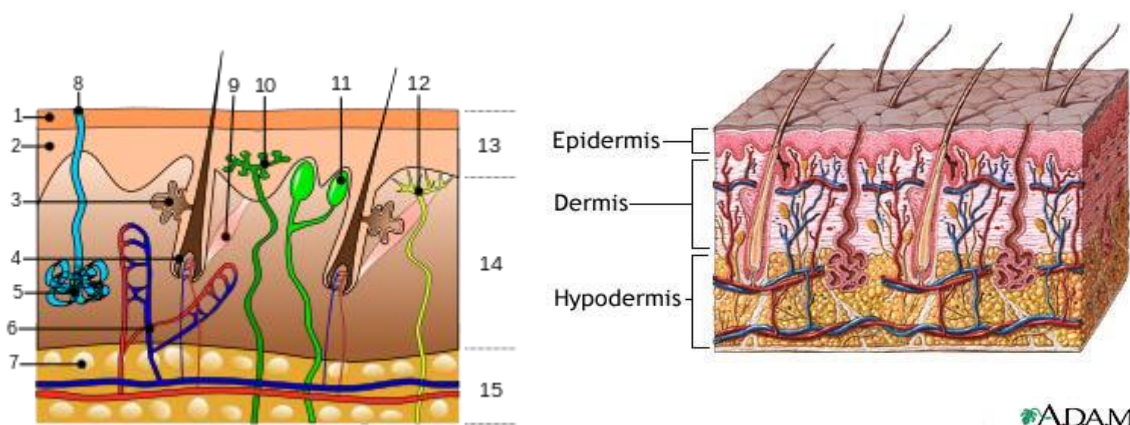
Jana Horáková

Důležité pojmy: funkce kůže, pokožka, škára, podkožní vazivo, akutní / chronické rány, primární / sekundární hojení ran, fáze hojení ran, popáleniny, vlastnosti kožního krytu, hydrogely, hydrokoloidy, algináty, polyuretanové kožní kryty, produkty připravené postupy tkáňového inženýrství, nanovláknenné kožní kryty, NANOTARDIS

1.1. Stavba a funkce kůže

Kůže tvoří souvislý povrch celého těla, tvoří bariéru mezi organismem a vnějším prostředím. Jedná se o největší orgán lidského těla, zaujímá plochu 1,6-1,8 m², tvoří asi 7% celkové hmotnosti člověka. Její tloušťka se pohybuje v rozsahu 0,4 mm (nejtenčí je kůže na očních víčkách, penisu) až 4 mm (nejsilnější vrstva kůže se nachází na zádech).

Kůže plní celou řadu funkcí. Jedná se především o *ochrannou funkci*. Kůže zajišťuje mechanickou bariéru před působením chemických a fyzikálních vlivů a průnikem patogenů. Dále má kůže *smyslovou funkci* díky přítomnosti receptorů reagujících na teplo, chlad, tlak či poranění. Další významnou funkcí je *termoregulace*. Kůže je schopná odvádět teplo prostřednictvím potních žláz a regulací průtoku krve kůží. Na druhou stranu je teplo udržováno díky přítomnosti tuku v podkoží, které má i funkci *skladovací*. Podílí se na *látkové výměně*, umožňuje vstřebání lipofilních látek, tvoří se zde vitamin D. Má také *vylučovací funkci* prostřednictvím potních žláz a apokrinálních žláz, které vylučují chemické pachové signály. Mimo jiné má také *funkci estetickou*.

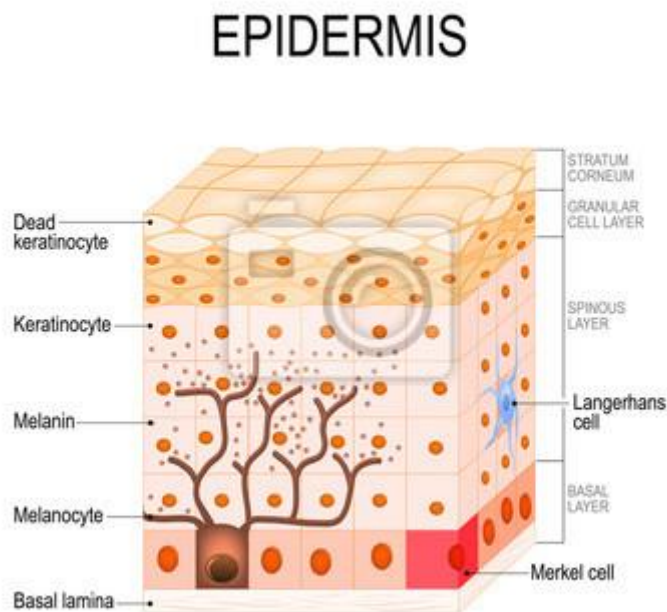


Řez lidskou kůží: 1. rohovitá vrstva; 2. germinativní vrstva; 3. mazová žláza; 4. kořen vlasu, cibulka; 5. potní žláza; 6. cévy; 7. tuková buňka; 8. potní pór; 9. vzpřimovač chlupu. Čidla: 10. bolesti; 11. doteku; 12. tlaku. Vrstvy: 13. pokožka (epidermis); 14. škára (dermis); 15. podkožní tkáň

Obr. 1: Stavba kůže (pokožka, škára, podkožní vazivo).

Kůže je složená ze 3 vrstev, jak je vidět na obrázku 1: **pokožka** (epidermis), **škára** (dermis) a **podkožní vazivo** (hypodermis). **Pokožka** tvoří povrchovou vrstvu kůže. Je tvořena mnohvrstevným dlaždicovitým epitelem o tloušťce cca 0,3-1,5 mm. Její struktura je zobrazena na obr. 2. Obsahuje převážně keratinocyty, v menším zastoupení také pigmentové buňky

melanocyty (5%), imunitní Langerhansovy buňky a mechanoreceptory (Merkelovy buňky). Pokožka je rozdělena do dalších 5ti vrstev, kdy na spodině epidermis se vyskytují keratinocyty s jádrem, v horních vrstvách dochází ke ztrátě buněčného jádra, rohovatění a odumírání buněk. Zrání buněk od bazální membrány k povrchu trvá přibližně 2-4 týdny. Pokožka neobsahuje krevní zásobení, buňky v blízkosti bazální membrány jsou vyživovány difúzí ze škáry.



Obr. 2: Struktura pokožky.

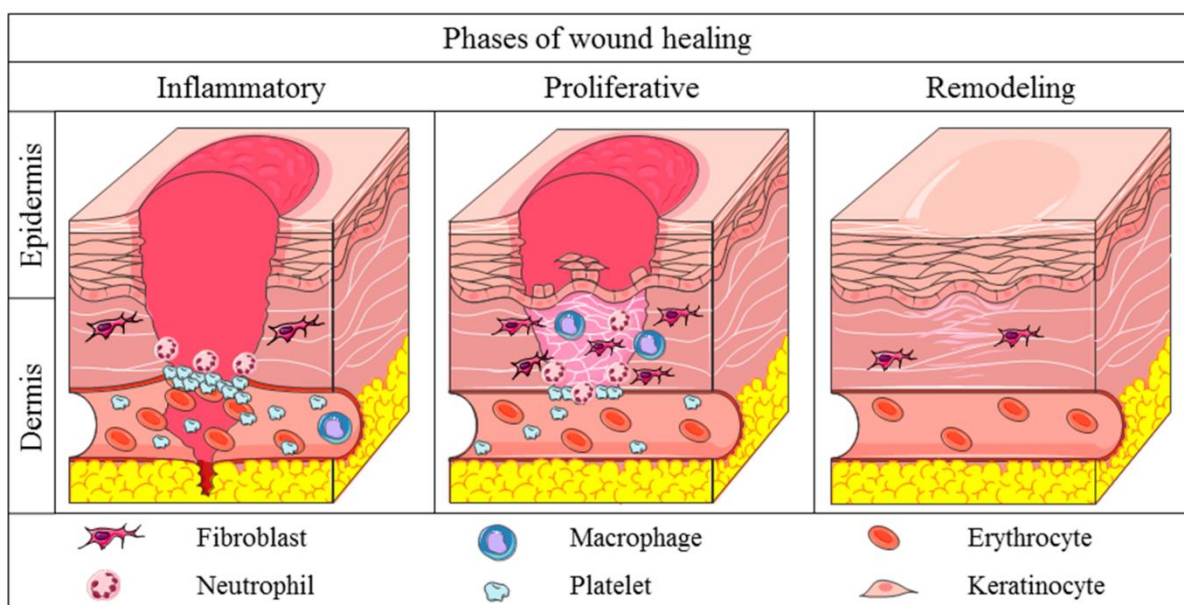
Škára (corium, dermis) je vazivová vrstva kůže, která je oddělená od pokožky zvlněnou bazální membránou (viz obr. 1). Její tloušťka dosahuje přibližně 0,5-2 mm. Obsahuje převážně fibroblasty, které produkují mezibuněčnou hmotu – kolagenní, elastická a retikulinová vlákna. Dále se zde vyskytují buňky imunitního systému (makrofágy – histiocyty, žírné buňky, lymfocyty), krevní cévy, nervy. Ve škáře se vyskytují tzv. Meissnerova tělíska (hmatové receptory přítomné především na prstech a rtech), Krauseho tělíska (receptory chladu), Ruffiniho tělíska (receptory tepla). Dále se zde nachází vlasové folikuly, mazové žlázy, potní žlázy. Škára je rozdělena na 2 vrstvy – povrchová vrstva je elastická, hlubší vrstva je hustší, složená převážně z kolagenních vláken.

Podkožní vazivo (hypodermis, tela subcutanea) je tvořeno převážně řídkým kolagenním vazivem o tloušťce 0,5-10 cm v závislosti na množství tukové tkáně. Podkožní vazivo spojuje kůži s dalšími tkáněmi jako např. svaly, kosti, chrupavky. Vyskytují se zde Vater-Paciniho tělíska, které vnímají dotyk a tlak. Jsou zde uloženy tukové buňky, které slouží jako tepelná izolace a zásobárna energie. Mohou být zdrojem kmenových tukových buněk, které jsou v posledních letech hojně využívány v tkáňovém inženýrství.

1.2. Hojení ran

Kožní poranění jsou definována jako porušení integrity kůže v důsledku fyzikálního, mechanického či termického poškození. Poranění kůže může být klasifikováno podle několika hledisek. Dle průběhu hojení se rozlišují *akutní a chronické rány*. *Akutní rány* vznikají na zdravé kůži, hojí se zpravidla v krátkém časovém úseku (v závislosti na rozsahu poškození) bez vážnějších komplikací. Nejčastější příčinou bývají úrazy či chirurgické zákroky. Jako *chronické rány* se označují rány, které se i přes adekvátní léčbu nelepší po dobu delší než několik týdnů. Příčinou může být infekce rány, celkový zdravotní stav pacienta. Mezi chronické rány patří např. bércové vředy, proleženiny (dekubity).

Další hledisko dělení poranění kůže může být podle způsobu hojení, kde rozlišujeme *hojení primární a sekundární*. *Primární hojení* se uplatňuje u malých ran, kde dochází ke slepení / sešití okrajů rány a nevzniká nová tkáň. Při počátečním poranění dochází k aktivaci krevní srážlivosti, kdy aktivované trombocyty a fibrin zastaví poranění drobných cév. Dále dochází k mírné aktivaci imunitního systému, který zajistí regeneraci vzniklého poškození – dochází k migraci fibroblastů produkujících kolagen, k novotvorbě cévního zásobení. V poslední fázi dojde k reepitelizaci a vznik jizvy. Jako *sekundární hojení* se označuje hojení, které je spojeno s výstavbou nové tkáně, probíhá u rozsáhlých poranění, které bývají komplikovány dalšími přidruženými faktory. Jeho průběh lze rozdělit do 3 fází (čistící, granulační a epitelizační), které jsou zobrazeny na obr. 3. První fáze se označuje jako čistící (zánětlivá) fáze, trvá po dobu několika dní (3-5 dní). Dochází k rozvoji akutního zánětu se všemi příznaky (otok, zarudnutí, bolest, zvýšená teplota). Během této fáze dochází k pokrytí povrchu rány fibrinem. Do rány migrují fagocyty, které odstraňují nežádoucí složky. Další fáze se nazývá granulační, kdy dochází k tvorbě granulační tkáně. Ta je tvořena převážně kolagenem, který je produkován fibroblasty, dochází také ke vzniku nového cévního zásobení. Tato fáze trvá delší dobu (3-24 dní). Granulační fáze probíhá nejlépe ve vlhkém prostředí. Poslední fází je epitelizace, kdy dochází k přerůstání buněk epitelu po nově vytvořené granulační tkáni.



Phases of physiological wound healing. Inflammatory phase: there is the hemostasis of wounded area and acute inflammation through the release of cytokines, growth factors and the migration of leukocytes in the area. Proliferative phase: increase in the migration and proliferation of the keratinocytes, fibroblasts, endothelial cells and leukocytes in the wound. Increase in the synthesis of extracellular matrix components and improve of angiogenesis and re-epithelialization mechanisms. Remodeling phase: extracellular matrix remodeling, with substitution of collagen III for collagen I. Increase in the activity of MMPs. Apoptosis of provisional endothelial cells, fibroblasts, and myofibroblasts of the injury.

Gushiken, L.F.S.; Beserra, F.P.; Bastos, J.K.; Jackson, C.J.; Pellizzon, C.H. Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies. *Life* **2021**, *11*, 665. <https://doi.org/10.3390/life11070665>

Obr. 3: Proces hojení rány (čistící, granulační, epitelizační fáze).

Hojení ran může být komplikováno přítomností mikroorganismů. Z hlediska množství choroboplodných zárodků se rozlišují rány *aseptické, kontaminované a infikované*. *Aseptické rány* jsou čisté rány např. při chirurgických zákrocích, kde je udržováno sterilní prostředí. Běžná poranění jsou pak obvykle tzv. *kontaminovaná*, kde jsou mikroorganismy přítomné, ale nevyvolávají infekci znesnadňující hojící proces. *Infikované rány* jsou kolonizovány mikroorganismy a značně komplikují proces hojení. Infikované rány jsou provázeny hnisavou sekrecí, bolestí, horečkou a prodlouženou dobou hojení.

