Habilitační práce

Podmíněnost chronických venózních ulcerací a jejich léčba

Komentář a soubor publikací předložených k habilitačnímu řízení
v oboru dermatovenerologie

Veronika Slonková

I. dermatovenerologická klinika Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně

Přednosta: Prof. MUDr. Vladimír Vašků, CSc.

Brno 2019

Obsah

1. Úvod 4

2. Seznam publikovaných prací 5

3. Komentář k problematice s aktuálními poznatky 7

4. Závěr 46

5. Literatura 47

6. Abstrakt 60

7. Seznam zkratek 62

Příloha: Odborné publikace

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu prof. MUDr. Vladimíru Vašků, CSc. za odborné vedení celé habilitační práce, za jeho cenné rady a vstřícný přístup. Dále moc děkuji paní prof. MUDr. Anně Vašků, CSc. za pomoc při genetickém vyšetření souboru pacientů a zpracování všech dat. Rovněž děkuji prof. MUDr. Věře Semrádové, CSc. za odborné vedení a pomoc a MUDr. Zuzaně Navrátilové, Ph. D. za znalosti, které jsem od ní získala o hojení ran. Také bych chtěla poděkovat svému tatínkovi, doc. MUDr. Jiřímu Adlerovi, CSc. za všechny rady, podporu a přípravu kultivovaných epidermálních alograftů. Dále děkuji kolektivu lymfoterapeutek I. dermatovenerologické kliniky FN u sv. Anny v Brně za trpělivou pomoc při sběru dat a Ing. Zdeňku Novotnému, CSc. za jejich statistické vyhodnocení. Také moc děkuji své rodině za výraznou podporu a pochopení pro moji vědeckou činnost.

1. Úvod

Habilitační práce je souborem 10 publikovaných odborných prací, které se věnují tématu chronického žilního onemocnění a jeho komplikacím, zejména chronickým bércovým ulceracím venózní etiologie, jejich genetické podmíněnosti a také jejich léčbě.

Problematika kvality života u pacientů s chronickými bércovými vředy byla obsahem dizertační práce z roku 2013. V posledních letech byly zkoumány zejména genetické aspekty chronického žilního onemocnění. Další práce se týkají možností léčby chronických bércových ulcerací venózní etiologie. Tyto práce prezentují zejména výsledky klinických studií, které probíhaly na I. dermatovenerologické klinice FN u sv. Anny v Brně a zkoumaly vliv jednak kultivovaných epidermálních alograftů, jednak oxidované celulózy na hojení bércových vředů.

Publikované práce jsou rozděleny do 3 částí.

I. Genetické aspekty chronického žilního onemocnění

II. Terapie chronických bércových ulcerací venózní etiologie – kultivované epidermální keratinocyty

III. Terapie chronických bércových ulcerací venózní etiologie – oxidovaná celulóza

Komentář charakterizující stav problematiky, cíle práce, použitou metodiku, dosažené výsledky i kvantitativní a obsahový autorský podíl uchazeče je uveden zvlášť pro každou část habilitační práce. Souhrn literatury je uveden na konci této práce.

2. Seznam publikovaných prací

I. Genetické aspekty chronického žilního onemocnění

1. Slonková V, Slonková V Jr, Vašků A, Vašků V. Genetic predisposition for chronic venous insufficiency in several genes for matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MMP-12) and their inhibitor TIMP-2. JEADV 2017; 31:1746–1752.
2. Slonková V, Vašků V, Vašků A. MMP-9 gene polymorphism in patients with chronic venous disease, 18th Meeting of the European Venous Forum, Book of Abstracts p. 76

II. Terapie chronických bércových ulcerací venózní etiologie – kultivované epidermální keratinocyty

1. Slonková V, Kino-Oka M, Mazza S, Nievergelt C, Prenosil JE, Burg G, Hafner J: Cultured epithelial autografts for the management of a chronic pretibial leg ulcer due to congenital valvular aplasia. Dermatology 1999; 198: 101-103.
2. Slonková V, Navrátilová Z, Semrádová V: Kultivované epidermální keratinocyty v terapii bércových ulcerací - část I. Čs Derm 2002; 77: 168-171.
3. Slonková V, Navrátilová Z, Semrádová V: Kultivované epidermální keratinocyty v terapii bércových ulcerací - část II. Srovnání účinnosti kryoprezervovaných a lyofilizovaných allograftů. Čs Derm 2002; 77: 239-244.
4. Slonková V, Navrátilová Z, Semrádová V, Adler J: Successful treatment of chronic venous leg ulcers with lyophilized cultured epidermal allografts. Acta Dermatoven APA 2004; 13:119-123.
5. Navrátilová Z, Slonková V, Semrádová V, Adler J: Cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of leg ulcers (a pilot study). J Eur Acad Dermatol Venereol 2004; 18: 173-179.

III. Terapie chronických bércových ulcerací venózní etiologie – oxidovaná celulóza

1. Slonková V, Vašků V: Využití oxidované celulózy v terapii chronických ulcerací cévního původu – výsledky klinické studie. Čs Derm 2009; 84: 92-98.

2. Slonková V, Vašků V: Úspěšná terapie bércových ulcerací pomocí hydrogenvápenaté soli oxidované celulózy. Referátový výběr z dermatovenerologie 2009; 51: 80-82.
3. Slonková V, Vašků V: Využití hydrogenvápenaté soli oxidované celulózy (Traumacelu biodress) v terapii chronických ulcerací: shrnutí výsledků klinické studie a kazuistika. Lékařské listy 2008; 19: 27-29.

3. Komentář k problematice s aktuálními poznatky

I. Genetické aspekty chronického žilního onemocnění

1. Slonková V, Slonková V Jr, Vašků A, Vašků V. Genetic predisposition for chronic venous insufficiency in several genes for matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MMP-12) and their inhibitor TIMP-2. JEADV 2017; 31:1746–1752.

   (kvantitativní podíl uchazeče - 70% - sběr a analýza dat, klinické vyšetřování pacientů, vyhledávání a analýza literatury, příprava textu publikace)

2. Slonková V, Vašků V, Vašků A. MMP-9 gene polymorphism in patients with chronic venous disease, 18th Meeting of the European Venous Forum, Book of Abstracts p. 76

   (kvantitativní podíl uchazeče - 80% - sběr a analýza dat, klinické vyšetřování pacientů, vyhledávání a analýza literatury, text publikace)

Od r. 2015 do r. 2017 probíhal na I. dermatovenerologické klinice FN u sv. Anny v Brně ve spolupráci s Ústavem patologické fyziologie LF MU výzkumný projekt „Genetická predispozice progrese chronického žilního onemocnění“. Cílem práce bylo nalezení rizikových genů, které ovlivňují vznik a progresi CVD a dále průběh hojení bércových vředů žilní etiologie, tak aby bylo možno predikovat průběh CVD u každého pacienta a individualizovat tak léčebný plán. První část výsledků byla publikována v Journal of European Academy of Dermatovenereology v říjnu 2017. Tato práce shrnuje výsledky asociační case-control studie, která hodnotila vztah mezi polymorfismy MMP-2 (rs243864), MMP-9 (rs3918242), MMP-12 (rs7123600) a TIMP-2 (rs8176329) a rizikem vzniku CVD. Rovněž byla provedena studie genotyp – fenotyp v rámci souboru pacientů s CVD.

Druhá práce byla publikována ve formě e-posteru na 18. kongresu European Venous Forum v roce 2017 v Portugalsku. Zahrnuje dílčí výsledky týkající se polymorfismu MMP-9 (rs3918242) u pacientů s chronickým žilním onemocněním.

Stav problematiky

Chronické žilní onemocnění (CVD – chronic venous disease) představuje závažný celosvětový zdravotní problém (61). Podle epidemiologického průzkumu z r. 2012 je prevalence CVD v populaci vysoká, uvádí se 84 % (včetně stadia C0s – symptomatičtí pacienti bez viditelných známek nemoci), z toho 64% populace má některý z klinických projevů C1-C6 (92, 106). V České republice byla zjištěna prevalence CVD 70 % (Czech Vein Program), přičemž náklady na léčbu v ČR dosahují až 350 miliónů Kč ročně a 10-15 % pacientů je v pracovní neschopnosti (60, 62, 133). Onemocnění má progredující charakter, výrazně snižuje kvalitu života a bércovými vředy trpí 1-2% populace (97).