Specifickým kožním poraněním jsou popáleniny, které mohou být způsobeny nejenom teplem, ale taktéž elektřinou, chemickými látkami či ozářením. Dle závažnosti se dělí do 4 stupňů: popáleniny 1. stupně zasahují pouze pokožku, projevují se zčervenáním kůže. Popáleniny 2. stupně zasahují pokožku a škáru, na kůži je patrné zčervenání s tvorbou puchýřů. Pokud poškození postihne i podkožní vazivo, jedná se o popáleniny 3. stupně. Mají obvykle bílou nebo šedobílou barvu. Nejzávažnější jsou popáleniny 4. stupně, které zasahují i do dalších tkání jako např. svalstvo nebo kost. Mají černé zbarvení. Důležitý je také rozsah poranění, který se měří jako procento celkové plochy těla postiženého popáleninami. Jako lehké popáleniny se označuje poškození < 10 % povrchu těla, jako těžké popáleniny pak > 20 % povrchu těla.

1.3. Komerčně dostupné kožní kryty

Na trhu je k dostání mnoho druhů kožního krytí. Každá rána vyžaduje speciální ošetření, proto je nutná variabilita vlastností produktů. Ideální kožní kryt by měl mít tyto vlastnosti:

- 1) udržování vlhkého prostředí, které podporuje zejména granulační fázi hojení rány
- 2) odvod exsudátu, který v ráně vzniká
- 3) umožnění výměny plynů
- 4) zamezení průniku mikroorganismů, aby nedocházelo ke kontaminaci rány
- 5) snadná aplikace a výměna bez narušení průběhu hojení
- 6) netoxicity
- 7) dostupnost v několika velikostech
- 8) cenová přijatelnost

Kožní kryty se dělí nejčastěji na *primární* a *sekundární* nebo podle typu účinku na *pasivní, aktivní* a *interaktivní*. *Primární krytí* je přímo ve styku s ránou. Někdy je zapotřebí primární krytí fixovat, proto se používá ještě tzv. *sekundární krytí*. Jako ochrana primárního krytí se

často používá gáza. Pokud kožní kryt zajišťuje pouze ochranu poškozeného místa, označuje se jako *pasivní*. Kožní kryty zajišťující vlhké hojení jsou označovány jako *aktivní krytí*. Pokud je v kožním krytu umožňujícím vlhké hojení přítomná ještě další přídavná podpora procesu hojení, jedná se o tzv. *interaktivní krytí*. Může se jednat např. o přítomnost antimikrobiálních látek, látek podporujících tvorbu kolagenu, snižujících tvorbu exsudátu, podporujících epitelizaci rány apod.

V následujícím textu budou přiblíženy některé typy kožních krytů, které se používají v klinické praxi. Jejich výčet není konečný, poslouží však pro základní představu o vlastnostech současně používaných materiálů. Budou zde zmíněné hydrogely, hydrokoloidy, polyuretany, algináty a produkty připravené postupy tkáňového inženýrství.

Hydrogely jsou gelová krytí na bázi hydrofilních polymerů s vysokým obsahem vody. Jsou dostupné buď ve formě polštářků, nebo jako amorfní hmota v tubě. Absorbují nadbytečný exsudát, udržují vlhké prostředí, umožňují transport kyslíku a metabolitů. Musí být často vyměňovány, aby nedocházelo k dehydrataci rány. Při aplikaci hydrogelových krytů je nutnost použití sekundárního krytí.

Hydrokoloidy obsahují hydrofilní koloidní částice ve vnitřní vrstvě a polopropustnou vrstvu z polyuretanu ve vnější vrstvě. Koloidní částice jsou schopné absorpce exsudátu, který se přeměňuje na gel, v ráně je tak udržováno vlhké prostředí. Tato krytí jsou nepropustná pro vodu a plyny. Po vyčerpání absorpční kapacity hydrokoloidního krytí je nutná jeho výměna. Používají se nejčastěji k léčbě proleženin.

Další skupinou materiálů jsou kožní kryty vyráběné z *polyuretanů*. Jsou dostupné buď jako *transparentní filmy*, které umožňují kontrolu hojení díky své průhlednosti. Udržují vlhké prostředí v ráně, jsou voděodolné. Dalším typem materiálů na bázi polyuretanů jsou *semipermeabilní pěny*, které jsou schopné absorbovat exsudát, podporují čištění rány, udržují v ráně vlhké prostředí. Jsou propustné pro plyny, nepropustné pro vodu a mikroorganismy, slouží i jako mechanická ochrana poškozeného místa.

Velmi významnou skupinou jsou kožní krytí na bázi *alginátů*, které jsou vyráběny z mořských řas. Udržují vlhké prostředí v ráně, mají vysokou absorpční schopnost, čímž přispívají k čištění rány. Alginátové kožní kryty lze použít i na infikované rány. Při absorpci exsudátu se vlákna alginátu přeměňují na gel, který zachytává i zbytky odumřelých buněk či mikroorganismy.

Nejnovější skupinou kožních krytů jsou *produkty vyrobené postupy tkáňového inženýrství*, které obvykle obsahují scaffold tvořený polymerem či složkou mezibuněčné hmoty a buňky (keratinocyty, fibroblasty). Jejich nevýhodou je vysoká cena, proto se nepoužívají běžně v klinické praxi. Jako příklad lze uvést produkt ApligrafTM (Organogenesis, Canton, MA), který je složen z kolagenní matrix, fibroblastů a keratinocytů. Dalším produktem je např. DermagraftTM (Advanced Tissue Sciences, LaJolla, CA), který je složen biodegradabilních polyesterů (PGA, PLA) a fibroblastů.

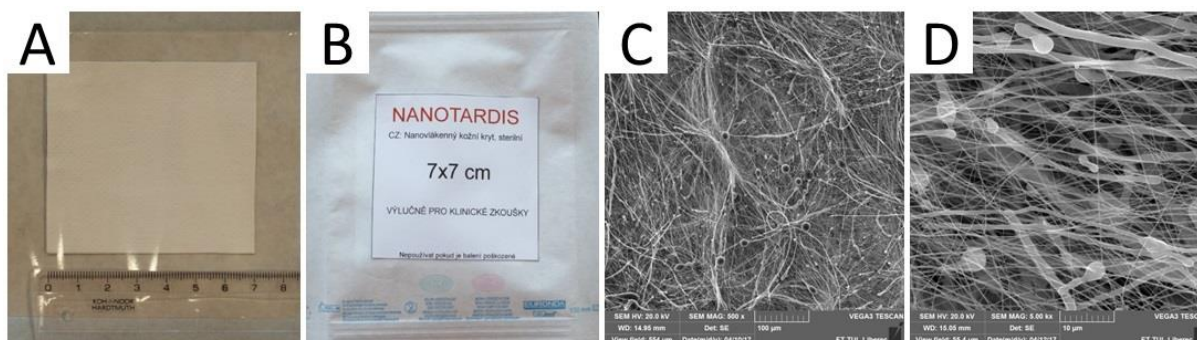
Dalším zajímavým produktem na trhu je Xe-Derma (Apotex). Jedná se o bezbuněčnou prasečí dermis vyrobenou z kožních štěpů, která obsahuje ve své struktuře především kolagen a elastin.

Tento kožní kryt napomáhá hojení díky své struktuře, která je shodná s přirozenou mezibuněčnou hmotou kůže. Díky tomu byla Xe-Derma zvolena jako kontrolní materiál k vyvíjeným kožním krytům na bázi nanovláken, které budou představeny v následující podkapitole.

1.4. Nanovláčenné kožní kryty

Nanovláčenné materiály nachází slibné uplatnění jako kožní kryty díky tomu, že svou morfologií napodobují složení mezibuněčné hmoty, mají velký měrný povrch, vysokou porozitu, vhodné mechanické vlastnosti. Je také možné je nejrůznějšími způsoby funkcionalizovat pro dosažení dalších specifických vlastností kožního krytí.

Nanovláčenné materiály pro léčbu kožních poranění ještě nejsou k dostání na trhu, zatím se jedná pouze o vědecký výzkum, který je však již ve fázi klinických zkoušek. Na TUL se vývojem kožního krytu z nanovláken zabývá již řadu let tým prof. Davida Lukáše, kožní kryt nese název NANOTARDIS (viz obr. 4). Je vyráběn metodou bezjehlového elektrostatického zvláknování z polykaprolaktonu. Pro účely klinických zkoušek byl dodáván o rozměrech 7x7 cm (na základě požadavků lékařů provádějících klinickou zkoušku). Sterilizace probíhala pomocí nízkoteplotního etylenoxidu. Ze zkušeností lékařů pak bylo pozorováno, že zdravotnický prostředek NANOTARDIS se snadno aplikuje na kožní poranění. Adheruje k ráně, postupně dochází k degradaci materiálu. Adheze krycího materiálu k ráně se obvykle považuje za komplikaci, jelikož jsou krycí materiály v klinické praxi nedegradabilní a musí docházet k pravidelné výměně kožního krytí. Při odtržení adherovaného krytu dojde k dalšímu poranění hojící se tkáně a proces regenerace se tak komplikuje a zpožďuje. NANOTARDIS je biodegradabilní materiál, který nemusí být z rány odstraňován. Po vstřebání materiálu do rány je možná jeho opakovaná aplikace. Degradace materiálu probíhá odlišně v závislosti na prostředí rány (pH, přítomnost enzymů).



Obr. 4: Foto balení kožního krytu NANOTARDIS – přední strana (A), zadní strana (B), SEM snímky kožního krytu NANOTARDIS při menším zvětšení (C, měřítko 100 μ ., při větším zvětšení (D, měřítko 10 μ m).

Před zahájením klinické zkoušky bylo nutné provést několik testů dokládajících materiálové vlastnosti a biologickou bezpečnost tohoto nového materiálu. NANOTARDIS byl klasifikován jako tzv. zdravotnický prostředek kategorie IIb, který se dostává do kontaktu s porušenou kůží po dobu delší než 30 dní dle ČSN EN ISO 10993-1. Díky tomuto zařazení byly provedeny následující testy akreditovanými pracovišti:

- Chemická charakterizace byla provedena na základě údajů od dodavatele polymerního materiálu (PCL). Dále bylo provedeno stanovení zbytkových rozpouštědel, které prokázalo jejich nepřítomnost v materiálu.
- Rezidua ethylen oxidu po sterilizaci (dle ISO 10993-7), které nedetekovaly zbytky ethylen oxidu či dalších produktů sterilizace ve zdravotnickém prostředku NANOTARDIS nad předepsanou normu.
- Zkoušky na akutní systémovou toxicitu (dle ISO 10993-11). Z materiálu byly připraveny extrakty ve vodě a v olivovém oleji (60 cm² / 10 ml rozpouštědla, 72 hodin na třepačce), které byly aplikovány do břišní dutiny laboratorních potkanů (1 ml extraktu / 100 g tělesné hmotnosti potkana, n=10). Potkani byli sledováni po dobu 14 dnů, po ukončení experimentu se hodnotila mortalita, tělesná hmotnost a další parametry. Závěrem testování bylo zjištění, že jednorázová aplikace extraktu nezpůsobila akutní systémovou toxicitu u potkanů.
- Test kožní dráždivosti *in vitro* (EpiDermTM Model, dle OECD Test Guideline 439). Byly připraveny extrakty materiálů jako u předchozích experimentů, které byly aplikovány (30 μl) na model tkáně v *in vitro* podmínkách po dobu 60 minut. Hodnotila se buněčná viabilita pomocí MTT testu. Závěrem testování bylo zjištění, že testovaný materiál je považován za nedráždivý pro kůži v *in vitro* podmínkách.
- Zkoušky nitrokožní (intradermální) reaktivity na zvířatech (dle ISO 10993-10). Opět byly připraveny extrakty materiálů stejným způsobem jako v předchozím případě, které byly aplikovány do podkoží králíka (n=3). Po 72 hodinách od aplikace byly hodnoceny kožní projevy jako zarudnutí (erytém), příškvvar či otok (edém). Závěrem testování bylo zjištění, že NANOTARDIS nezpůsobil žádnou negativní kožní reakci u králíků.
- Bakteriální test genových mutací (dle ISO 10993-3). Extrakty materiálů byly přidány k bakteriální suspenzi 2 vybraných kmenů (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*). Tyto bakteriální kmeny jsou za normálních podmínek závislé na dodávce určité aminokyseliny (histidin, tryptofan). Pokud dojde k mutaci genomu bakterií, vzniklý kmen není na dodávce dané aminokyseliny závislý. Testovaný materiál nevyvolal mutaci bakteriálních kmenů.

Kožní kryt NANOTARDIS byl tedy podroben klinickému testování, což je zásadní krok při vývoji zdravotnického prostředku do klinické praxe. V další fázi bude následovat zhodnocení klinické zkoušky a případné další testování (aplikace v kombinaci s dalšími účinnými látkami, modifikovaný kožní kryt apod.).

Vývojem kožních krytů se samozřejmě zabývají i jiné týmy po celém světě. Bylo publikováno několik studií, které popisují využití nanovlákných materiálů pro kožní kryty s využitím syntetických i přírodních polymerů. Nanovlákné materiály lze pro tyto účely také modifikovat přidávkou aktivních látek. V neposlední řadě je zde trend vyvíjet kožní kryty, které by byly aplikovány přímo na ránu (*in situ* konží kryty). Jsou popisovány ruční přístroje, které jsou schopné vyrobit nanovlákný materiál přímo na oblast rány.

Použitá a doporučená literatura:

Ågren M. Wound Healing Biomaterials, Volume 1: Therapies and Regeneration. Woodhead Publishing 2016, ISBN: 978-1-78242-455-0

Krchová S., Dzan L., Lukáš D., Mikeš P., Jenčová V., Horáková J., Pilařová K. Nanovlákná v hojení kožních ran. *Česká dermatovenerologie*, 2014, 4 (4): 234-40.

Abrigo M., McArthur S.L., Kingshott P. Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects. *Macromolecular Bioscience*, 2014, 14 (6): 772-92. DOI: 10.1002/mabi.201300561

Zahedi P., Rezaeian I., Ranaei-Siadat S.O., Jafari S.H., Supaphol P. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers Advanced Technologies*, 2009, 21 (2): 77-95. DOI: 10.1002/pat.1625

Gao Y., Truong Y.B., Zhu Y., Kyratzis I.L. Electrospun Antibacterial Nanofibers: Production, Activity, and In Vivo Applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 2014, 131 (18). DOI: 10.1002/app.40797

Coelho D.S., Velerinho B., Alberti T., Maestri A., Yunes R., Dias P.F., Maraschin M. Electrospinning Technology: Designing Nanofibers toward Wound Healing Application. Nanofibers - from Preparation to Applications. In Clichici S., Filip A., Nascimento G. M. d. (eds.), *Nanomaterials - Toxicity, Human Health and Environment*, IntechOpen, London. DOI:10.5772/intechopen.81530.