Chronické žilní onemocnění je definováno jako dlouhodobé morfologické a funkční abnormality žilního systému, které se projevují symptomy a /nebo známkami vyžadujícími vyšetření a /nebo léčbu (26). Projevy chronického žilního onemocnění nejlépe popisuje CEAP klasifikace, která kromě klinických příznaků zohledňuje i etiologii, anatomii a patofyziologii choroby (26, 27). Podle klinických projevů se CVD dělí na několik stadií, které jsou označené jako C0 – C6. Stadium C0 zahrnuje subjektivní potíže (flebalgie, noční křeče, pocit neklidných nohou), ale bez viditelných známek žilního onemocnění. Stadium C1 představuje teleangiectasie nebo retikulární varixy, stadium C2 kmenové varixy, stadium C3 varixy a edém (tzv. flebedém), stadium C4 varixy a trofické kožní změny, stadium C5 varixy a zhojenou ulceraci a stadium C6 je nejtěžším stadiem CVD a zahrnuje varixy a otevřený bércový vřed. Stadium C4 se dále nově dělí na C4a – varixy s pigmentací nebo ekzémem a C4b – varixy s dermatoliposklerózou nebo atrophia blanche. Stadia C3-C6 představují pokročilý stupeň chronického žilního onemocnění a jsou označována jako chronická žilní insuficience (CVI) (26, 27, 96).

Mezi hlavní rizikové faktory pro vznik CVD patří věk, ženské pohlaví, obezita, těhotenství, anamnéza hluboké žilní trombózy a pozitivní rodinná anamnéza (64). Genetická predispozice je velmi důležitým rizikovým faktorem vzniku CVD (41, 47, 54, 87, 88, 89, 135). Pravděpodobnost vzniku kmenových varixů je až 90 %, pokud oba rodiče trpí CVD (18, 63). Genetická variabilita u genů matrix metalloproteináz (MMP) mohou hrát důležitou roli v progresi CVD a vzniku žilního bércového vředu (51).

Matrix metalloproteinázy (MMP) jsou proteolytické enzymy vyžadující ke své aktivitě kov (86). Jsou to endopeptidázy závislé na zinku, mají schopnost štěpit téměř všechny složky extracelulární matrix (ECM) a bazální membrány (BM). Hrají důležitou roli ve všech

biologických procesech, při kterých dochází k degradaci a remodelaci ECM. Fyziologicky se uplatňují např. při embryogenezi, angiogenezi a hojení ran, avšak účastní se i patologických dějů, např. nádorových onemocnění či chronických zánětlivých chorob (7, 32, 76, 77, 114, 131).

MMP byly poprvé popsány v roce 1962 Jerome Grossem a Charlesem Lapierem u člověka, později byly prokázány i u jiných obratlovců, bezobratlých i rostlin (86). V lidském genomu je 24 genů, které kódují 23 matrix metalloproteináz, MMP- 23 má duplicitní gen. Jednotlivé MMP mají podobnou strukturu, liší se substrátovou specifitou (86). MMP se někdy označují také jako matrixiny a patří do širší skupiny zinek-dependentních metalloproteináz, tzv. metzincinů. Skupina metzincinů zahrnuje kromě MMP ještě adamalysiny (ADAM – **a** **d**isintegrin **a**nd **m**etalloproteinase), dále ADAMTS (ADAM s **t**hrombo**s**pondin motifs), astaciny, dále bakteriální serralysiny a protozoární leishmanolysin (86).

Klasifikace MMP

MMP lze dělit jednak podle struktury, jednak podle toho, jaký je jejich cílový substrát, který štěpí.

Podle struktury se MMP dělí na *archetypální* (patří sem kolagenázy, stromelysiny a další MMP, např. MMP-12), *matrilysiny, želatinázy a MMP aktivované furinem* (např. membránově vázané MMP) (32).

Podle substrátu, který štěpí, se MMP dělí také do několika skupin (80, 86):

- *kolagenázy* – štěpí zejména intersticiální kolagen I, II a III na menší fragmenty, ale mohou štěpit i jiné molekuly ECM a solubilní proteiny (132). Patří sem **MMP-1** (kolagenáza-1), **MMP-8** (kolagenáza-2), **MMP-13** (kolagenáza-3), **MMP -18** (kolagenáza-4) – tato se u člověka nevyskytuje
- *želatinázy* – štěpí zejména želatinu, ale také kolagen IV, V a XI, dále laminin a další – patří sem **MMP-2** (želatináza A) a **MMP-9** (želatináza B)
- *stromelysiny* – štěpí kolagen, želatinu, kasein a další, patří sem **MMP-3** (stromelysin-1), **MMP-10** (stromelysin-2), **MMP-11** (stromelysin-3) a **MMP-19**
- *matrilysiny* – chybí u nich hemopexinová doména, štěpí kolageny, želatinu a další, patří sem **MMP-7** (matrilysin-1) a **MMP-26** (matrilysin-2)
- *membránově vázané MMP (MT-MMP)* – jsou aktivovány intracellulárně, patří sem 4 transmembránové proteiny – **MMP-14** (MT1-MMP), **MMP-15** (MT2- MMP), **MMP-16** (MT3-MMP) a **MMP-17** (MT4-MMP) a 2 kotvící proteiny - **MMP-24** (MT5-MMP) a **MMP-**

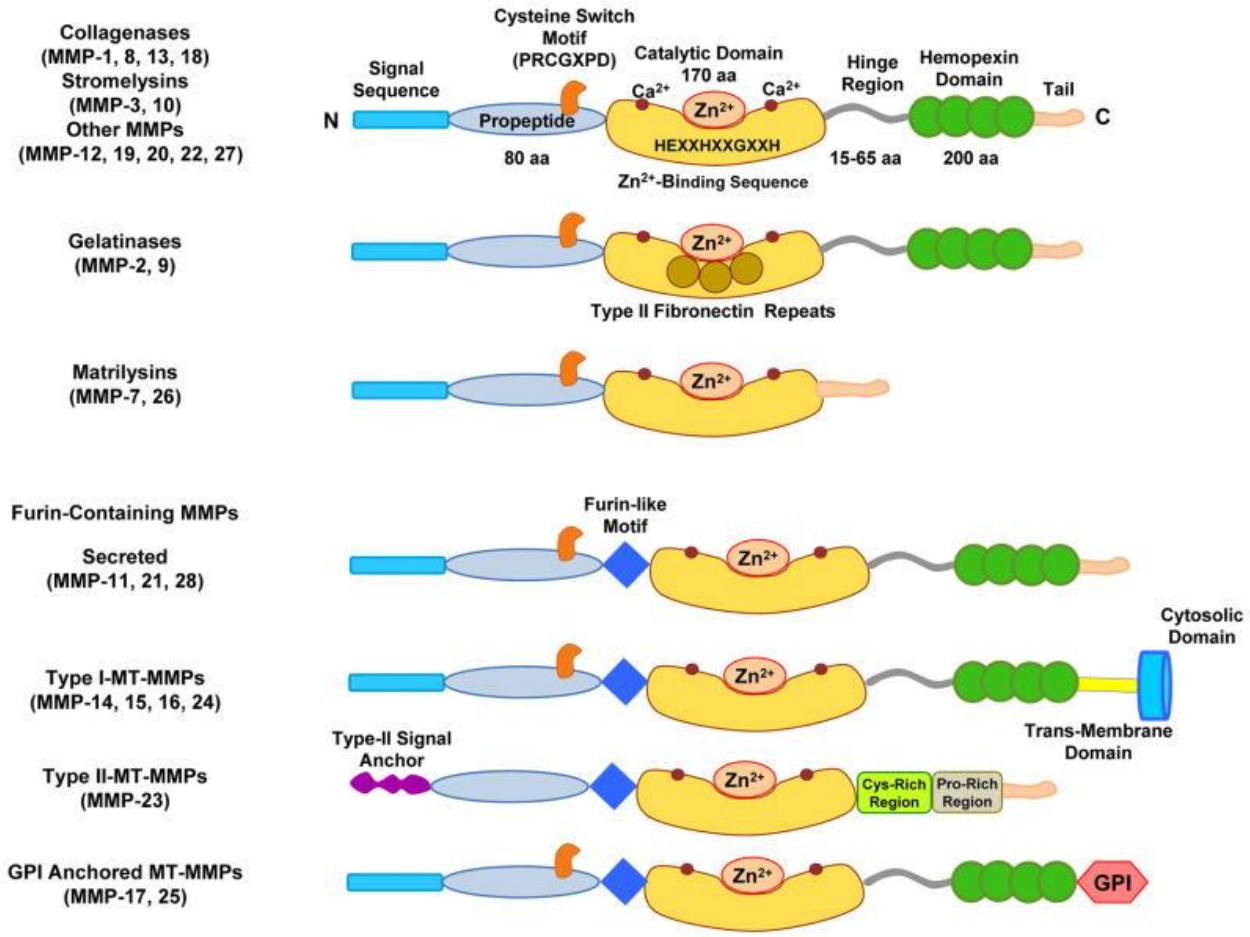
25 (MT6-MMP)