Léčba rány [online]. 2023 [cit. 2023-10-30]. Dostupné z: <https://www.lecbarany.cz/>

Horch R.E., Kopp J., Kneser U., Beier J., Bach A.D. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2005, 9(3): 592-608. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00491.x

Mrázová R. Nové typy krytí ran – novinky, použití, aplikace. *Dermatologie pro praxi* 2014, 8(1): 29-32.

Pospíšilová A. Léčba chronických ran moderními krycími prostředky. *Praktické lékařství* 2010, 6(6): 276-81.

Dong R.H., Jia Y.X., Qin Ch. Ch., Zhan L., Yan X., Cui L., Zhou Y., Jiang X., Long Y.Z. *In situ* deposition of a personalized nanofibrous dressing via a handy electrospinning device for skin wound care. *Nanoscale* 2016, 6 (8): 3482-8. DOI: 10.1039/C5NR08367B

2. Cévní náhrady

Jana Horáková

Důležité pojmy: tepny, žíly, vlasečnice, složení cévní stěny (vnitřní, střední, vnější vrstva), endotelové buňky, hladkosvalové buňky, požadavky na cévní náhrady, syntetické cévní náhrady (polyethylentereftalát, polytetrafluorethylen, polyuretan), cévní náhrady vyrobené postupy tkáňového inženýrství, nanovláknenné cévní náhrady

2.1. Oběhová soustava

Kardiovaskulární systém zajišťuje životně důležité funkce – především transport živin, plynů a odpadních látek prostřednictvím krve. Skládá se ze srdce a cév, jedná se o uzavřený systém. V lidském těle cirkulují 2 tělní oběhy – plicní (malý) a tělní (velký). Srdečně-cévní onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí ve vyspělých zemích.

Srdce je dutý svalový orgán, který svými stahy zajišťuje oběh krve organismem. Srdeční stěna je složena z vnitřní vrstvy – endokardu (vazivová blanka pokrytá endotelovými buňkami), myokardu (srdeční svalovina) a perikardu (vazivová blanka obsahující tepny a žíly, tuk). Srdeční sval je zásobován krví z tzv. věnčitých tepen, které odstupují z aorty. Při cévních chorobách mohou být právě tyto cévy poškozeny, což vede k život ohrožujícím komplikacím. Při ischemické chorobě srdeční dochází k částečnému uzavření věnčité tepny, kdy není srdeční sval dostatečně vyživován. Při úplném uzavření věnčité tepny dochází k infarktu myokardu.

Krevní cévy rozvádí krev po těle, dělí se na tepny, žíly a vlasečnice. Tepny (arterie) vedou krev směrem od srdce. Žíly (vény) vedou krev směrem k srdci. Vlasečnice (kapiláry) jsou tenkostěnné jemné cévy, které propojují tepny a žíly.

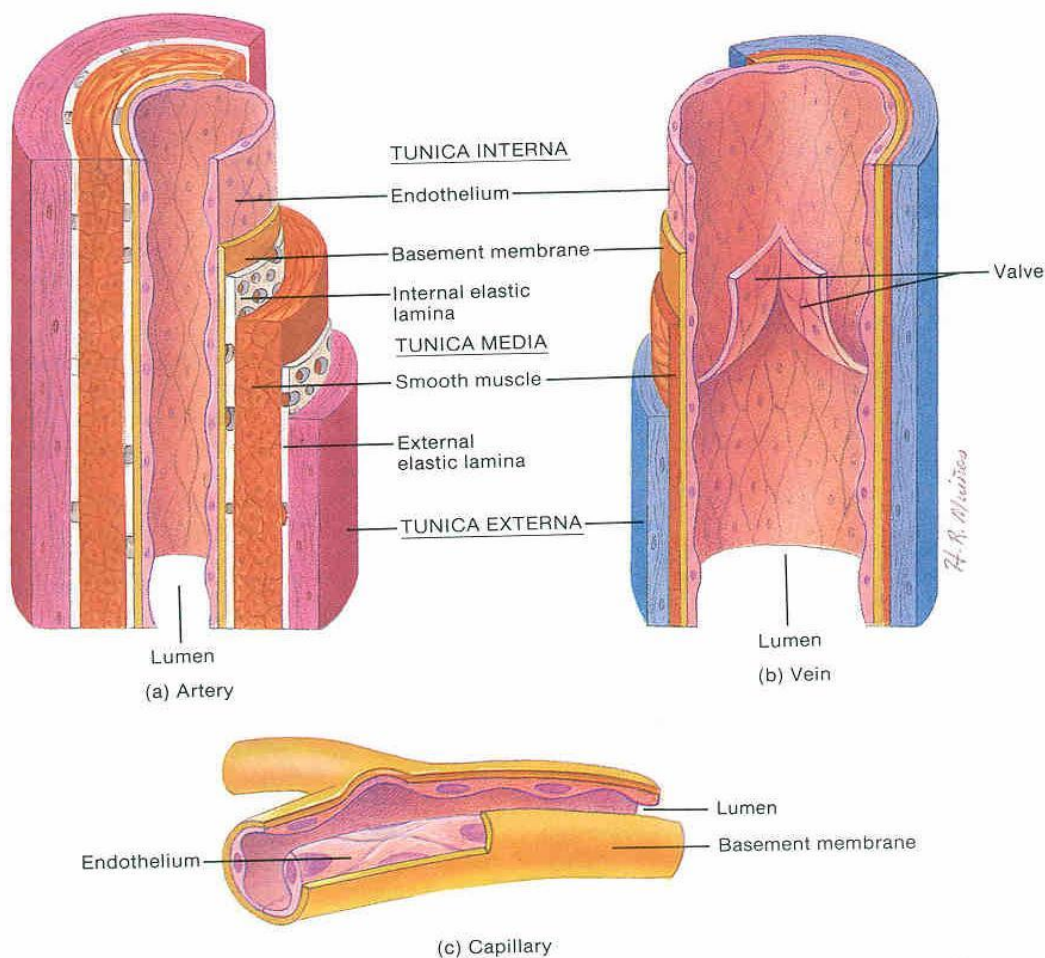
Cévy jsou složeny ze 3 vrstev, jejichž uspořádání a tloušťka je odlišná u tepen a žil (viz obr. 5). Rozlišuje se tzv. vnitřní vrstva (*tunica intima*), která je složena z endotelových buněk, bazální membrány a subendotelového vaziva. Endotelové buňky mají protáhlý tvar ve směru toku krve, vytváří komplexní spoje se sousedními buňkami, takže vytváří spojitou výstelku cévní stěny. Jejich funkcí je udržování homeostázy cévní stěny a krve. Obsahují tzv. Weibel Paladeova tělíska s von Willebrandovým faktorem, který se účastní aktivace krevního srážení. Jedná se o dynamický systém, který reguluje mnoho aktivit uvnitř cévy jako např. propustnost cévní stěny, regulaci průtoku krve (vazokonstrikce, vazodilatace), syntézu faktorů ovlivňujících krevní srážlivost, růstových faktorů, cytokinů, tvorbu mezibuněčné hmoty, regulaci proliferace dalších buněk (zejména hladkosvalových buněk ve střední vrstvě cév), oxidaci lipoproteinů v cévní stěně.

Střední vrstva cév (*tunica media*) je tvořena hladkosvalovými buňkami, které produkují mezibuněčnou hmotu složenou z kolagenních, elastických, retikulárních vláken a proteoglykanů. Hladkosvalové buňky jsou vřetenovité buňky uspořádané do několika vrstev. Elastická vlákna vytváří v některých cévách patrné vnitřní a vnější laminy.

Ve vnější vrstvě (*tunica adventitia*) se vyskytují zejména fibroblasty produkující mezibuněčnou hmotu tvořenou převážně kolagenem. Dále se zde vyskytují adipocyty, nervová zakončení a

cévní zásobení. Tenké cévy jsou vyživovány difúzí z krve proudící v cévě. U silnějších cév (s tloušťkou cca nad 1 mm) probíhá výživa skrz tzv. *vasa vasorum*, což je vlastní cévní zásobení vyskytující se ve vnější a střední vrstvě.

Zastoupení jednotlivých vrstev se liší v různých částech cévního systému. Tepny mají obecně silnější stěnu, jsou pevné a pružné. Ještě se dále rozlišují tepny svalového a elastického typu. Tepny elastického typu se nachází v blízkosti srdce (patří k nim např. aorta a její větve). Jejich funkcí je především distribuce krve do periferie, což je umožněno díky hojnému zastoupení elastických vláken ve střední vrstvě. Tepny svalového typu zásobují jednotlivé tkáně a orgány. Mají zesílenou střední vrstvu v porovnání s vnitřním průměrem tepny, která obsahuje četné hladkosvalové buňky. Ty jsou schopné reagovat na aktuální poptávku krevního toku vyživovaných orgánů. Tepny s průměrem menším než 0,3 cm se nazývají tepénky (*arterioly*). Jsou tvořené vrstvou endotelových buněk na bazální membráně a jednou či několika málo vrstvami hladkosvalových buněk. Nejmenší cévy se pak nazývají vlasečnice (*kapiláry*), jejich průměr je 8-10 μm (odpovídá rozměru červených krvinek). Kapiláry jsou tvořené pouze vrstvou endotelových buněk nasedajících na bazální membránu. Jejich funkcí je předání živin a kyslíku tkáním a naopak odvod zplodin metabolismu a oxid uhličitý z tkání. Kapiláry tvoří rozsáhlé kapilární sítě tak, aby byla zajištěna dostatečná výživa cílových orgánů. Z kapilár krev proudí do žilního systému – menšími žilkami (*venuly*) do větších žil (*vény*), které se sbíhají ve 2 hlavní sběrné žíly – horní a dolní dutá žíla. Stěny žil jsou obecně tenčí, protože nemusí odolávat vysokému tlaku, jako je tomu v tepnách. Vnitřní vrstva žil obsahuje chlopně, které zabraňují zpětnému toku krve. Žilní chlopně jsou tvořené endotelovou výstelkou a vazivem.



Obr. 5: Struktura cévní stěny tepen (A), žil (B) a vlásečnic (C).

2.2. Cévní náhrady v klinické praxi

Při vývoji cévních náhrad je nutné zohlednit všechny požadavky, které jsou na tyto materiály kladené. Testování se musí řídit zákony, konkrétně se jedná o normu ČSN EN ISO 7198 (852929) Kardiovaskulární implantáty a mimotělní systémy – Cévní protézy – Tubulární cévní štěpy a cévní záplaty.

Cévní systém musí v organismu za každých okolností bezpodmínečně fungovat, proto jakákoliv dysfunkce materiálu může způsobit život ohrožující komplikace. V první řadě je nutné zajistit *netrombogenní povrch*. Ten je u nativních cév zajištěn endotelovými buňkami. U cévních náhrad lze zajistit endotelizaci vnitřního povrchu v podmínkách *in vitro*, což je ale poněkud komplikované vzhledem k obtížné dostupnosti zdravých endotelových buněk a jejich nízké proliferační aktivitě. Navíc tento přístup není možný použít u akutních operací. Další možností je příprava materiálu, který by podporoval endotelizaci povrchu *in vivo*, tedy přímo v organismu po implantaci. Endotelizace povrchu cévních náhrad je často popisována u experimentálních zvířat, kde skutečně dochází k pokrytí endotelu a tím zabránění vzniku trombů. U člověka je však schopnost endotelizace značně limitována, lidské tělo je schopné pokryt endotelem pouze malou vzdálenost od vzniklých anastomóz (spojek cévní náhrady s nativní cévou). V praxi se však používají cévní náhrady dlouhé i několik desítek cm. Proto je

nutné zajistit netrombogenní povrch přidavkem vhodných drug delivery systémů např. na bázi heparinu, donorů oxidu dusnatého či dalších látek účastnících se krevního srážení.

Další důležitý požadavek je na *mechanické vlastnosti* cévních náhrad, které by měly napodobovat vlastnosti přirozené cévy. Cévy musí mít dostatečnou pevnost a pružnost při cyklickém namáhání. Dále se u cévních náhrad měří maximální tlak dosažený při roztržení cévní náhrady (burst pressure, jednotky MPa), tzv. poddajnost (compliance, jednotky %/mm Hg) a pevnost švu. Mechanické vlastnosti jsou u nativní cévy zajištěny především složením střední vrstvy. Kolagen zajišťuje pevnost, zatímco elastin roztažitelnost cév. U cévních náhrad je nutné, aby vyvíjené materiály měly podobné mechanické vlastnosti, aby nedocházelo k narušení průtoku krve. U degradabilních materiálů je nutné zohlednit postup degradace, kdy dochází i ke změně mechanických vlastností materiálu.

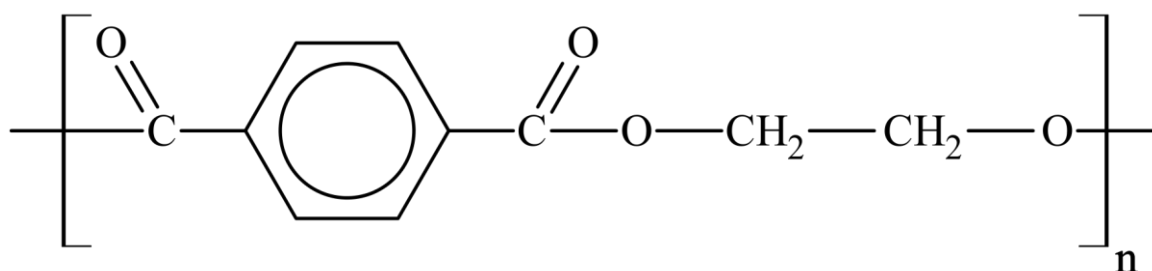
Neméně důležitým aspektem je *rozměr a morfologie cévních náhrad*, který úzce souvisí i s mechanickými vlastnostmi. Cévní náhrada by měla odpovídat svými rozměry (vnitřním průměrem, tloušťkou stěny) nativní cévě. Materiály by tedy měly být vyrobitelné v široké škále velikostí pro konkrétní aplikaci. Materiál by měl být ideálně porézní tak, aby mohlo dojít k infiltraci buněk (hladkosvalových ve střední vrstvě, fibroblastů ve vnější vrstvě) a aby mohlo dojít k remodelaci cévní stěny. V tomto ohledu se v poslední době upřednostňují biodegradabilní materiály, které umožní infiltraci buněk. Degradace by v tomto případě měla probíhat dostatečně pomalu, aby nově infiltrované buňky mohly syntetizovat mezibuněčnou hmotu a postupně tak nahradit degradovaný materiál cévní náhrady. Během celé doby remodelace musí být zajištěny všechny výše zmíněné parametry.

V neposlední řadě je nutné, aby cévní náhrady byly okamžitě dostupné a skladovatelné. Jejich výroba by neměla být finančně příliš náročná. Manipulace s materiály musí být snadná pro kardiochirurgy.

Cévní náhrady se rozdělují podle svého vnitřního průměru na *velkopřůměrové* (vnitřní průměr > 9 mm), *středněprůměrové* (6-9 mm) a *malopřůměrové* (< 6 mm). Největší problém vzniká v klinické praxi u cévních náhrad s malým průměrem, jelikož snadno dochází ke vzniku trombu a ucpaní cévy. Tyto cévní náhrady prozatím nejsou uspokojivě nahrazovány syntetickými protézami. Proto se tkáňové inženýrství zabývá především vývojem malopřůměrových cévních náhrad.

Další hledisko dělení cévních náhrad je podle původu. Jako *biologické* cévní náhrady jsou označovány autogenní či alogenní cévy, které jsou odebírány pacientům. Nejčastěji bývají postiženy koronární tepny srdce, které jsou nahrazovány žilními štěpy z dolních končetin. Biologické náhrady jsou u malopřůměrových cév zlatým standardem v klinické praxi, syntetické protézy zatím nebyly v těchto aplikacích úspěšné. Problémem však bývají například pacienti s aterosklerotickými cévami či pacienti po několika operacích, kdy již nejsou dostupné zdravé žíly. *Syntetické* cévní náhrady jsou rutinně využívány pro náhradu velkopřůměrových cév. Nejčastěji se jedná o protézy na bázi polyetylentereftalátu, expandovaného polytetrafluoroethylenu a polyuretanu. Dále jsou ve výzkumu hojně testovány *cévní náhrady vytvořené postupy tkáňového inženýrství*.

Polyethylentereftalát (PET) je nedegradabilní polyester, jeho chemická struktura je znázorněna na obr. 6. Ve formě vláken je znám pod obchodním názvem Dacron, který začala vyrábět americká firma DuPont. PET je hydrofobní polymer s vysokým stupněm krystalinity. Na trhu jsou k odstání 2 typy cévních náhrad vyrobených z PET - pletené a tkané. Pletené protézy jsou poddajnější a pružnější než tkané náhrady. Jsou více porézní, což zvyšuje riziko krvácení. Proto byly protézy předsráženy krví pacienta před vlastním zákrokem. V posledních letech je snaha o modifikaci pletených protéz pomocí želatiny / kolagenu / albuminu pro snížení propustnosti cévní protézy. Tkané protézy jsou méně propustné než pletené. Jejich nevýhodou je riziko třepení na koncích. Pletené i tkané cévní náhrady se používají pro náhrady velkopřůměrových cév. Po dlouhodobé implantaci byla pozorována dilatace těchto protéz v organismu. Častější je využití pletených protéz.



Obr. 6: Chemická struktura polyethylentereftalátu.

Expandovaný polytetrafluoroethylen (ePTFE) je známý pod obchodním názvem Gore-Tex (patentováno firmou Gore). Cévní náhrady z ePTFE jsou vyráběny litím. Výsledný materiál má specifickou strukturu tvořenou tzv. „uzly“ (nodes), které jsou spojeny vlákny (fibrils). Typická vzdálenost mezi uzly je 30-90 μm (IND internodal distance). Rozlišují se protézy s nízkou porozitou (IND < 30 μm) a s vysokou porozitou (IND > 45 μm). Porozita cévních náhrad z ePTFE je menší v porovnání s dacronovými protézami, díky tomu jsou tyto materiály i méně trombogenní. Novinkou na trhu je povrchová modifikace těchto cévních náhrad pomocí heparinu, který snižuje trombogenicitu materiálu.

Nevýhodou výše zmíněných syntetických cévních náhrad je jejich inertnost, což znamená i minimální interakce s organismem. Nedochozí k regeneraci cévní stěny pomocí osídlení cévních protéz buňkami a následné syntézy mezibuněčné hmoty. Proto se stále hledají nové materiály, které by byly této regenerace schopné. V klinické praxi se prozatím zkoušejí cévní náhrady z polyuretanů, prozatím však nedošlo k jejich rozsáhlejšímu využití.

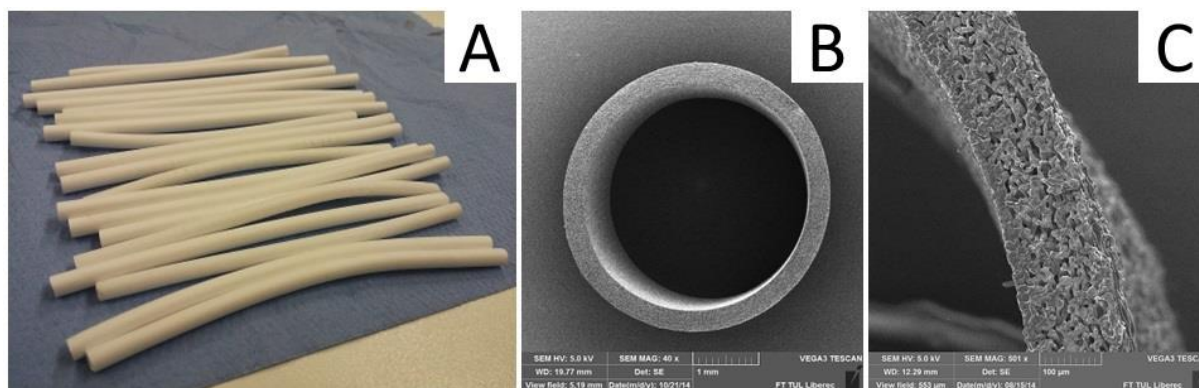
Polyuretany jsou elastické polymery obsahující funkční skupinu [-NH-(CO)-O-]. Polyuretanové cévní náhrady se z hlediska své vnitřní struktury dělí na vláknenné a pěnové. Na trhu neobjevilo již více typů výrobků, z nichž některé musely být staženy kvůli hydrolytické degradaci či oxidaci. Jedná se o novou skupinu materiálů, které jsou nyní podrobovány klinickému zkoušení.

Vývojem malopřůměrových cévních náhrad se zabývá mnoho skupin věnující se tkáňovému inženýrství. Ke konstrukci lze použít všechny zmíněné přístupy uvedené v kapitole Úvod do tkáňového inženýrství. Přístup *in vitro* kombinuje využití buněk (endotelové, hladkosvalové,

kmenové), scaffoldů a bioreaktoru v laboratorním prostředí pro konstrukci funkční cévní náhrady. Endotelové a hladkosvalové buňky mají omezenou proliferační aktivitu, proto se často využívají kmenové buňky, které jsou diferencovány do těchto buněčných linií. Endotelizace vnitřního povrchu zajišťuje v dlouhodobém horizontu průchodnost cévní náhrady, jelikož se jedná o jediný netrombogenní povrch. Endotelizace vnitřního povrchu s využitím bioreaktoru trvá však řádově několik týdnů, proto nemůže být tento přístup využíván v akutních případech. Přístup *in vivo* využívá živého organismu jakožto „bioreaktoru“, ve kterém vzniká samotný scaffold. Tubulární nosič je implantován do organismu (například do podkoží nebo do břišní dutiny), kde se kolem něj vytvoří nová tkáň tvořená obvykle fibroblasty a kolagenem. Tento konstrukt pak může sloužit jako tkáňový nosič. Opět je zde však problém s časovou dostupností takto připraveného materiálu. Okamžitě dostupné jsou grafty připravené přístupem tzv. *in situ* tkáňového inženýrství, které spočívají ve využití tkáňového nosiče bez buněk. Struktura a vlastnosti takového scaffoldu by měly co nejvíce napodobovat složení cévní stěny, aby mohla proběhnout remodelace cévní stěny přímo v organismu.

2.3. Nanovláknenné maloprůměrové cévní náhrady

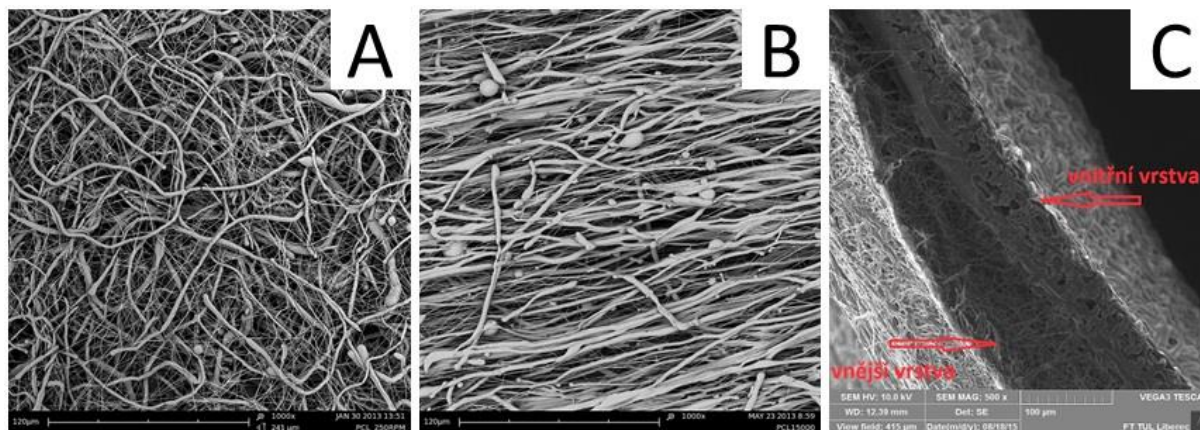
Mezi přístup *in situ* se řadí i nanovláknenné tubulární nosiče, které mohou sloužit jako maloprůměrové cévní náhrady. Na Katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů je prováděn dlouhodobý výzkum těchto tubulárních scaffoldů, převážně na bázi biodegradabilních polyesterů (polykaprolakton PCL, kopolymer poly(laktidu a polykaprolaktonu) PLCL a jejich kombinace). Na obr. 7 jsou snímky elektrostaticky zvlákněného kopolymeru PLCL do podoby tubulárního vzorku, včetně jeho vnitřní struktury.



Obr. 7: Snímky elektrostaticky zvlákněného kopolymeru PLCL: makrosnímek (A), příčný řez tubulárním vzorkem (B, měřítko 1 mm, C, měřítko 100 µm).

Nanovláknenné cévní náhrady mohou být vyráběny pomocí elektrostatického stejnosměrného jehlového i bezjehlového zvláknování (DC), i pomocí střídavého zvláknování (AC). Uspořádání zařízení se liší pouze typem kolektoru, kterým je rotující tyč o příslušném průměru (obvykle 3-6 mm). Délka tubulárního scaffoldu se odvíjí od rozměrů kolektoru, v praxi jsou požadovány cévní náhrady několik desítek centimetrů dlouhé. Problém nebývá s výrobou takto dlouhých tubulárních scaffoldů, ale s jejich následným sundáváním z kolektoru. Prozatím bylo docíleno maximální délky dosahující kolem 20ti centimetrů. Dále je možné řídit tloušťku stěny cévní náhrady dobou zvláknování. Tloušťka stěny by měla ideálně odpovídat tloušťce nahrazované cévní stěny při zachování shodných mechanických vlastností. Při vyšších otáčkách

kolektoru je možné docílit orientace vláken, jako je tomu ve střední vrstvě nativní cévní stěny. Na snímku 8A je zobrazen elektrostaticky zvlákněný polykaprolakton při 250 otáčkách za minutu (rpm), na obr. 8B je stejný polymer zvlákněn na kolektor s vyššími otáčkami 15 000 rpm. Elektrospinningem lze docílit i vrstevnaté struktury, která napodobuje strukturu a vlastnosti cévní stěny. Byly testovány různé kombinace biodegradabilních polymerů, na obr. 8C je znázorněn tubulární graft tvořený kopolymerem PLCL ve vnitřní vrstvě a polykaprolaktonem ve vnější vrstvě.



Obr. 8: Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie elektrostaticky zvlákněného polykaprolaktonu na tubulární kolektor (A, B, měřítko 120 μm) při nízkých otáčkách 250 rpm (A) a při vysokých otáčkách 15 000 rpm (B). Snímek dvouvrstvého tubulárního graftu tvořený kopolymerem PLCL ve vnitřní vrstvě a polykaprolaktonem ve vnější vrstvě (C, měřítko 100 μm).

Vnitřní vrstva by měla zajišťovat endotelizaci po implantaci do krevního řečiště a být ideálně minimálně trombogenní. Trombogenicita je u nanovláken velkým problémem díky velkému měrnému povrchu těchto materiálů. Pro snížení trombogenicity materiálu je pak možné využít vhodný drug delivery systém. Pro tento účel byla testována např. inkorporace heparinu či látek uvolňujících oxid dusnatý (L-Arginin, S-nitrosothioly). Střední vrstva by měla zajišťovat především mechanické vlastnosti cévní náhrady, ideálně s preferenční orientací a dostatečnou porozitou pro infiltraci hladkosvalových buněk, které zajistí produkci mezibuněčné hmoty. Vnější vrstva nebyla v našich experimentech nahrazována, jelikož se předpokládá její samovolná regenerace v organismu. Vnější vrstva je tvořena fibroblasty, které migrují do okolí cévní náhrady a zajistí tak napojení na další tkáň v okolí.