- ostatní MMP – patří sem **MMP-12** (makrofágová metalloelastáza), **MMP-20** (enamelysin), **MMP-23** a **MMP-28** (epilysin). MMP-12 štěpí elastin, kolagen IV, želatinu, laminin, fibrinogen, kasein a další, primárně je exprimována makrofágy a je nezbytná pro jejich migraci (66, 86, 130).

Za fyziologických podmínek je trojšroubovice kolagenu štěpena specifickými proteázami – kolagenázami. Nejdůležitější z nich je kolagenáza -1 (MMP-1), která štěpí nativní, intaktní kolagen typu I-III, což vede ke změně tepelné stability trojšroubovice kolagenu. Tato změna tepelné stability umožňuje dokončení procesu degradace kolagenu dalšími proteázami, a to želatinázami (MMP-2 a MMP-9) (81).

Struktura MMP

Typickou MMP tvoří několik částí – propeptid (signální sekvence a prodoména), dále katalytická metalloproteinázová doména, spojovací peptid (označovaný jako flexibilní závěs) a hemopexinová doména. U želatináz (MMP-2 a MMP-9) se v rámci katalytické domény navíc nachází želatinu vázající oblast – 3 fibronektin typ II „motif, repeats“. V případě MT-MMP je navíc přítomná transmembránová doména (Obr.1) (86).



Obr. 1: Struktura MMP

Regulace MMP

MMP jsou produkovány aktivovanými zánětlivými buňkami (neutrofily, makrofágy), dále keratinocyty, fibroblasty a endoteliemi (37). Většina MMP je uvolňována z buněk do ECM. Výjimku tvoří membránově vázané MMP (MT-MMP), které zůstávají spojeny s BM a hrají důležitou roli v aktivaci jak dalších MMP, tak i v aktivaci TNF (37). MMP jsou secernovány z buněk v neaktivní formě jako proenzymy (pro-MMP), k jejich aktivaci dochází odštěpením propeptidové domény (proteolytická aktivace), a to buď jinými MMP (zejména MT-MMP) nebo serinovými proteázami (endoproteázy obsahující serin v reakčním centru, patří sem plazmin, neutrofilní elastáza, mastocytová chymáza) (37, 80).

Aktivita MMP je přísně regulována. Jednak je řízena na úrovni genové exprese (aktivace nebo suprese), dále je to již výše zmíněná aktivace proenzymu (pro-MMP), a to mechanismem

„cystein-switch“. Posledním mechanismem je regulace enzymatické aktivity - existují 2 hlavní typy endogenních inhibitorů, a to alpha-2-makroglobulin a tkáňové inhibitory MMP (TIMP) (65, 86).

Alpha-2-makroglobulin je plazmatický glykoprotein, který inhibuje většinu proteáz mechanismem endocytózy.

Tkáňové inhibitory MMP (TIMP) jsou specifické inhibitory, které vážou a tím inhibují již aktivované MMP. TIMP tvoří s MMP komplexy a blokují vazebná místa. Rovněž blokují aktivaci pro-MMP (37). U obratlovců byly identifikovány celkem 4 TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4), přičemž nejdůležitější je TIMP-3, který je považován za hlavní regulátor aktivity MMP in vivo (86, 132). V nedávné době proběhla řada klinických studií, které zkoumaly využití syntetických TIMP při léčbě řady nemocí, zejména nádorových onemocnění a revmatoidní artritidy. Syntetické TIMP v těchto studiích nebyly příliš účinné, pravděpodobně vzhledem ke složitým vztahům regulace mezi MMP a jejich inhibitory. Proto se vyvíjejí nové selektivní TIMP, které jsou zaměřeny na identifikaci enzymů zásadních v progresi daného onemocnění (86).

TIMP-2 inhibuje všechny aktivované matrix metaloproteinázy. Kromě toho má schopnost inhibovat neaktivovanou pro-MMP-2. TIMP-2 tvoří třímolekulový komplex s MT1-MMP a pro-MMP a tento komplex zprostředkovává aktivaci pro-MMP-2. Proto je při absenci TIMP-2 znemožněna aktivace pro-MMP-2. Gen pro TIMP-2 se nachází na chromozomu 17q25 (84, 132). Díky vazbě s integrinem α3β1 může TIMP-2 zamezovat angiogenezi.

Kromě endogenních inhibitorů MMP existují i farmakologické inhibitory MMP, např. doxycyklin, chelátory zinku a další, mohou však mít vážnější nežádoucí účinky.

MMP a CVD

V patogenezi CVD hraje roli žilní reflux, který vede k žilní hypertenzi a dilataci žilní stěny. Bylo prokázáno, že chronická žilní hypertenze zvyšuje expresi a aktivitu MMP, které působí na endotelie a hladkou svalovinu v cévních stěnách, vedou k žilní dilataci a brání svalové kontrakci (107, 116). MMP-2 může vést k žilní relaxaci nebo může inhibovat žilní kontrakci (31). Poškozené endotelie aktivují leukocyty, vzniká zánětlivá reakce, jejímž důsledkem je další poškození žilní stěny. V současné době je snaha o nalezení specifických inhibitorů MMP, které by měly minimální nežádoucí účinky a byly by schopny zabránit progresi CVD a rekurenci varixů po operacích (6, 61).

MMP a hojení ran

MMP hrají za fyziologických podmínek velmi důležitou roli v procesu hojení ran, a to ve všech fázích – tj. fázi zánětlivé, proliferační, ve fázi remodelace (2, 37). V zánětlivé fázi štěpí poškozenou ECM a rozrušují biofilm (29). Biofilm je tvořen bakteriemi, které produkují želatinovou ECM chránící bakterie před imunitním systémem. V proliferační fázi se uplatňují při degradaci bazální membrány kapilár, což umožňuje angiogenezu. MMP jsou také nezbytné při migraci keratinocytů, fibroblastů a endoteliálních buněk na spodině rány. Jedná se zejména o MMP-1, která je produkována keratinocyty, štěpí kolagen I, čímž umožňuje pohyb keratinocytů po spodině rány. MMP se také uplatňují ve fázi kontrakce a remodelace jizvy (37).

MMP se objevují v ECM ihned po tkáňovém poškození. Bylo zjištěno, že na rozdíl od akutních ran jsou jejich hladiny u chronických ran mnohonásobně vyšší, protože je snížená hladina jejich tkáňových inhibitorů (TIMP) (117). Chronicky vysoká hladina MMP vede k tomu, že MMP začnou degradovat proteiny, které za normálních okolností nepatří mezi jejich substráty – růstové faktory, receptory a proteiny ECM nezbytné pro hojení rány, např. kolagen (37). Výsledkem je zpomalení hojení rány. Bylo prokázáno, že MMP inaktivují i růstové faktory přidané exogenně, např. rekombinantní z destiček odvozený růstový faktor (PDGF – platelet derived growth factor); proto v řadě klinických studií zjišťujících efekt růstových faktorů měla tato terapie jen omezený úspěch (37).