Otázka vývoje ideální cévní náhrady v klinické praxi doposud není vyřešená, jelikož se jedná o velmi komplexní, život ohrožující problém. Na této aplikaci lze názorně demonstrovat multidisciplinaritu tkáňového inženýrství. Lékař určuje požadavky na materiál a vlastnosti cévních náhrad, provádí implantace vyvíjených materiálů, hodnotí práci s cévní náhradou a případně dává další podněty pro zlepšení vlastností. Materiálový inženýr navrhuje, vyrábí a testuje cévní náhrady. Do testování je obvykle zahrnut i chemik, který analyzuje chemickou strukturu polymeru, povrchové vlastnosti materiálu a jeho degradaci a dále biolog, který provádí *in vitro* testování scaffoldů (pro aplikaci cévních náhrad se využívají endotelové buňky, hladkosvalové buňky i fibroblasty, trombocyty a další krevní elementy). Na testování se také významně podílí biomechanik, který vyhodnocuje mechanické vlastnosti cévních náhrad

(tahové zkoušky, cyklické namáhání, poddajnost, pevnost švu apod.). Po základním materiálovém a *in vitro* testování se přistupuje k *in vivo* testování (potkani, králíci, prasata), kde je zapotřebí *zvěrolékař*, který připravuje zvířata na provedení implantace materiálu a dále zajišťuje jejich ošetřování během experimentu. Po ukončení experimentu je nutná spolupráce *histologa*, který zpracuje a vyhodnotí interakci biomateriálu s organismem, u cévních náhrad se zjišťuje zejména endotelizace vnitřního povrchu, zastoupení hladkosvalových buněk ve střední vrstvě cévní stěny, produkce mezibuněčné hmoty (kolagen, elastin), remodelace cévní stěny, případně nežádoucí jevy jako tvorba trombu, kalcifikace cévní stěny a další. V neposlední řadě je vhodné všechny experimenty konzultovat se *statistikem*. Zejména pokusy *in vivo*, které se musí řídit principem 3R, je vhodné diskutovat se statistikem, aby bylo použito co nejméně zvířat, avšak aby bylo dosaženo správného závěru provedené studie.

Použitá a doporučená literatura:

Yalcin I., Horakova J., Mikes P., Gok Sadikoglu T., Domin R., Lukas D. Design of Polycaprolactone Vascular Grafts. *Journal of Industrial Textiles* 2016, 45: 813-833. DOI: 10.1177/1528083714540701

Yalcin Enis I., Horakova J., Gok Sadikoglu T., Novak O., Lukas D. Mechanical investigation of bilayer vascular grafts electrospun from aliphatic polyesters. *Polymers for Advanced Technologies* 2017 201-13. DOI: 10.1002/pat.3875

Horakova J., Mikes P., Lukas D., Saman A., Jencova V., Klapstova A., Svarcova T., Ackermann M., Novotny V., Kalab M., Lonsky V., Bartos M., Rampichova M, Litvinec A., Kubikova T., Tomasek P., Tonar Z. Electrospun vascular grafts fabricated from poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) used as a bypass for the rabbit carotid artery. *Biomedical Materials* 2018, 13. DOI: 10.1088/1748-605X/aade9d

Horakova J., Mikes P., Saman A., Jencova V., Klapstova A., Svarcova T., Ackermann M., Novotny V., Suchy T., Lukas D. The effect of ethylene oxide sterilization on electrospun vascular grafts made from biodegradable polyesters. *Materials Science and Engineering: C* 2018, 92: 132-42. DOI: 10.1016/j.msec.2018.06.041

Horakova J., Mikes P., Saman A., Svarcova T., Jencova V., Suchy T., Heczko B., Jakubkova S., Jirousova J., Prochazkova R. Comprehensive assessment of electrospun scaffolds hemocompatibility. *Materials Science and Engineering: C* 2018, 82: 330-5. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.011

Singh Ch., Wong C.S., Wang X. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *Journal of Functional Biomaterials* 2015, 6: 500-25. DOI: 10.3390/jfb6030500

Vindigni V., Abatangelo G., Bassetto F. New Developments in Tissue Engineering of Microvascular Prosthesis. *Biomaterials Science and Engineering*, 2011, ISBN 978-953-307-609-6

Chlupáč J., Filová E., Bačáková L. Cévní protézy: 50 let vývoje od syntetických k tkáňovému inženýrství a buněčné terapii. *Rozhledy v chirurgii* 2010. 89 (1): 85-94.

Li S., Sengupta D., Chien S. Vascular tissue engineering: from *in vitro* to *in situ*. Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine 2014, 6 (1): 61-76. DOI: 10.1002/wsbm.1246

3. Nanovláknenné materiály pro prevenci pooperačních adhezí

Markéta Klíčová

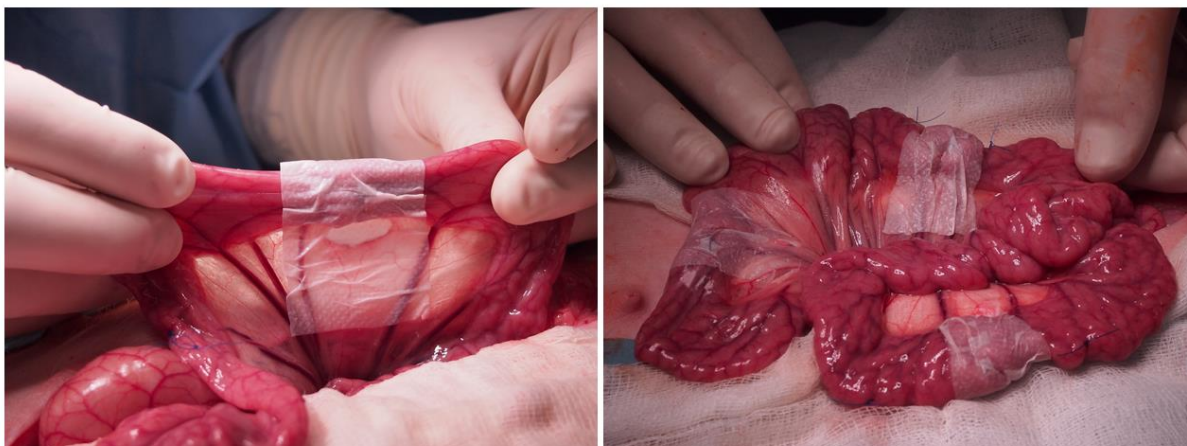
Důležité pojmy: pooperační adheze, gastrointestinální anastomóza, hydrofilní/hydrofobní nanovláknna, jehlový/bezjehlový electrospinning

3.1. Úvod

Z předchozích kapitol je zjevné, že tkáňové inženýrství přesahuje do mnoha oblastí biomedicínského výzkumu. Od jeho založení uběhlo již téměř 30 let a zájem o produkty výzkumu a vývoje v této oblasti stále roste. Pozornost pramení z tendence efektivně zvyšovat kvalitu lékařské péče, nabídnout pacientům nové možnosti léčby a především řešit nedostatek orgánů pro transplantaci. Rostoucí zájem přirozeně vyústil v nové možnosti aplikace nanovláknenných materiálů, na které jsou však kladeny stále vyšší požadavky.

Jednou z naléhavých potřeb posledního desetiletí je vyvinout funkční biomateriál, který by úspěšně zabránil vzniku nežádoucích pooperačních adhezí tkání, které vznikají vlivem operačního zákroku, infekce, traumatu nebo ozáření. Tkáňové adheze (neboli srůsty) tvoří nepřirozené tkáňové spojení (mosty) mezi orgány, které nejsou fyziologicky (tzn. normálně, běžně) propojeny. Klinicky je tento problém nejzávažnější v gastrointestinální chirurgii, kde se tvoří srůsty mezi střevními kličkami i dalšími břišními orgány, a dále v muskuloskeletální chirurgii, při operacích pánevního dna, operacích pobřišnice (peritonea) nebo gynekologických zákrocích. Adheze následně vedou k širokému spektru komplikací, od mírných potíží, jako je abdominální diskomfort, až po silné bolesti břicha a gastrointestinální obstrukce (neprůchodnost) nebo výrazné omezení pohyblivosti končetin (srůsty šlach). Mnohé z těchto stavů je nutné znovu chirurgicky léčit. Bohužel tyto pooperační komplikace nejsou vzácné, ale běžně ovlivňují životy pacientů po zmíněných operačních zákrocích.

Nedostatek komerčně dostupných materiálů pro účinnou a bezpečnou prevenci adhezí vedl k požadavkům na vývoj nových biomateriálů. Tyto požadavky pochází přímo od lékařů z klinické praxe, kterým takový materiál chybí. Chirurgické spojky na střevech po operacích jsou prováděny již více než 200 let, přesto však pacienti stále trpí na závažné komplikace, které mohou vést k neprůchodnosti střev, poruchám střevní pasáže, neplodnosti, opakované operaci a výrazně snižují kvalitu života po operaci. Jednou z nových možností prevence vzniku pooperačních adhezí je použití biodegradabilních nanovláknenných materiálů, které mohou být aplikovány kolem chirurgické střevní spojky, jak je ukázáno na Obr. 9. Tyto materiály by měly být z jedné strany (vnitřní) tzv. pro-adhezivní, to znamená, že by měly dobře přilnout ke střevní tkáni a naopak z druhé strany (vnější) je potřeba zajistit anti-adhesivní povrch. Materiál by tak měl z jedné strany vykazovat dobrou přilnavost ke tkáni a ulpívat na chirurgické střevní spojce, aby nedocházelo k dislokaci. Naopak z druhé strany materiálu je nutné zajistit antiadhesivní vlastnosti, aby nedocházelo k přirůstání tkáně v okolí chirurgické střevní spojky.



Obr. 9: Aplikace biodegradabilních materiálů na bázi polykaprolaktonu kolem gastrointestinální anastomózy. Test na velkém zvířecím modelu (prase). Materiály byly vyvinuty na Katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů, TUL. Snímky patří autorům skript.

3.2. Adheze

Nežádoucí břišní adheze patří mezi nejčastější komplikace po chirurgickém výkonu. K tvorbě adhezí (srůstů) dochází v časném pooperačním období, nejkritičtější období je 3–5 dní po operaci. Pooperační srůsty jsou výsledkem reakce organismu na chirurgický zákrok, mohou být příčinou bolesti, ucpání tenkého střeva nebo dokonce neplodnosti u žen. Ty je třeba řešit, často chirurgicky, a mohou významně ovlivnit kvalitu pacientova života. Frekvence peritoneálních srůstů v břišní chirurgii se pohybuje kolem 55–66 %, s ještě vyššími počty (90 %) u pacientů, kteří podstoupili předchozí operace. Incidence (7–9 %) perikardiálních adhezí je pozorována po operacích srdce a operace šlach také často komplikují adheze (16–27 %).

Adheze vznikají činností fibroblastů a jejich proliferace, koagulace a ukládání fibrinu především v místech, kde došlo ke krvácení nebo zánětu. Při srážení krve se tvoří bílkovinná vlákna zvaná fibrin. Následně v pooperačním období dochází k degradaci fibrinu v důsledku fibrinolýzy. Když však fibrinolýza není úplná, může fibrin vytvářet tzv. mosty mezi normálně nespojenou tkání a dochází k těžkým srůstům. Tato vazivová spojení se mohou v týdnech po operaci velmi zpevnit a mohou se v nich vytvořit krevní cévy a nervová vlákna. Léčba již vytvořených adhezí je nákladná a časově náročná, což vede k prodlouženým pobytům v nemocnici a potenciálně zhoršené kvalitě života pacientů. Pozornost je tak pochopitelně věnována metodám prevence vzniku pooperačních adhezí s výsledným zaměřením na vývoj nových materiálů.

Jeden z nových přístupů k prevenci nežádoucích peritoneálních srůstů vznikl počátkem tohoto století společně s rozvojem nanotechnologií a zejména využitím nanovláken pro lékařské účely. Planární nanovláknenné vrstvy lze použít jako bariérové materiály, které tvoří rozhraní mezi poškozeným/operovaným orgánem a okolní tkání v lidském těle. Nespornou výhodou nanovláknenných materiálů je nejen jejich potenciální biologická rozložitelnost, která vede k eliminaci dodatečných operací při odstraňování materiálu, ale také jejich podobnost s extracelulární matrix. Nanovláknenné materiály mohou tak podporovat hojení poškozené tkáně, které lze dále urychlit zabudováním účinných látek do nanovláknenných vrstev. Z posledních

výzkumů se např. ukazuje jako užitečné použít nanovláknennou vrstvu jako nosič antibiotik, které zabraňují množení bakterií v okolí střevní chirurgické spojky. Tyto bakterie totiž produkují enzymy kolagenázy, které štěpí nově vznikající kolagen (nově vytvořenou tkáň střeva), což dále vede k netěsnosti chirurgické spojky, potenciálnímu úniku obsahu střev do dutiny břišní, vzniku zánětu, který opět může podpořit vznik adhezí.

3.3. Komerčně dostupné produkty pro prevenci adhezí

Aktuálně neexistují komerčně dostupné materiály pro lokální krytí střevních anastomóz, které by preventovaly výskyt anastomotického leaku¹ a peritoneálních adhezí. Vzhledem k tomu, že obě komplikace jsou velmi závažné, probíhá intenzivní celosvětový výzkum materiálových řešení a byla tak testována celá řada produktů. Mezi nejvíce hodnocené materiály patří fibrinové patche a tkáňová lepidla. Na trhu existuje například produkt Tachosil®, kolagenová náplast, která slouží jako matrice pro tkáňové lepidlo a další aktivní složky. Ve studii od Nordentoft *et al.* byl Tachosil® prokázán jako bezpečný pro krytí střevních anastomóz, nicméně výsledky neukázaly žádný účinek v prevenci úniku obsahu střev nebo střevních adhezí.

Tkáňová lepidla mohou být na bázi kyanoakrylátu, glutaraldehydu, fibrinu a polyethylenoxidových hydrogelů. Tyto přípravky vykazují nevýhody v podobě vysoké ceny, komplikované přípravy pro chirurgy či dokonce riziko toxicity *in vivo*. Chirurgické anastomózy lze kromě různých šicích technik spojovat i za použití staplerů neboli chirurgického svorkovače. Pro snížení krvácení po použití staplerů byl na trh uveden produkt s komerčním názvem Gore® Seamguard®, produkt slibuje rovněž snížení výskytu anastomotického leaku. Struktura Gore® Seamguard® je na bázi syntetického kopolymeru kyseliny polyglykolové a trimethyl-karbonátu. V největších randomizovaných studiích se však neprokázal pokles v incidenci úniku obsahu střev a lepšího pooperačního hojení při použití fibrinových lepidel či Gore® Seamguard®.

Další často používané materiály pro tvorbu lokální antiadhesivní bariéry fungují na bázi kyseliny hyaluronové a jsou používány při gynekologických operacích. Avšak na základě literární rešerše a konzultace s klinickými lékaři nebyly tyto materiály schváleny pro použití na tenkém a tlustém střevě. Produkt Seprafilm™ (Genzyme, Cambridge, MA), který je vyroben z kyseliny hyaluronové a karboxymethylcelulózy, je na základě názorů některých lékařů příliš křehký a rychle degradabilní. Produkt Interceed™ (Gynecare, Somerville, NJ) na bázi celulózy může pomoci snížit adheze, nicméně výskyt krve je kontraindikací pro použití a krev musí být plně odstraněna před aplikací, což komplikuje chirurgický proces. Všeobecně řečeno, komerčně dostupné produkty zatím nejsou schopny spolehlivě zabránit peritoneálním adhezím.

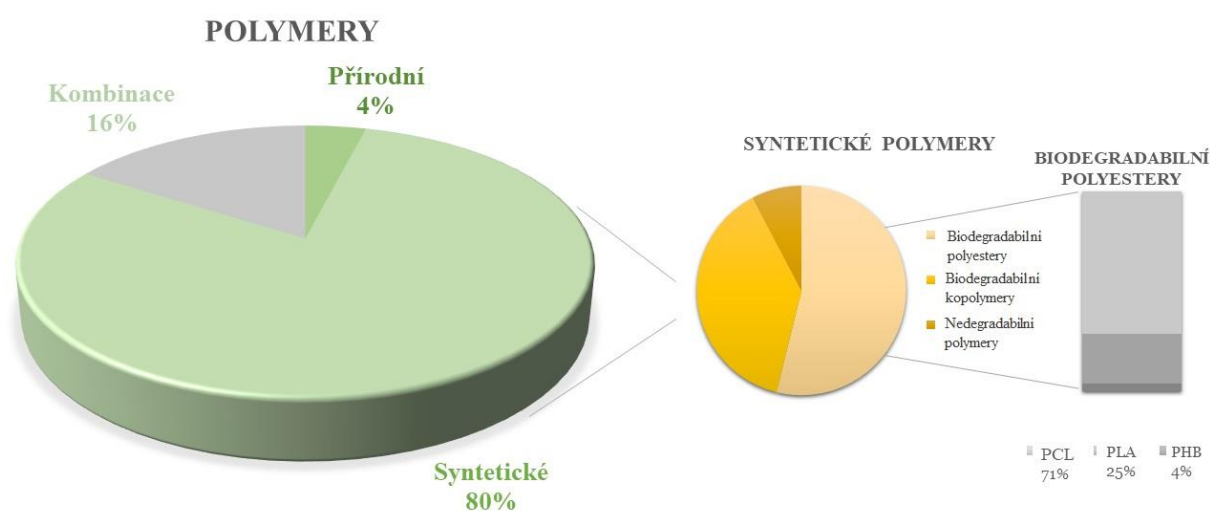
3.4. Nanovláknenné materiály pro prevenci adhezí

V aktuální vědecké literatuře je patrný velký zájem o vývoj nanovláknenných vrstev pro tyto aplikace. Všeobecně lze vyvíjené nanovláknenné materiály rozdělit na jednovrstvé (1) a vícevrstvé (2) struktury. Jednovrstvé materiály lze dále rozdělit na nanovláknenné materiály bez

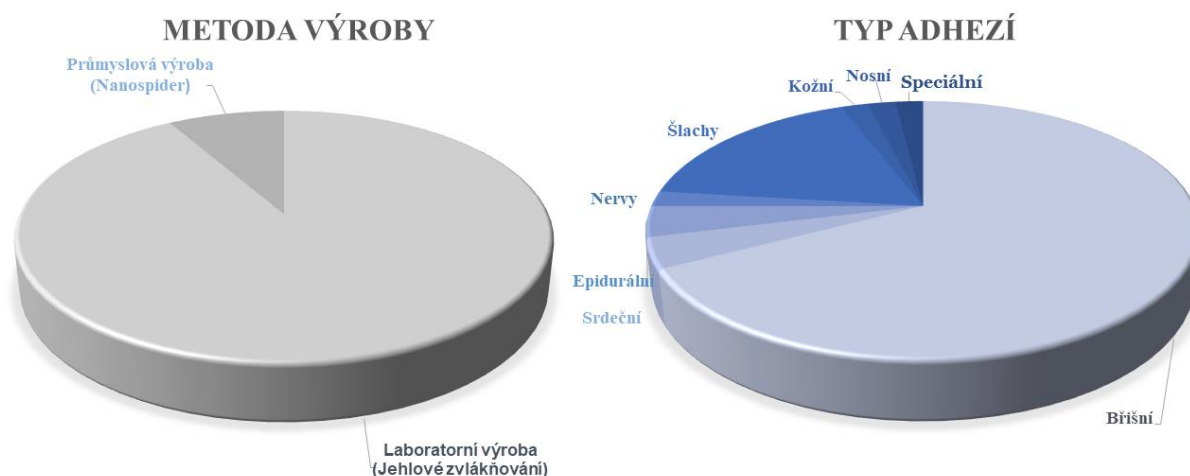
¹ anastomotický leak - únik obsahu střev do dutiny břišní

funkcionalizace (a), nanovlákna obohacená chemickými/přírodními látkami (b), hydrofilní struktury (c), hydrofóbní struktury (d) nebo lubrikační nanovlákna (e).

Z aktuální vědecké literatury je také zřejmé, že nejvíce se používají syntetické polymery a z nich jsou vybírány biodegradovatelné polyestery, přičemž hlavní roli hraje polykaprolakton. Obr. 10 znázorňuje procentuální využití jednotlivých polymerů pro tento vývoj. Nejvíce používanou metodou pro výrobu těchto materiálů je jednoznačně elektrostatické zvlákňování. Z analyzovaných článků použilo laboratorní jehlové zařízení 92 % výzkumů, a to i přes určitá omezení a riziko nízké opakovatelnosti a homogenity produktu (viz Obr. 10). Lze vidět, že tendence k prevenci břišních pooperačních adhezí je nejvýraznější, 67 % recenzovaných výzkumů se zaměřuje na komplikace po břišních operacích. Intenzivně jsou studovány i prevence srůstů šlach, 17 % výzkumů je zaměřeno na toto téma (Obr. 11).

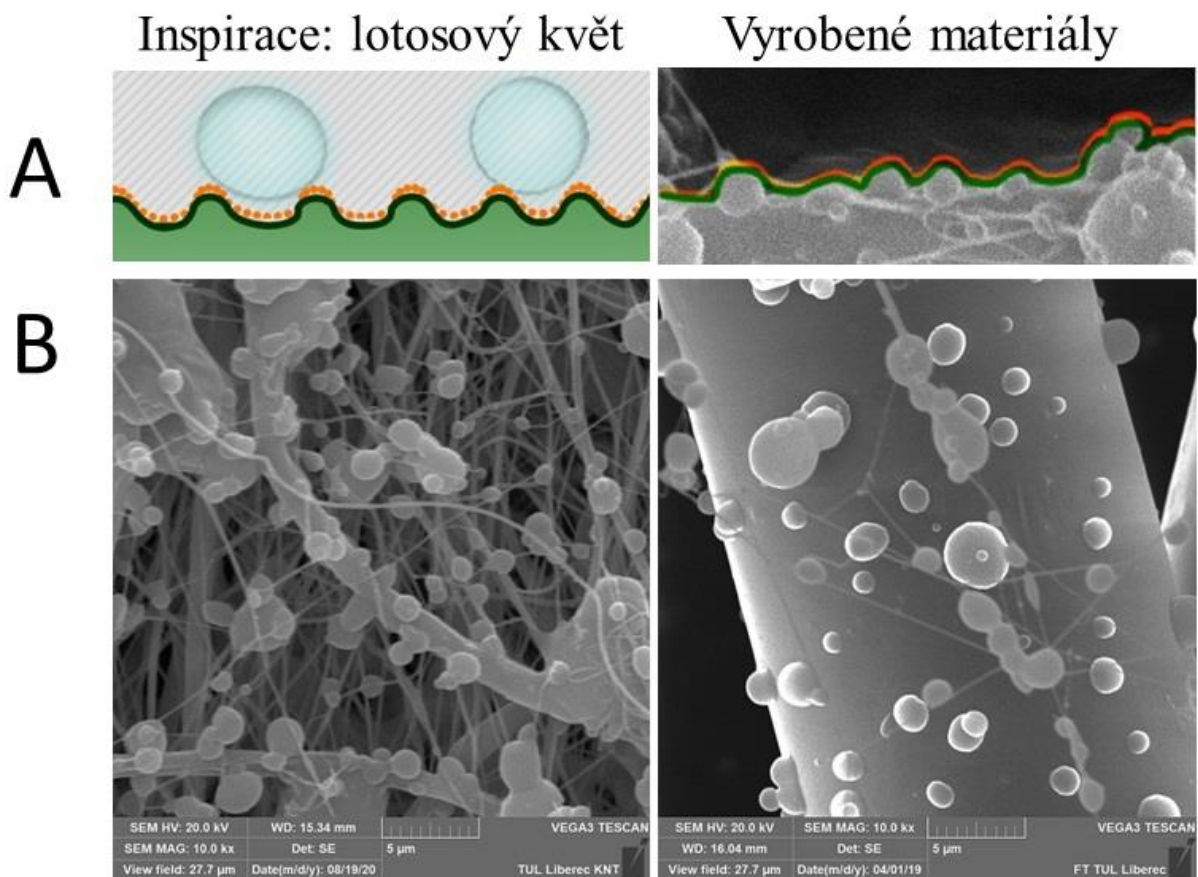


Obr. 10: Polymery používané pro přípravu a vývoj nanovlákenných materiálů pro prevenci adhezí. Grafy jsou interním výstupem literární rešerše autorů skript (Klicova M., Rosendorf J., Erben J., Horakova J. Antiadhesive Nanofibrous Materials for Medicine: Preventing Undesirable Tissue Adhesions. *ACS Omega*, 2023, 8 (23): 20152-62. DOI: 10.1021/acsomega.3c00341)



Obr. 11: Nanovláknenné materiály pro prevenci pooperačních adhezí jsou nejčastěji vyvíjeny pomocí electrospinningu. Majorita výzkumu se zabývá pouze výrobou pomocí jehlového electrospinningu, což může zpomalit komercializaci vyvíjených produktů (vlevo). Typy pooperačních adhezí, které jsou většinou preventovány pomocí nanovláknenných materiálů (vpravo). Grafy jsou interním výstupem literární rešerše autorů skript (Klicova M., Rosendorf J., Erben J., Horakova J. Antiadhesive Nanofibrous Materials for Medicine: Preventing Undesirable Tissue Adhesions. *ACS Omega*, 2023, 8 (23): 20152-62. DOI: 10.1021/acsomega.3c00341)

Na Katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů jsou dlouhodobě vyvíjeny nanovláknenné materiály pro prevenci gastrointestinálních komplikací. Vyvíjené materiály jsou převážně na bázi biodegradabilního polyesteru polykaprolaktonu, který se ukázal jako proadhezivní materiály při *in vivo* testování na velkém zvířecím modelu. Polykaprolaktonová nanovláknna jsou tak dále upravována pro dosažení antiadhezivního chování z jedné strany. Pro tyto účely byla např. na jedné strany planárních nanovláken vytvořena imitace povrchu lotosového listu, který je přirozeně superhydrofóbním materiálem. Struktura napodobující lotosový list byla vytvořena pomocí polymerních kapek z elektrostatického sprejování (naprašování). Struktura materiálu je znázorněna na obr. 12. Kapky polymeru byly dále upravovány např. hydrofóbním plazmatem pro zvýšení antiadhezivního chování. Při úpravě materiálu je nutné dodržet biokompatibilní vlastnosti výsledné struktury.



Obr. 12: Kompozitní materiál inspirovaný lotosovým květem: schéma (A) – lotosový květ + vyrobený materiál s vyznačeným reliéfem povrchu, snímky z elektronové mikroskopie (B) – měřítko 5 μm. Obr. Viz publikace Klicova et al. *Biomimetic hierarchical nanofibrous surfaces inspired by superhydrophobic lotus leaf structure for preventing tissue adhesions. Materials & Design* 2022. DOI: 10.1016/j.matdes.2022.110661

Všeobecně by nanovláčenné materiály vyvíjené pro tuto aplikaci měly splňovat následující kritéria:

- biokompatibilita (nanovláčenná vrstva nesmí vést k fibrotickému hojení ani jinak negativně ovlivňovat proces hojení a další pochody v lidském organismu, vrstva nesmí uvolňovat toxické látky),
- biodegradabilita (spíše kratší doba degradace z důvodu podpory hojení, cílem není tkáň úplně izolovat od hojivých procesů),
- stabilita při sterilizačním procesu (stálé vlastnosti i po sterilizaci, která je nutnou a nedílnou součástí výroby materiálu),
- kontrolované uvolňování léčiv ve známé koncentraci (pokud dojde k inkorporaci aktivních látek, např. antibiotik, měl by být znát profil uvolňování a měla by být dobře prozkoumána cytokompatibilita materiálů),
- pro/anti-adhezivní chování (pomocí in vitro modelů ověřené adhezivní vlastnosti před implantací),

- známé hodnoty smáčivosti (studie se aktuálně neshodují na tom, zda být materiál hydrofilní nebo hydrofobní, záleží na celkové materiálové kombinaci a dalších faktorech),
- opakovatelná výroba pro dosažení stejných vlastností, možnost výroby dostatečného množství materiálu pro komplexní testování v několika opakováních (ideálně výroba na poloprůmyslovém nebo průmyslovém zvláknovacím zařízení).

Aktuálně stále probíhá výzkum nanovláknenných materiálů pro prevenci adhezí, přestože je takový materiál velmi žádaný přímo lékařskou komunitou, je velmi náročné splnit veškeré materiálové požadavky. Široké spektrum výzkumných článků ukazuje potenciál nanovláknenných struktur jako bariérových materiálů pro prevenci závažných pooperačních adhezí. Probíhající intenzivní výzkum je prováděn mnoha vědeckými skupinami podporovanými lékaři z klinické praxe. Problém tvorby pooperačních srůstů zůstává nevyřešen, protože komerčně dostupné materiály nejsou schopny dostatečně preventovat tyto komplikace. Kvalita života pacientů po operacích je tak stále ohrožena a v mnoha případech trvale snížena. Bylo zjištěno, že výzkumné přístupy přinášejí mnoho nových informací o chování nanovláken, nicméně byly zaznamenány i jisté inkonzistence ve výzkumných přístupech. V budoucnu tak lze očekávat další intenzivní výzkum na základě předchozích zveřejněných informací.