Některé MMP mají navíc schopnost inaktivovat alpha-2-makroglobulin a alpha-1 proteázový inhibitor, což jsou důležité inhibitory sérinových proteáz (non-MMP) - elastázy a plazminu (37). Vysoké hladiny MMP tak nepřímo vedou k vysokým hladinám plazminu a také neutrofilní elastázy, která vede k degradaci elastinu a fibronektinu. Navíc produkty vzniklé degradací fibronektinu stimulují další uvolňování MMP, čímž vzniká circulus vitiousus (37).

Cílem léčby je proto změnit prostředí chronických ran změnit na prostředí podobné ranám akutním, které se za normálních okolností hojí rychle.

Při hojení ran a vzniku bércového vředu hrají důležitou úlohu zejména MMP-1, MMP-2, MMP-8 a MMP-9 (9).

Želatinázy (MMP-2 a MMP-9)

Mezi želatinázy patří MMP-2 (želatináza A) a MMP-9 (želatináza B). Obě tyto proteázy hrají významnou roli při vzniku bércového vředu. Bylo zjištěno, že v ECM nehojících se ran chybí

intaktní fibronektin (37). Fibronektin je naprosto zásadní adhezívní protein, protože fibroblasty a endoteliální buňky mohou migrovat jen v jeho přítomnosti (81). Bylo prokázáno, že intaktní fibronektin se znovu objeví na spodině rány, pokud se rána začne hojit. U želatináz se v rámci katalytické domény nachází želatinu vázající oblast, což jsou 3 fibronektin typ II opakující se motivy („motif repeats“). Tyto fibronektinové motivy jsou zodpovědné za štěpení kolagenu IV, želatiny a elastinu (132). Navíc, jak již bylo zmíněno, produkty vzniklé degradací fibronektinu stimulují další uvolňování MMP.

Želatinázy jsou považovány za velmi důležité, protože jsou schopny štěpit kolagen mnohem efektivněji než ostatní MMP (137). Želatinázy jsou nezbytné pro remodelaci tkání a také pro zahájení epitelizace.

Polymorfismy promotorových oblastí MMP-2, -9 a -12 byly zkoumány u různých chorob, u kterých destrukce ECM hraje významnou roli, např. u diabetu, onemocnění koronárních artérií aj (9, 95, 105).

Materiál a metody

Charakteristika souboru

Do vyšetřovaného souboru bylo zařazeno postupně celkem 150 pacientů (63 mužů a 87 žen) léčených na I. dermatovenerologické klinice FN u sv. Anny v Brně s diagnózou chronického žilního onemocnění (klinická stadia C2-C6 dle CEAP klasifikace). Průměrný věk pacientů byl 70 let, přičemž u mužů to bylo 73 let a u žen 67 let. Průměrný věk začátku onemocnění byl 43,2 let (48,3 let u mužů a 39,5 let u žen). Zařazeni byli pacienti ve všech klinických stadiích CVD dle CEAP klasifikace, tj. stadium C0-C6. Většina zařazených pacientů však měla závažnější stadia CVD, tedy chronickou žilní insuficienci (stadia C3-C6) – viz Tab.1.

Nejvíce zařazených pacientů trpělo aktivní bércovou ulcerací (stadium C6 – celkem 79 pacientů, z toho 38 mužů a 41 žen) nebo prodělalo bércový vřed v minulosti (stadium C5 – celkem 41 pacientů, z toho 17 mužů a 24 žen). Do stadia C4 (kožní změny při CVD) bylo zařazeno 15 pacientů (8 mužů a 7 žen) a do stadia C3 (flebedém) 12 pacientů (jednalo se jen o ženy). Vylučovací kritéria zahrnovala pacienty s diabetickými a aretiálními ulceracemi.

Recidivující ulcerace udávalo 88 pacientů (35 mužů a 53 žen), záněty žil (povrchové i hluboké) uvedlo v anamnéze shodou okolností také 88 pacientů (37 mužů a 51 žen), erysipely dolních končetin udávalo 56 pacientů (23 mužů a 33 žen). Rodinná anamnéza stran CVD byla

pozitivní u 105 pacientů (39 mužů a 66 žen). Operace varixů byla provedena jen u 21 pacientů (9 mužů a 12 žen). Pacienti byli léčeni pro řadu komorbidit: pro hypertenzi bylo léčeno celkem 105 pacientů (49 mužů a 56 žen), pro ischemickou chorobu srdeční (ICHS) to bylo 50 pacientů (34 mužů a 16 žen), pro diabetes mellitus celkem 51 pacientů (24 mužů a 27 žen). Více než polovina pacientů byla obézních – celkem 81 pacientů (30 mužů a 51 žen). Trombofilní stav byl zjištěn dle anamnézy u 12 pacientů (7 mužů a 5 žen), nádorovým onemocněním trpělo 21 pacientů (11 mužů a 10 žen) (Tab.1).

Tab.1. Charakteristika souboru

	Muži (N=63)	**Ženy (N=87)**	**P-value**
Rok narození (medián, rozmezí)	1943 (1915-1975)	1946 (1923-1990)	0.069
Začátek onemocnění (medián, rozmezí)	44 (21-90)	35 (16-80)	0.0004 P_{corr}=0.01*
Doba trvání ulcerace (měsíce; medián, rozmezí)	2 (0-144)	0 (0-168)	0.434
Dg dle CEAP klasifikace (%)	C1 - 0 C2 - 0 C3 - 0 C4 – 8 (13) C5 – 17 (27) C6 – 38 (60)	C1 – 1 (1) C2 – 2 (2) C3 – 12 (14) C4 – 7 (8) C5 – 24 (28) C6 – 41 (47)	0.580 0.335 0.001 0.462 0.543 0.076
Ulcerace (%)	39 (62)	24 28)	0.050

Recidiva ulcerace (%)	53 (84)	34 (39)	0.312
ICH DKK (%)	27 (43)	20 (23)	0.008
Rodinná anamnéza CVD (%)	39 (62)	68 (78)	0.05
Operace varixů (%)	9 (14)	12 (14)	0.557
Komprese (%)	61 (97)	83 (95)	0.502

Kontrolní soubor tvořilo celkem 227 zdravých osob bez známek kardiovaskulárního onemocnění a diabetu. Průměrný věk a pohlaví pacientů kontrolního a vyšetřovaného souboru byly srovnatelné.

Studie byla provedena v souladu s etickými zásadami Helsinské deklarace a byla schválena Etickou komisí Masarykovy univerzity v Brně. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Genotypizace

Každému pacientovi bylo odebráno 10 ml venózní krve, která byla okamžitě přenesena do kontejnérku s obsahem 0,5ml 0,5M EDTA. Obsah kontejnérku byl ihned pečlivě promíchán a odebraná krev byla uložena do ledničky při teplotě 4°C. Vzorky byly zpracovány ve spolupráci s Ústavem patologické fyziologie LF MU.

DNA byla izolována z periferních leukocytů pomocí opakované centrifugace a proteinázy K. Následně byla provedena polymerázová řetězová reakce a restrikční analýza podle standardizovaných protokolů pro genotypizaci MMP-2, MMP-9 a MMP-12 a TIMP-2. Pro TIMP-2 byly použity primery obsahující v kladném směru sekvenci 5´-GCCCAGGGTGTTCTGGATGG-3´ a v záporném směru 5´-CTCCGGCTGATGGCCCCACT-3. Délka produktu PCR pro TIMP-2 byla 221 bp. Následná restrikční analýza probíhala 4 hodiny ve 2% agarosovém gelu s ethidium bromidem při teplotě 65°C, jež je potřebná pro aktivitu použitého enzymu Bsr1. Po ozáření UV světlem

bylo podle délky fragmentů možné rozeznat 3 genotypy: GG (221 bp), GA (221, 160, 61 bp) a AA (160, 61 bp).