Použitá a doporučená literatura:

Titan A. L., Foster D. S., Chang J., Longaker M. T. Flexor Tendon: Development, Healing, Adhesion Formation, and Contributing Growth Factors. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2019, 144 (4): 639e-647e. doi: 10.1097/PRS.0000000000006048. PMID: 31568303; PMCID: PMC7092377

van Goor, H. Consequences and complications of peritoneal adhesions. *Colorectal Disease*, 2007, 9 (2): 25-34. DOI: 10.1111/j.1463-1318.2007.01358.x. PMID: 17824967.

Capella-Monsonís H., Kearns S., Kelly J., Zeugolis D. I. Battling adhesions: From understanding to prevention. *BMC Biomedical Engineering*, 2019, 1 (5). DOI: 10.1186/s42490-019-0005-0

Ko J. E., Ko Y.-G., Kim W. I., Kwon O. K., Kwon O. H. Nanofiber mats composed of a chitosan-poly(d,l-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene oxide) blend as a postoperative anti-adhesion agent. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 2017, 105(7):1906-1915. DOI: 10.1002/jbm.b.33726. PMID: 27286271.

Wu W, Cheng R, das Neves J, Tang J, Xiao J, Ni Q, Liu X, Pan G, Li D, Cui W, Sarmiento B. Advances in biomaterials for preventing tissue adhesion. *Journal of Controlled Release*, 2017, 10 (261): 318-336. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.06.020. PMID: 28652071.

Kheilnezhad, B., Hadjizadeh, A. A review: Progress in preventing tissue adhesions from a biomaterial perspective. *Biomaterials Science* 2021, 9, 2850–2873. DOI: 10.1039/D0BM02023K

Nordentoft, Tyge, 2015. Sealing of gastrointestinal anastomoses with fibrin glue coated collagen patch. *Danish Medical Journal*, 2015, 62 (5): B5081. PMID: 26050838.

Behrens AM, Lee NG, Casey BJ, Srinivasan P, Sikorski MJ, Daristotle JL, Sandler AD, Kofinas P. Biodegradable-Polymer-Blend-Based Surgical Sealant with Body-Temperature-Mediated Adhesion. *Advanced Materials*, 2015, 27(48):8056-61. DOI: 10.1002/adma.201503691. PMID: 26554545; PMCID: PMC4961426.

Boersema GSA, Vennix S, Wu Z, Te Lintel Hekkert M, Duncker DGM, Lam KH, Menon AG, Kleinrensink GJ, Lange JF. Reinforcement of the colon anastomosis with cyanoacrylate glue: a porcine model. *The Journal of Surgical Research*, 2017, 217:84-91. DOI: 10.1016/j.jss.2017.05.001. PMID: 28595813.

Farag S, Padilla PF, Smith KA, Sprague ML, Zimberg SE. Management, Prevention, and Sequelae of Adhesions in Women Undergoing Laparoscopic Gynecologic Surgery: A Systematic Review. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 2018, 25(7):1194-1216. DOI: 10.1016/j.jmig.2017.12.010. PMID: 29289627.

Cheong Y, Bailey S, Forbes J. Randomized Controlled Trial of Hyalobarrier[®] Versus No Hyalobarrier[®] on the Ovulatory Status of Women with Periovarian Adhesions: A Pilot Study. *Advances in Therapy*, 2017, 34 (1): 199-206. DOI: 10.1007/s12325-016-0453-z. PMID: 27900662; PMCID: PMC5216085.

Rosendorf J., Horakova, J. Klicova M., Palek R., Cervenкова L., Kural T., Hosek P., Kriz T., Tegl V., Moulisova V., Tonar Z., Treska V., Lukas D. Experimental fortification of intestinal anastomoses with nanofibrous materials in a large animal model. *Scientific Reports*, 2020, 10: 1134. DOI: 10.1038/s41598-020-58113-4

Klicova M., Klapstova A., Chvojka J., Koprivova B., Jencova V., Horakova J. Novel double-layered planar scaffold combining electrospun PCL fibers and PVA hydrogels with high shape integrity and water stability. *Materials Letters*, 2020, 263: 127281. ISSN: 0167-577X, DOI: 10.1016/j.matlet.2019.127281

Klicova M., Oulehlova Z., Klapstova A., Hejda M., Krejcik M., Novak O., Mullerova J., Erben J., Rosendorf J., Palek R., Liska V., Fucikova A., Chvojka J., Zvercova I., Horakova J. Biomimetic hierarchical nanofibrous surfaces inspired by superhydrophobic lotus leaf structure for preventing tissue adhesions. *Materials & Design*, 2022, 217: 110661. ISSN: 0264-1275, DOI: 10.1016/j.matdes.2022.110661

Klicova M., Rosendorf J., Erben J., Horakova J. Antiadhesive Nanofibrous Materials for Medicine: Preventing Undesirable Tissue Adhesions. *ACS Omega*, 2023, 8 (23): 20152-62. DOI: 10.1021/acsomega.3c00341

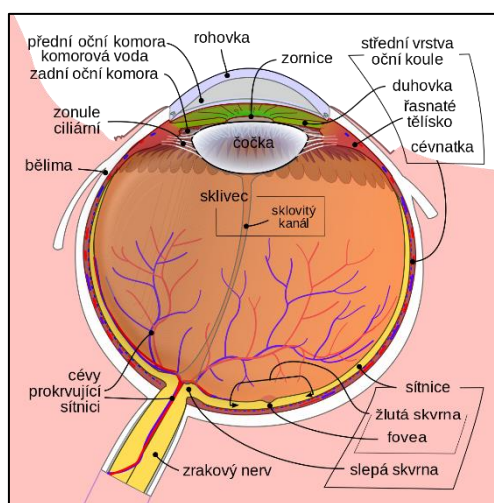
4. Nanovláknenné materiály pro léčbu glaukomu

Andrea Klápšřová

Důležité pojmy: glaukom, nitrooční tekutina, nitrooční tlak, glaukomové drenážní implantáty, nedegradabilní biokompatibilní polymery, polyvinylidenfluorid, elektrické zvlákňování

4.1 Anatomie oka

Oko je smyslovým orgánem umístěným v kostní dutině, tzv. očníci. Jeho funkcí je vnímat světlo a zajišťovat zrak. Hlavní strukturu tvoří oční bulva, která se skládá ze tří vrstev: vnější vazivové, střední cévnaté a vnitřní (obrázek 13).



Obr. 13 Anatomie oka

Vnější vrstva, známá také jako *tunica fibrosa*, má dvě části. První část (bělima), udržuje tvar oka a skládá se z husté sítě kolagenního vaziva. Tato část je propojena s vlákny zrakového nervu, ciliárními arteriemi a menšími nervy. Druhou částí je průhledná rohovka, která se nachází v přední části oka. Její průhlednost je zajištěna uspořádáním kolagenních vláken.

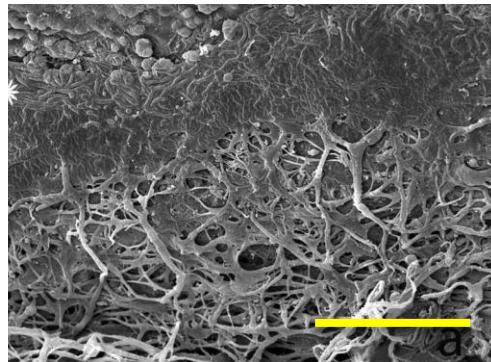
Střední vrstva, nazývaná *tunica vasculosa*, obsahuje řidší kolagenní vazivo s mnoha cévami a melanocyty. Tato vrstva zahrnuje duhovku, řasnaté tělísko a cévnatku. Duhovka je tkáň složená ze dvou listů obsahujících kolagenní a elastinová vlákna a její barvu určuje množství pigmentových buněk. Uprostřed duhovky je zornice, která reguluje množství světla dopadajícího na sítnici. Za duhovkou se nachází řasnaté tělísko. Zde dochází k produkci nitrooční tekutiny a k akomodaci čočky. Zbylou část tvoří cévnatka vyživující celou střední část oka.

Vnitřní vrstva oka, nazývaná *tunica nervosa*, je tvořena sítnicí. V zadní části obsahuje nervové buňky a fotoreceptory, které zpracovávají informace o obraze. Zrakový nerv přenáší tyto informace do centrálního nervového systému. Oko opouští v místě zvaném slepá skvrna. Na sítnici se současně nachází oblast nejostřejšího vidění, nazývané žlutá skvrna.

4.2 Glaukom

Glaukom se řadí mezi skupinu neléčitelných očních onemocnění, považovanou za jednu z nejčastějších příčin ztráty zraku po celém světě. Hlavním znakem tohoto onemocnění je zvýšený nitrooční tlak, který může poškozovat oční nerv. Progresivní průběh nemoci bez patřičné léčby způsobuje postupné odumírání nervových buněk a vláken v oblasti zrkového nervu, což může resultovat v úplnou slepotu. Přesný mechanismus vzniku zatím není plně pochopen, což způsobuje, že glaukom je celosvětově velmi problematické onemocnění, postihující 3,54 % populace nad 40 let. Světová zdravotnická organizace zařadila glaukom mezi prioritní oční onemocnění vedoucí ke slepotě.

Trabekulární síťovina je struktura mezi duhovkou, jejím kořenem a rohovkou (obrázek 14). Za běžné situace udržuje v oku normální nitrooční tlak a odtéká tudy většina nitrooční tekutiny (asi 65–90 %). Tato tekutina dále proudí tzv. Schlemmovým kanálem zpět do celkového krevního oběhu. I když přesné příčiny glaukomu nejsou zcela známé, je zřejmé, že zvýšená odolnost trabekulární síťoviny vůči odtoku tekutiny má zásadní vliv na vznik glaukomového onemocnění. Tato odolnost může být způsobena strukturálními i biochemickými změnami. Trabekulární síťovina vykazuje porézní strukturu obsahující proteoglykany a hyaluronan, které zvyšují odpor vůči odtoku tekutiny.



Obr. 14 SEM snímek lidské trabekulární síťoviny; měřítko 100 μm . Zdroj: Dua H. et al. The collagen matrix of the human trabecular meshwork is an extension of the novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). The British Journal of Ophthalmology. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2013-304593.

Nitrooční tekutina je bezbarvá tekutina, která zásobuje bezcévnaté oční struktury kyslíkem, živinami a odvádí odpadní látky. Jak bylo zmíněno dříve, vzniká v řasnatém tělísku a následně proudí do zadní oční komory. Poměr mezi její produkcí a odtokem stanovuje výsledný nitrooční tlak. Při normálním stavu se jeho hodnota pohybuje mezi 9 a 21 mmHg (1,2–2,8 kPa), nicméně definice normální hodnoty nitroočního tlaku je taková, při které nedochází k poškození očního nervu a je zachována integrita oka. Koncept nitroočního tlaku je klíčový při diskuzi o glaukomu, neboť je hlavním faktorem, který může ovlivnit poškození očního nervu. Nebezpečný je jak příliš vysoký, tak i příliš nízký nitrooční tlak (oční hypotonie).

4.3 Terapie glaukomu a komerčně dostupné glaukomové implantáty

Jak již bylo zmíněno, glaukom je onemocnění, které dosud nemá léčbu. Používají se pouze metody zaměřené na snižování nitroočního tlaku. Na trhu se současně nenachází žádný

fungující glaukomový implantát, nicméně existují způsoby, které dokáží glaukomové onemocnění zpomalit či zastavit.

Prvním krokem je vždy konzervativní terapie pomocí lokálních nebo perorálních léků. Tyto léky mohou snižovat nitrooční tlak tím, že snižují produkci nitrooční tekutiny (např. betablokátory) nebo naopak zvyšují odtok nitrooční tekutiny (např. prostaglandiny). Inovativní přístupy, které zlepšují biologickou aktivitu léčiv jsou řízené uvolňování léčivých látek, využití hydrogelů nebo speciálních očních implantátů s obsahem aditiv. Laserové terapie fungují na principu zvyšování odtoku tekutiny vytvořením otvoru v trabekulární síťovině, nicméně s krátkodobým efektem.

Pokud není terapie pomocí léků nebo laseru dostatečně účinná, je nutné zvážit operační možnosti. Nejběžnější chirurgický zákrok, který se dosud provádí je tzv. trabekulektomie, kdy je trvale odstraněna část trabekulární síťoviny a přilehlých oblastí. Přestože tato metoda prokazatelně udržuje funkční zorné pole a snižuje nitrooční tlak, je úspěšnost léčby bez nutnosti reoperace stále nižší než 50 %. Nejnovější přístupy se zaměřují na tzv. mikroinvasivní glaukomovou chirurgii. Její hlavní výhodou je nízká invazivita postupu, což snižuje riziko pooperačních zánětů a urychluje hojení. Principem je rozšíření přirozeného odtoku nitrooční tekutiny nebo vytvoření nové cesty.

Na trhu jsou aktuálně dostupné různé implantáty pro mikroinvasivní glaukomovou chirurgii, které obdržely schválení od Amerického úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Implantát iStent (Glaukos, USA) se skládá ze tří titanových stentů potažených heparinem a umístěných v oku podél okraje Schlemmova kanálu, což pomáhá zlepšit odtok nitrooční tekutiny. Výsledky studií však nevykazují vysokou účinnost. Podobně je na tom implantát Hydrus (Alcon, USA) zkonstruovaný ze slitiny niklu a titanu. Jedná se o otevřenou strukturu ve tvaru půlměsíce se třemi otvory, která se vkládá přímo do Schlemmova kanálu. Na trhu existují také implantáty z přírodních materiálů jako je trubicový želatinový implantát XEN (Allergan, USA). Bohužel byla při jeho použití objevena spojitost se vznikem zánětu očních struktur (tzv. endoftalmitidy).

Většina implantátů je vyráběna z tuhých materiálů, které se díky tomu nemohou přizpůsobit přirozenému zakřivení skléry a dochází tak k poškozování rohovkové buněčné vrstvy (tzv. rohovkového endotelu). Z tohoto důvodu je vhodnější používat flexibilnější materiály. Tímto materiálem by mohl být například kolagen, který je současně hlavním stavebním prvkem extracelulární hmoty. Komerčně se používá biodegradabilní implantát nazývaný Ologen, sestávající z lyofilizovaného vepřového kolagenu typu I a glykosaminoglykanů. Jeho nevýhodou je postupná degradace, proto je používán zejména v kombinaci s trabekulektomií.

4.4 Nanovláknenné glaukomové drenážní implantáty

Vzhledem ke skutečnosti, že známe nativní charakter struktury tkáně a současně neexistuje dlouhodobá a efektivní léčba glaukomu, můžeme predikovat zájem očních chirurgů i samotných pacientů o fungující systém. Možné řešení by mohlo vzniknout výrobou implantátů z nanovláken. Jejich velkou výhodou je struktura podobná trabekulární síťovině. Klíčovým prvkem je nalezení vhodného materiálu, který musí splňovat několik podmínek.