Statistická analýza

Ve všech sledovaných skupinách byla distribuce genotypů a frekvence alel porovnávána pomocí χ^2 testu a Fisher exakt testu. Distribuce genotypů se porovnávala s Hardyho-Weinbergovou rovnováhou pomocí χ^2 testu. Ke stanovení rizikových genotypů a alel jsme počítali odds ratio (OR) s 95% konfidenčním intervalem. Pro zjištění significance OR byl použit Fisher exakt test. Sensitivita a specificita výsledků byla spočítána pomocí Clinical Calculator 1 (http://faculty.vassar.edu/lowry/clin1.html). Používali jsme programový balík Statistica v. 12.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK)

Výsledky a diskuze

Asociační case-control studie

MMP-2 rs 243864 (-790 T/G, promoter)

Byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl mezi frekvencí MMP-2 -790 T/G alel a genotypů u mužů s CVD a kontrolní skupinou (Pa = 0,02; Pg = 0,01). Mutovaná G alela polymorfismu MMP-2 -790 T/G byla u mužů s CVD 1,85 krát častější než u kontrolní skupiny (46/80 vs. 55/177, P = 0,008, Pcorr = 0,03, OR = 1,85 (1,154-2,968), senzitivita 0,365, specificita 0,763, síla testu 0,693). Genotyp žen byl v souladu s Hardy–Weinbergovým zákonem a tyto souvislosti nebyly zjištěny (Tab. 2).

V literatuře jsme nenašli práci, která by se zabývala polymorfismem MMP-2-790/T/G v souvislosti s CVD. Wallace et al zkoumala polymorfismy genů hrajících roli při normálním hojení ran nebo při regulaci zánětlivých procesů (135). Mezi vybranými polymorfismy byl i polymorfismus MMP-2 (-1306 C/T). Byla provedena asociační case-control studie, do které bylo zařazeno 181 pacientů s anamnézou venózní bércové ulcerace a 181 zdravých kontrol. Nebyla prokázána souvislost polymorfismu MMP-2 (-1306 C/T) s bércovou ulcerací.

Gormus et al. zkoumali 2 funkční genové polymorfismy -735 C/T MMP-2 a -1306 C/T MMP-2, které jsou ve vazebném disequilibriu s MMP-2 (-790 T/G), a jejich vliv na vznik varixů a na expresi mRNA MMP-2 (38). Bylo zjištěno, že polymorfismus MMP-2 -735C/T

byl častější u pacientů s varixy než v kontrolní skupině. CC genotyp a C alela MMP-2 -735 genu byly častější v kontrolním souboru. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v polymorfismu -1306 C/T MMP-2. Rovněž nebyl zjištěn signifikantní vliv MMP-2 polymorfismu na expresi mRNA. Hladiny mRNA MMP-2 byly vyšší ve skupině pacientů s varixy dolních končetin a ICHS než u pacientů s varixy bez přítomnosti ICHS.

MMP-2 hraje významnou roli v progresi CVD a při vzniku bércového vředu. MMP-2 může vést k žilní relaxaci nebo k inhibici žilní kontrakce (31). Dále bylo zjištěno, že MMP-2 ovlivňuje remodelaci ECM zejména u vaskulárních struktur (38). V exsudátu chronických ran byly zjištěny vyšší koncentrace MMP-2, což korelovalo s pomalejším hojením (72). Nehojící se venózní bércové ulcerace jsou asociovány s vyšší hladinou MMP-2 a nižší hladinou TIMP-2 v exsudátu (85). Dále byly prokázány vyšší hladiny MMP-2 a MMP-9 u experimentálně indukované žilní hypertenze (72).

MMP-9 rs 3918242 (-1562 C/T, promoter)

Byly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly mezi frekvencí MMP-9 -1562 C/T alel a distribucí genotypů mezi pacienty s CVD a kontrolní skupinou (Pa = 8.9 x 10 -6; Pg = 9.4 x 10-6), a to jak u mužů, tak u žen. T alela byla 2,571 krát častější u pacientů s CVD (jak u mužů, tak u žen) než u kontrol, a to s klinicky signifikantní specificitou (61/239 vs. 41/413, P = 0,0000009, OR = 2,571 (1.678-3.939), senzitivita 0,203, specificita 0,910, síla testu 0,984, Tab. 2).

MMP-9 (rs3918242) 279 R/Q

V case-control studii nebyly zjištěny statisticky signifikantní výsledky (Tab. 2).

V naší studii jsme prokázali vysoce signifikantní asociaci MMP-9 -1562C/T polymorfismu s CVD. Zjistili jsme, že alela T je 2,571x častější u pacientů s CVD (stejně u mužů i žen) než u kontrol, a to s vysokou specifitou 0,910 a vysokou sílou testu 0,984. Funkční SNP -1562C/T v promotorové oblasti genu MMP-9 může regulovat hladinu exprese MMP-9 tak, že dochází ke zvýšené expresi na úrovni transkripce. Vyšší exprese T alely vede ke zvýšené produkci MMP-9 s následnou zvýšenou degradací ECM (119, 139). MMP-9 vykazuje proteolytickou aktivitu ke kolagenu IV, který je hlavní složkou bazální membrány v cévní stěně (136). Pacienti, kteří jsou nosiči T alely, mohou tedy mít vyšší hladiny MMP 9, s následnou zvýšenou degradací nejen ECM, ale i kolagenu IV, což může mít za následek poškození cévní

stěny, vznik zánětu a ve svém důsledku vznik CVD.

Xu et al. zkoumal možnou asociaci mezi polymorfismy MMP-9 a TIMP-2 a rizikem vzniku varixů v čínské populaci (138). Byla zjištěna statisticky signifikantní souvislost polymorfismu MMP-9-1562 C/T a TIMP-2 -418G/C a pacienty s varixy ve srovnání s kontrolami. Dle této studie je CC genotyp asociován s pacienty s varixy ve srovnání s kontrolním souborem. Tento výsledek se liší od našich závěrů, což lze vysvětlit zejména rozdílným složením souborů pacientů. V našem souboru převažovali pacienti s pokročilejšími stadii CVD, zejména C5 a C6 dle CEAP klasifikace.

Kunt et al. zkoumal vztah mezi polymorfismy MMP-9 -1562 C/T a TIMP-2 -418G/C a rizikem vzniku varixů v turecké populaci (63). Nebyla zjištěna statisticky signifikantní souvislost mezi frekvencí alel a genotypů MMP-9 mezi pacienty a kontrolní skupinou. Rozdílné výsledky této a čínské studie (138) mohou být vysvětleny rozdílnou populací a rozdílnou frekvencí genotypů – v turecké populaci nebyl nalezen CC genotyp ani mezi pacienty, ani mezi kontrolami.

Řada studií prokázala asociaci MMP-9 -1562C/T polymorfismu s několika kardiovaskulárními chorobami jako fibrilace síní, ateroskleróza, ICHS, ateroskleróza karotid (139). Wang et al. (2011) prokázal asociaci MMP-9 -1562C/T polymorfismu s vyšším rizikem akutního koronárního syndromu (ACS) v ujgurské populaci v Číně (136). MMP-9 je vysoce exprimována ve vulnerabilní oblasti aterosklerotického plátu a hraje zásadní roli ve vaskulární remodelaci a vzniku aterosklerotického plátu. Zmíněná studie zkoumala asociaci mezi dvěma polymorfismy MMP-9 -1562C/T a MMP-9 (R279Q) u pacientů s akutním koronárním syndromem. Bylo zjištěno, že MMP-9-1562 C/T polymorfismus byl signifikantně asociován s ACS - frekvence CT a TT genotypů u pacientů s ACS byla signifikantně vyšší než v kontrolním souboru. Naopak MMP-9 (R279Q) polymorfismus nebyl spojen s vyšším rizikem ACS.

Yang et al. (2015) provedl systematický přehled a meta-analýzu možné souvislosti mezi MMP-9 -1562C/T polymorfismem a hypertenzí (139). Bylo zjištěno, že MMP-9 -1562C/T polymorfismus je asociován s hypertenzí (alelický model, T vs. C, OR=1,36 (1,17-1,59), P<0.0001). Stejná asociace byla pozorována u modelu dominantního (TT+CT vs. CC, OR=1.30(1.10-1.54), P=0.002) a kodominantního (CT vs. TT+CC, OR=1.27 (1.05-1.53), P=0.01), nebyla však zjištěna u recesívního modelu (TT vs. CT+CC, OR=1.30(0.50-3.36), P=0.59). Zvýšené riziko hypertenze je tedy na základě těchto genetických modelů způsobeno CT genotypem.

Singh et al. (2013) zkoumal souvislost MMP-9 -1562C/T polymorfismu s diabetem 2. typu a diabetickými ulceracemi v indické populaci (119). Bylo zjištěno, že distribuce alel se signifikantně liší u pacientů a u kontrolního souboru. Pacienti s diabetickými ulceracemi mají vyšší expresi T alely. Byla tedy prokázána výrazná asociace MMP-9 -1562C/T polymorfismu s diabetem 2. typu a diabetickými ulceracemi v indické populaci. MMP-9 -1562C/T polymorfismus vede ke zvýšené expresi na úrovni transkripce, což vede ke zvýšené produkci MMP-9, a tím ke zvýšené degradaci ECM.

MMP-9 je pokládána za hlavní proteázu v degradaci ECM u chronických ran (137). Je nezbytná pro migraci keratinocytů, reepitelizaci a angiogenezi. V exsudátu chronických ran byla zjištěna výrazně vyšší hodnota MMP-9 (137). Bylo prokázáno, že vysoké hladiny MMP-9 korelují s pomalejším hojením ran (63, 75, 110, 137). Adekvátní hladina MMP-9 je zásadní pro proces epitelizace. MMP-9 štěpí hlavní složku BM – kolagen IV, a tím umožňuje separaci keratinocytů z BM a jejich následnou migraci po spodině rány (136). Při nízké hladině MMP-9 dochází ke zpomalení epitelizace, při vyšší hladině MMP-9 dochází ke zpomalení hojení rány (137). Hladiny MMP-9 jsou vysoké u pacientů s varixy a u pacientů s venózními bércovými vředy (8). Deatrick et al. zjistili, že MMP-9 ovlivňuje remodelaci žil tím, že moduluje obsah kolagenu v žilní stěně, a tím přispívá k zánětu a fibróze (21).

Ligi et al. nedávno zkoumal zánětlivé a proteolytické biomarkery při hojení ran u CVD (70, 71). V rámci studie byly hodnoceny cytokinové profily v exsudátu z žilních bércových vředů v různých fázích hojení. Bylo zjištěno, že exsudát během zánětlivé fáze hojení žilních bércových vředů obsahuje signifikantně vyšší koncentrace MMP-2, MMP-9, MMP-12, TIMP-1 a TIMP-2 než exsudát z granulační fáze hojení. Dále bylo prokázáno, že exsudát z granulační fáze hojení žilních bércových vředů obsahuje signifikantně vyšší hladiny MMP-1, MMP-7, MMP-13 a TIMP-4 ve srovnání s exsudátem v zánětlivé fázi (70, 71).

Caimi et al. hodnotili plazmatické koncentrace želatináz (MMP-2 a MMP-9) a jejich inhibitorů (TIMP-1 a TIMP-2) u pacientů s venózními bércovými vředy před a po aplikaci kompresívní terapie (15). Plazmatické koncentrace želatináz a jejich inhibitorů a poměr MMP-2/TIMP-2 byly signifikantně vyšší u pacientů s venózními bércovými vředy ve srovnání s kontrolním souborem. Po aplikaci komprese a zahojení bércových vředů došlo k poklesu hladin MMP-9 a TIMP-1 a ke snížení poměru MMP-2/TIMP-2, ale ve srovnání s kontrolami byly hladiny MMP stále vyšší.

Výhledově plánujeme vyšetření exsudátu bércových ulcerací u pacientů zařazených do této studie a určení hladiny příslušných MMP.

MMP-12 rs 7123600 (G/A, Intron)

Bylo zjištěno, že frekvence MMP-12 alel a genotypů se statisticky signifikantně lišily mezi ženami s CVD a kontrolní skupinou (Pa = 0,02; Pg = 0,07). Mutovaná alela G byla zjištěna 2,082x častěji u žen s CVD než u kontrol (P=0,02), a to se statisticky signifikatní specificitou (27/147 vs. 18/204, P = 0,02, OR = 2,082 (1.105 – 3.920), senzitivita 0,155, specificita 0,919, síla testu 0,636, Tab. 2).

MMP-12 (makrofágová metalloelastáza) je secernována aktivovanými makrofágy a štěpí několik komponent ECM (elastin, kolagen IV, želatinu, laminin, fibrinogen, kasein), čímž umožňuje migraci makrofágů (35). MMP-12 také může blokovat angiogenezu, a to přeměnou plazminogenu na angiostatin, což je účinný inhibitor angiogeneze (35).

Rovněž byl popsán podíl MMP-12 na vzniku aneurysmat a plicního emfyzému (86).

Gemmati et al. (2009) zkoumal polymorfismus MMP-12 -82A/G u pacientů s CVD (35). Zjistil, že AA genotypy mají vyšší riziko vzniku žilních bércových vředů (OR=1,96 (1,18-3,22), P=0,01). Dále bylo prokázáno, že pacienti s MMP-12 -82GG genotypem mají signifikantně (P=0,001) menší průměrnou velikost bércových vředů než pacienti s -82AA a -82AG genotypy (2x menší). Jedná se paradox protektivního efektu SNP – specifické genotypy vedou k rychlejšímu hojení (9). Předpokládá se, že A alela vede k vyšší hladině MMP-12 v ranách pacientů ve srovnání s G alelou. Pacienti s GG genotypy mají nižší hladiny MMP-12 v ráně, a tím i menší velikost bércových vředů. MMP-12 -82A/G polymorfismus může hrát roli i v progresi ulcerací a také u jiných onemocnění, která jsou způsobena degradací ECM (kardiovaskulární onemocnění, endometrióza, nádory plic).

TIMP-2 rs8176329

Při porovnávání kontrolního souboru pacientů a souboru pacientů s diagnostikovaným chronickým žilním onemocněním nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl v distribuci genotypů (Pg) ani ve frekvenci alel (Pa). Nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi muži a ženami, ani rozdíly mezi zdravými a nemocnými (Tab. 2).

Tab.2: Výsledky asociační case-control studie pro jednotlivé polymorfismy

	MMP-2 (-790 T/G), rs243864						
Genotypy a alely	**TT (%)**	**TG (%)**	**GG (%)**	**P_g**	T	G	**P_a**
Pacienti s CVD Muži (N=63)	25 (40)	30 (47)	8 (13)	**0.02**			**0.01**
Kontrolní soubor Muži (N=116)	71 (61)	35 (30)	10 (9)				
Pacienti s CVD Ženy (N=87)	40 (46)	27 (31)	20 (23)	HWD			HWD
Kontrolní soubor Ženy (N=111)	60 (54)	35 (32)	16 (14)				
	MMP-9 (-1562 C/T), rs3918242						
Genotypy a alely	**CC (%)**	**CT (%)**	**TT (%)**	**P_g**	C	T	**P_a**
Pacienti s CVD Muži (N=63)	38 (60)	23 (37)	2 (3)	**0.0008**			**0.0002**
Kontrolní soubor Muži (N=116)	99 (85)	16 (14)	1 (1)				
Pacienti s CVD Ženy (N=87)	55 (63)	30 (35)	2 (2)	**0.007**			**0.01**
Kontrolní soubor Ženy (N=111)	91 (82)	17 (15)	3 (3)				
Pacienti s CVD - všichni (N=150)	93 (62)	53 (35)	4 (3)	**9.4×10^{-6}**	0.80	0.20	**8.9×10^{-6}**
Kontrolní soubor– všichni (N=227)	190 (84)	33 (15)	4 (1)		0.91	0.09	
	MMP-9 279 R/Q						
Genotypy a alely	GG (%)	GA (%)	AA (%)	P_g	A	G	P_a
Pacienti s CVD	24 (38)	28 (44)	11 (18)	0.984	0.60	0.40	0.996