- Hlavní z nich jsou biokompatibilita v místě určení, netoxičita a inertnost. Tyto vlastnosti společně zajišťují přijetí implantátu bez imunitní odpovědi.
- Zásadním faktorem je zabránění degradace materiálu. V ideálním případě by měl implantát v oku plnit svou funkci do konce pacientova života.
- Materiál musí být současně odolný vůči růstu buněk, aby nedocházelo k blokaci odtokové cesty jejich porůstáním, což by snížilo efektivitu odtoku tekutiny.

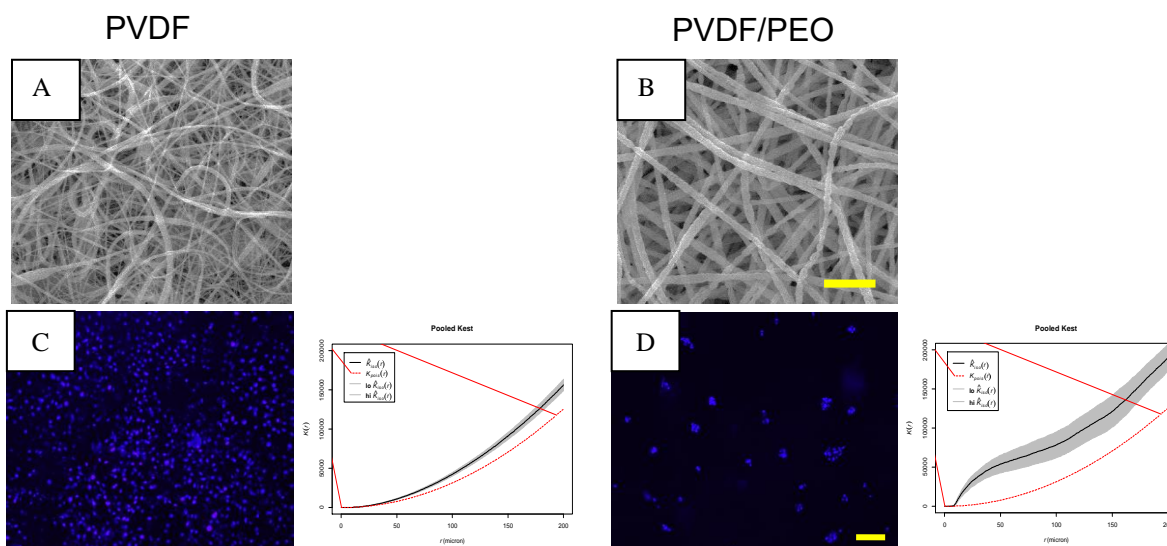
Z uvedených podmínek vyplývá, že cílem je nalezení takového materiálu, který bude odolávat buněčnému růstu, ale zároveň nebude pro buňky toxický. Tento přístup je pravým opakem většiny biokompatibilních scaffoldů, u kterých obvykle požadujeme jeho rozpad a nahrazení nanovláknenné sítě plnohodnotnou tkání. Je zřejmé, že materiál by měl napodobovat přirozenou strukturu trabekulární síťoviny a udržovat ji bez výrazných změn. Proto by měl být porézní, s vhodnou velikostí pórů, které zajistí optimální odtok nitrooční tekutiny, aniž by došlo k přílišnému snížení nitroočního tlaku a vzniku pooperační hypotonie. Implantát by měl být tenký, aby minimalizoval trauma při zavedení. Celkové vlastnosti implantátu jsou klíčové pro jeho účinnost během operace, pooperačního období a dlouhodobého používání. Měl by být flexibilní a tvarově přizpůsobitelný, aby vyhovoval různým operačním technikám nebo individuálním potřebám pacienta.

Na Katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů jsou dlouhodobě vyvíjeny glaukomové drenážní implantáty, které splňují veškeré uvedené podmínky. Z hlediska materiálových vlastností je optimálním polymerem pro výrobu implantátu polyvinylidenfluorid (PVDF). Jedná se o syntetický nedegradabilní polymer patřící do skupiny fluoropolymerů, který byl již zmíněn v sekci A - Scaffoldy (podkapitola 3.2.)

PVDF vyniká vlastnostmi jako je biokompatibilita, odolnost vůči hydrolyze či odolnost vůči růstu buněk. V očním lékařství se používá jako neresorbovatelné šicí nitě, běžně v medicíně například jako kýlní síťka posilující břišní stěnu, či jako urogynekologický implantát nebo šicí nitě obecně. Nanovláknena PVDF se v lékařství dosud běžně nepoužívají.

Elektrické zvlákňování tohoto polymeru technologií Nanospider není zcela jednoduchou záležitostí. V průmyslovém měřítku se pro optimalizaci zvlákňovacího procesu využívají anorganická aditiva jako například tetraetylamoniumbromid. Použití těchto aditiv však v biomedicíně není možné, protože mohou způsobovat dráždivou reakci, obzvláště v prostředí oka. Výsledná vláknenná vrstva PVDF bez obsahu defektů je kromě správně nastaveného zařízení také kombinací vhodně zvolených materiálových (molární hmotnost polymeru, rozpouštědlový systém, koncentrace polymerního roztoku a způsob rozpouštění polymeru) a procesních (teplota a vlhkost vzduchu) podmínek.

V rámci experimentů byla provedena modifikace PVDF hydrofilním polymerem polyetylenoxidem (PEO). Tato kombinace zajišťuje odolnost vůči růstu fibroblastové buněčné linie, jak je možné pozorovat na obrázku 15. Buňky se v případě PVDF/PEO shlukovaly do klastrů a nedocházelo k jejich množení (obrázek 15D). Více informací je možné nalézt v publikaci *Klápšťové*.



Obr. 15: 1. řádek: SEM snímky porovnávající A: PVDF, B: PVDF/PEO, měřítko 10 μm .
 Druhý řádek: Snímky z FM obarvených buněčných jader po 8 dnech kultivace 3T3 myších fibroblastů na vrstvách C: PVDF, D: PVDF/PEO včetně K-funkce představující prostorové rozložení buněk; měřítko 100 μm

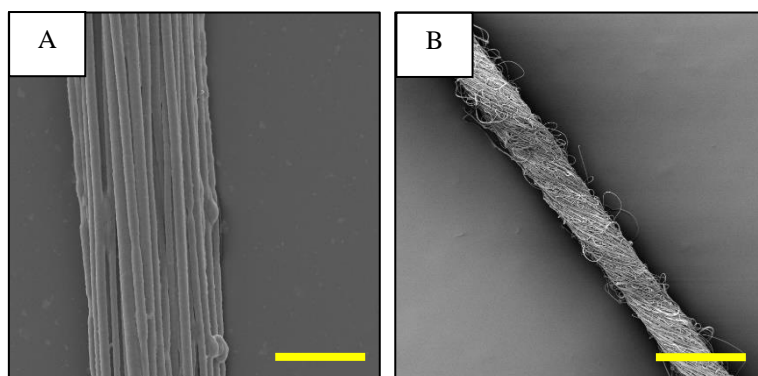
Podle literárních pramenů je pro buňky ideální mírně hydrofilní povrch s kladným nábojem. PVDF je hydrofobní materiál s úhlem smáčení kolem 120°. Díky jeho silně negativnímu náboji nedochází k adsorpci molekul, které jsou nezbytné pro adhezi buněk. V důsledku toho, jsou proteiny adsorbovány v rigidní formě, což zabraňuje jejich adhezi k povrchu.

Z hlediska tvaru implantátu je možné využít jak planární formu napodobující trabekulární síťovinu, tak tubulární formu napodobující současně vyvíjené mikroinvazivní implantáty. Planární implantáty je možné využít jako alternativu k dlouhodobě používané operaci trabekulektomie. Materiál s rozměry přibližně 2x6 mm je umístěn do vytvořeného sklerálního tunelu blízko okraje přední oční komory, jak znázorňuje obrázek 16 při implantaci na kadaverózním (neživém) prasečím bulbu.



Obr. 16 Ex vivo implantace nanovlákného planárního implantátu na bázi PVDF do kadaverózního prasečího bulbu

Tubulární forma implantátů z nanovláken je zajímavou alternativou mikroinvazivní glaukomové terapie (obr, 17). Je to především v důsledku flexibility vzniklého materiálu a s tím spojené absenci poškození rohovkového endotelu. Výrobu je však nutné pojmout zcela v odlišné perspektivě. Výsledný implantát dosahuje maximálního průměru přibližně 150–400 μm , což je velmi malý rozměr s problematickou výrobou. Aby nedošlo ke zhroucení jeho tubulární struktury při manipulaci a operační technice, je nutné použít výplňový materiál, který bude zároveň sloužit jako kapalinový rezervoár, zpomalovat odtok nitrooční tekutiny a zabránit tak vzniku hypotonie. Implantát jako celek je tedy kompozitní materiál s antifibrotickými vlastnostmi a schopností zajišťovat přirozený odtok nitrooční tekutiny. Jeho primární cíl je zachování normální hodnoty nitroočního tlaku tak, aby nedocházelo k poškození zadního očního nervu.



Obr. 17 SEM snímky kompozitního tubulárního implantátu. A: vnitřní část z PVDF vyrobená technologií drawing; měřítko 50 μm ; B: Implantát po nánosu vnější vrstvy PVDF/PEO; měřítko 500 μm

Vývoj nanovlákného glaukomového drenážního implantátu stále probíhá, přičemž jsou objevovány nové a neprobádané oblasti. Planární materiál byl již testován na laboratorních zvířatech (Novozélandský bílý králík), přičemž výsledky prokazují nadějných charakter implantátů. Ve studii obsahující 23 zvířat byly sledovány parametry snižování nitroočního tlaku, zánětlivá reakce či komplikace spojené s operačním postupem.

V současné literatuře se nenachází zmínky o použití podobného implantátu pro léčbu glaukomového onemocnění. Výsledky provedených studií jsou poměrně novou oblastí tkáňového inženýrství a je zde očekáván rychlý pokrok v součinnosti s intenzivním vývojem nových materiálů.

Použitá a doporučená literatura

JONAS, Jost B; Tin AUNG; Rupert R BOURNE; Alain M BRON; Robert RITCH et al. Glaucoma. Online. *The Lancet*, roč. 390 (2017), č. 10108, s. 2183–2193. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31469-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31469-1).

ROZSÍVAL, Pavel. *Oční lékařství*. Druhé, přepracované vydání. Praha: Galén, 2017. ISBN 978-80-7492-316-6.

SHAARAWY, Tarek; Mark B. SHERWOOD; R. A. HITCHINGS a Jonathan G. CROWSTON. *Glaucoma*. 2nd edition. London New York: Elsevier, Saunders, 2015. ISBN 978-0-7020-5193-7.

DUA, Harminder S.; Lana A. FARAJ; Matthew J. BRANCH; Aaron M. YEUNG; Mohamed S. ELALFY et al. The collagen matrix of the human trabecular meshwork is an extension of the novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). Online. *The British Journal of Ophthalmology*, roč. 98 (2014), č. 5, s. 691–697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-304593>.

PATEL, Shuchi a Louis R. PASQUALE. Glaucoma drainage devices: a review of the past, present, and future. Online. *Seminars in Ophthalmology*, roč. 25 (2010), č. 5–6, s. 265–270. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/08820538.2010.518840>.

CARTER, Lea a Leon W. HERNDON. Minimally Invasive Glaucoma Surgery: Past, Present, and Future. Online. *Advances in Ophthalmology and Optometry*, roč. 8 (2023), č. 1, s. 239–248. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yaoo.2023.03.005>.

MEGEVAND, Gordana a Alain M. BRON. Personalising surgical treatments for glaucoma patients. Online. *Progress in Retinal and Eye Research*, roč. 81 (2021), s. 100879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100879>.

AHMED, Iqbal Ike K.; Antonio FEA; Leon AU; Robert E. ANG; Paul HARASYMOWYCZ et al. A Prospective Randomized Trial Comparing Hydrus and iStent Microinvasive Glaucoma Surgery Implants for Standalone Treatment of Open-Angle Glaucoma: The COMPARE Study. Online. *Ophthalmology*, roč. 127 (2020), č. 1, s. 52–61. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.04.034>.

CHAUDHARY, Ankita; Lauriane SALINAS; Jacopo GUIDOTTI; André MERMOUD a Kaweh MANSOURI. XEN Gel Implant: a new surgical approach in glaucoma. Online. *Expert Review of Medical Devices*, roč. 15 (2018), č. 1, s. 47–59. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/17434440.2018.1419060>.

LIN, Benjamin R.; Hasenin AL-KHERSAN; Elena BITRIAN a Harry W. FLYNN. Endophthalmitis Associated With XEN Stent Implantation. Online. *American Journal of Ophthalmology*, roč. 253 (2023), s. 37–43. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2023.04.006>.

PARIKH, Kunal S.; Aditya JOSYULA; Revaz OMIADZE; Ju Young AHN; Youlim HA et al. Nano-structured glaucoma drainage implant safely and significantly reduces intraocular pressure in rabbits via post-operative outflow modulation. Online. *Scientific Reports*, roč. 10 (2020), č. 1, s. 12911. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69687-4>.

JI, Qingshan; Bing QI; Lian LIU; Xiaoling GUO a Jingxiang ZHONG. Efficacy and Safety of Ologen Implant Versus Mitomycin C in Primary Trabeculectomy: A Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. Online. *Journal of Glaucoma*, roč. 24 (2015), č. 5, s. e88-94. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/IJG.000000000000147>.

AMÉDURI, B.; B. BOUTEVIN a G. KOSTOV. Fluoroelastomers: synthesis, properties and applications. *Progress in Polymer Science*, roč. 1 (2001), č. 26, s. 105–187. ISSN 0079-6700.

KLAPSTOVA, Andrea; Jana HORAKOVA; Maros TUNAK; Andrii SHYNKARENKO; Jakub ERBEN et al. A PVDF electrospun antifibrotic composite for use as a glaucoma drainage implant. Online. *Materials Science and Engineering: C*, roč. 119 (2021), s. 111637. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111637>.

BACAKOVA, Lucie; Elena FILOVA; Martin PARIZEK; Tomas RUMML a Vaclav SVORCIK. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. Online. *Biotechnology Advances*, roč. 29 (2011), č. 6, s. 739–767. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.004>.