Muži (N=63)							
Kontrolní soubor Muži (N=116)	45 (39)	50 (43)	21 (18)		0.60	0.40	
Pacienti s CVD Ženy (N=87)	33 (38)	36 (41)	18 (21)	0.395	0.59	0.41	0.145
Kontrolní soubor Ženy (N=111)	52 (47)	42 (38)	17 (15)		0.66	0.34	
	MMP-12, rs7123600						
Genotypy a alely	**AA (%)**	**AG (%)**	**GG (%)**	**P_g**	A	G	**P_a**
Pacienti s CVD Muži (N=63)	52 (83)	8 (13)	3 (4)	HWD			HWD
Kontrolní soubor Muži (N=116)	98 (84)	16 (14)	2 (2)				
Pacienti s CVD Ženy (N=87)	62 (71)	25 (28)	1 (1)	**0.07**	0.85	0.15	**0.02**
Kontrolní soubor Ženy (N=111)	93 (84)	18 (16)	0 (0)		0.92	0.08	
	TIMP-2, rs8176329						
Genotypy a alely	GG (%)	GA (%)	AA (%)	P_g	G	A	P_a
Pacienti s CVD Muži (N=63)	47 (75)	16 (25)	0 (0)	0.317	0.83	0.13	0-585
Kontrolní soubor Muži (N=116)	93 (83)	21 (17)	2 (0)		0.89	0.11	
Pacienti s CVD Ženy (N=87)	72 (83)	15 (17)	0 (0)	-	0.91	0.09	0.380
Kontrolní soubor Ženy (N=111)	97 (87)	14 (13)	0 (0)		0.94	0.06	

Studie genotyp – fenotyp

V naší studii **genotyp-fenotyp** bylo zjištěno, že bércová ulcerace je asociována s G alelou MMP-2-790 T/G polymorfismu a rovněž s AG genotypem rs7123600 MMP-12 polymorfismu. AG genotyp MMP-12 polymorfismu vede k téměř 5x vyššímu riziku vzniku žilních bércových vředů u mužů ve srovnání s ženami. Tento výsledek je vysoce klinicky specifický.

Dále byla zjištěna signifikantní asociace s obezitou (T alela MMP-2 -790 T/G, Q alela MMP-9 R279Q polymorfismu).

MMP-2-790/T/G:

Ženy s CVD a mutovanou alelou G v MMP-2 -790 T/G polymorfismu mají 2,539x častěji ulcerace (model alelický, 41/41 vs. 66/26, P=0,0026, Pcorr =0,01, OR=2,539 (1,356-4,753), senzitivita 0,500, specificita 0,717, síla testu 0,812). U mužů jsou rozdíly mezi oběma skupinami nesignifikantní. Nesignifikantní jsou také rozdíly mezi skupinami mužů a žen s CVD.

Dále jsme zjistili, že ženy s CVD a mutovanou alelou G v MMP-2 -790 T/G polymorfismu vyžadují 2,967 krát častěji domácí péči (home care) oproti ženám s CVD a jinými MMP-2 genotypy (alelický model, 11/17 vs. 96/50, OR = 2,967 (1,291-6,818), P = 0,0083, Pcorr = 0,03; senzitivita 0,393, specificita 0,342, síla testu = 0,713). Tyto výsledky odpovídají skutečnosti, že ženy s ulceracemi častěji potřebují zajištění domácí péče. U mužů nebyly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly. Nesignifikantní jsou také rozdíly mezi skupinami mužů a žen s CVD.

MMP-9 (R279Q)

Zjistili jsme, že u pacientů s CVD je mutovaná alela Q v MMP-9 R279Q polymorfismu je statisticky signifikantně asociována s obezitou. Dle alelického modelu byla mutovaná Q alela přítomna 1,767x častěji u obézních pacientů s CVD oproti štíhlým pacientům s CVD (alelický model, 92/46 vs. 86/76, P=0,0115, Pcorr=0,05, OR=1,767 (1,105-2,827), senzitivita 0,469, specificita 0,667, síla testu = 0.313).

MMP-9-1562 C/T

Souvislost mezi polymorfismem genu pro MMP-9 a obezitou u pacientů s CVD byla

potvrzena i dalším vyšetřením. Pacienti s CVD s heterozygotní variantou polymorfismu MMP-9-1562 C/T jsou 2,789x častěji obézní než pacienti s CVD a oběma homozygotními genotypy MMP-9 (model „výhoda heterozygota“, CT vs. (CC+TT): 16/53 vs 37/44, P=0,0032, Pcorr=0,01, OR=2,789 (1,370-5,664), senzitivita 0,457, specificita 0,768, síla testu = 0,799).

U obézních pacientů dochází ke komplikovanému hojení ran, a to z řady příčin. U obézních pacientů je snížena tkáňová perfúze a oxygenace, dále je to vyšší intraabdominální tlak, imobilizace, infekce, často dlouhodobá hospitalizace (81). Role obezity při vzniku žilních bércových vředů byla potvrzena i rozsáhlými longitudinálními studiemi (Framinghamská a Bonnská studie) (9).

MMP-12 rs7123600

Bylo zjištěno, že mutovaná alela G v polymorfismu MMP-12 se vyskytuje 3,167x častěji u žen s CVD a bércovou ulcerací oproti ženám s CVD bez ulcerace, a to s vysokou specificitou (model alelický, 84/8 vs. 63/19, P=0,0074, Pcorr=0,03, OR=3,167 (1,303-7,698), senzitivita 0,232, specificita 0,913, síla testu 0,669). Je to dáno zejména vyšší incidencí heterozygotních genotypů u žen s ulceracemi. U mužů jsou rozdíly mezi oběma skupinami nesignifikantní. Nesignifikantní jsou také rozdíly mezi skupinami mužů a žen s CVD.

Dále bylo provedeno srovnání distribuce genotypů mezi muži a ženami s CVD s klinickým stadiem C6, tj. s aktivním bércovým vředem. Bylo zjištěno, že u mužů s aktivním bércovou ulcerací je 4,675x vyšší incidence heterozygotního AG genotypu v rs7123600 MMP-12 polymorfismu ve srovnání s ženami s CVD a bércovou ulcerací (model „výhoda heterozygota“, AG vs. (AA+ GG): 5/33 vs 17/24, P=0,0047, Pcorr=0,02, OR=4,675 (1,514-14,433), senzitivita 0,115, specificita 0,868, síla testu = 0.687). Tento výsledek je významně klinicky specifický - 0,868.

TIMP-2 rs8176329

Pacienti s chronickým žilním onemocněním mají 3,55krát častěji pozitivní rodinnou anamnézu CVD, pokud mají genotyp AG. Tento test je významně klinicky specifický se specificitou 0,91. Lze tedy říci, že pacient nemá s vysokou pravděpodobností pozitivní rodinnou anamnézu CVD, pokud nemá genotyp AG (model „výhoda heterozygota“, 27/78 vs. 4/41, OR = 3,55 (1,16-10,83), P = 0,01, Pcorr = 0,04, senzitivita 0,262, specificita 0,911, síla testu 0,580) (Tab. 3).

Pacienti s diagnostikovaným chronickým žilním onemocněním mají 3,65krát častěji nádor, pokud mají genotyp AG, oproti pacientům s genotypem GG. Tento test je klinicky významně specifický se specificitou 0,829, existuje tedy vysoká pravděpodobnost, že pacient s CVD nemá nádor, pokud nemá genotyp AG (model „výhoda heterozygota“, 9/12 vs. 22/107, OR = 3,65 (1,37-9,70), P = 0,01, Pcorr = 0,04, senzitivita 0,429, specificita 0,829, síla testu 0,657) (Tab. 3).

Tab.3: TIMP-2 rs 8176329 a rodinná anamnéza CVD a osobní anamnéza tumoru

Rodinná anamnéza CVD	TIMP-2 rs8176329 GG	TIMP-2 rs8176329 AG	Celkem
Negativní	41 (91%)	4 (9%)	45
Pozitivní	78 (74%)	27 (26%)	105
Všechny skupiny	119	31	150
Osobní anamnéza tumoru			
Negativní	107 (83%)	22 (17%)	129
Pozitivní	12 (57%)	9 (43%)	21
Všechny skupiny	119	31	150

Polymorfismy genů mohou hrát důležitou roli při vzniku žilního bércového vředu. Genetický screening může pomoci rozlišit pacienty s CVD s vysokým rizikem vzniku bércového vředu a pacienty s pomalým hojením ulcerace, a tím individualizovat léčebný plán u každého pacienta. Detekce rizikových variant genů může vést k rychlejšímu zavedení preventivních opatření a včasné léčbě pacientů s CVD, zabránit tak vzniku bércových vředů a výrazně zlepšit kvalitu života pacientů.

II. Terapie chronických bércových ulcerací venózní etiologie - kultivované epidermální keratinocyty

1. Slonková V, Kino-Oka M, Mazza S, Nievergelt C, Prenosil JE, Burg G, Hafner J: Cultured epithelial autografts for the management of a chronic pretibial leg ulcer due to congenital valvular aplasia. Dermatology 1999; 198: 101-103.

   (kvantitativní podíl uchazeče - 70% - klinické vyšetřování, podíl na léčbě pacienta, vyhledávání a analýza literatury, příprava textu publikace)

2. Slonková V, Navrátilová Z, Semrádová V: Kultivované epidermální keratinocyty v terapii bércových ulcerací - část I. Čs Derm 2002; 77: 168-171.

   (kvantitativní podíl uchazeče - 70% - koncept, sběr a analýza dat, klinické vyšetřování pacientů, léčba pacientů, vyhledávání a analýza literatury, text publikace)

3. Slonková V, Navrátilová Z, Semrádová V: Kultivované epidermální keratinocyty v terapii bércových ulcerací - část II. Srovnání účinnosti kryoprezervovaných a lyofilizovaných allograftů. Čs Derm 2002; 77: 239-244.

   (kvantitativní podíl uchazeče - 70% - koncept, sběr a analýza dat, klinické vyšetřování pacientů, léčba pacientů, vyhledávání a analýza literatury, příprava textu publikace)

4. Navrátilová Z, Slonková V, Semrádová V, Adler J: Cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of leg ulcers (a pilot study). J Eur Acad Dermatol Venereol 2004; 18: 173-179.

   (kvantitativní podíl uchazeče - 60% - sběr a analýza dat, klinické vyšetřování pacientů, léčba pacientů, vyhledávání a analýza literatury, příprava části textu publikace)

5. Slonková V, Navrátilová Z, Semrádová V, Adler J: Successful treatment of chronic venous leg ulcers with lyophilized cultured epidermal allografts. Acta Dermatoven APA 2004; 13:119-123.

   (kvantitativní podíl uchazeče - 80% - sběr a analýza dat, klinické vyšetřování a léčba pacienta, vyhledávání a analýza literatury, text publikace)

První zkušenosti s aplikací kultivovaných epidermálních keratinocytů jsem získala během tříměsíční stáže na Dermatologische Klinik, Universitats Spital Zurich ve Švýcarsku v roce 1998. Spolupracovala jsem na projektu "Aplikace kultivovaných epidermálních autograftů v terapii venosních ulcerací – randomizovaná kontrolovaná studie". Pacientům s chronickými bércovými ulceracemi byly aplikovány kultivované epidermální autografty. První práce je dílčím výsledkem tohoto projektu. Jedná se o kazuistické sdělení popisující úspěšnou aplikaci autologních KEC mladému pacientovi s chronickou bércovou ulcerací, která vznikla na podkladě vzácné kongenitální valvulární aplázie.

V letech 2000-2002 probíhala na I. dermatovenerologické klinice LF MU a FN u sv. Anny v Brně klinická studie „Kryoprezervované a lyofilizované kultivované epidermální allografty v terapii bércových ulcerací (pilotní studie)“, podporovaná grantem IGA MZ ČR č. 5876-3. Jednalo se o první aplikaci lyofilizovaných kultivovaných epidermálních alograftů v indikaci venózních bércových ulcerací v České republice. Do studie bylo zahrnuto celkem 50 pacientů s venózními bércovými ulceracemi. Výsledky této studie byly publikovány v několika recenzovaných českých časopisech i v zahraničních časopisech s IF.
První výsledky (pilotní studie) byly publikovány v recenzovaném českém časopise Československá dermatologie v r. 2002. Článek byl rozdělen do dvou částí, první část se věnovala obecně významu kultivovaných epidermálních keratinocytů při léčbě venózních bércových ulcerací, ve druhé části byly shrnuty výsledky studie u 20 pacientů.
Souhrnné výsledky pak byly publikovány v JEADV r. 2004. Za článek byla našemu kolektivu autorů udělena Cena prof. Janovského za přínos pro rozvoj české dermatovenerologie za rok 2004. Tento článek má celkem 14 citací, přičemž na naši práci navázali někteří zahraniční autoři.
Dále byla publikována kazuistika 67leté ženy s 4 roky trvající bércovou ulcerací, která se po aplikaci KEA zhojila během 40 dnů a pacientka mohla podstoupit nezbytnou operaci kolenního kloubu pro gonartrózu.

Stav problematiky

Bércové ulcerace představují závažný zdravotní problém. Jejich prevalence se ve vyspělých zemích udává 1% dospělé populace (39, 115). Incidence stoupá s věkem, v populaci starší 50

let se udává 0,3 na 1000 obyvatel (91, 109). Jedná se o chronické onemocnění - 60 % ulcerací trvá déle než 6 měsíců, 33 % se hojí déle než 1 rok (42). Závažný je i fakt, že u 2/3 pacientů dojde nejméně 1x k recidivě ulcerace (90, 91). Bércové vředy výrazně snižují kvalitu života pacientů, jak bylo prokázáno řadou studií (19).

Bércové ulcerace jsou definovány jako defekt kůže, případně i podkoží, různé etiologie lokalizovaný v oblasti bérce. Největší skupinu tvoří bércové ulcerace venózní etiologie, které představují nejtěžší stadium CVD (stadium C6 dle CEAP klasifikace). Venózní bércové ulcerace tvoří asi 75 % všech ulcerací, z toho ve 20-25 % případů se jedná o tzv. smíšené neboli arteriovenozní ulcerace – kromě venózního postižení je přítomno i postižení arteriální, tj. ICH DKK (4, 109).

Terapii žilních bércových vředů lze rozdělit na konzervativní a radikální (92). Konzervativní terapie zahrnuje především lokální terapii ulcerace, důslednou kompresivní terapii, celkovou terapii venoaktivními léky a režimová opatření (1, 102, 108). Mezi radikální léčbu patří skleroterapie, klasická chirurgická léčba a v posledních letech velmi používané mini-invazívní metody, např. radiofrekvenční ablace či endovaskulární laser (58, 92, 103).

Lokální léčba bércových ulcerací vychází z obecných principů hojení ran a má několik fází – příprava spodiny rány (debridement), potlačení infekce a zánětu, udržení vlhkého prostředí v ráně a podpora epitelizace (103). Hojení ran ve vlhkém prostředí znamená vytvořit a udržet optimální hydrataci rány. Vlhké prostředí vytváří vhodné podmínky pro hojení rány, zajišťuje účinnou metabolickou aktivitu buněk, jejich vzájemnou interakci a vytváří podmínky pro uplatnění růstových faktorů. V současné době je k dispozici velká škála krytí umožňujících hojení ran ve vlhkém prostředí. Jedná se o hydrokoloidy, polyuretanové pěny, transparentní filmy, hydrogely, dále absorpční krytí – algináty, hydrovlákna, dále krytí s aktivním uhlím, krytí obsahující antiseptika, mokrá krytí aj. (123, 128).
Většina bércových ulcerací venózní etiologie se při adekvátní terapii hojí rychle – 2/3 jsou zhojeny do 24 týdnů. Avšak asi 20 % ulcerací nejeví známky hojení ani při nejlepší péči – jsou to tzv. “hard-to-heal ulcers" (obtížně zhojitelné vředy). Čím déle ulcerace trvá a čím je větší, tím horší je prognóza stran rychlého zhojení. Špatnou prognózu mají ulcerace větší než 10 cm^2 a trvající déle než 6 měsíců (30, 79). Pro tyto ulcerace byla v poslední době vyvinuta tzv. aktivní krytí, která představují nejmodernější krycí prostředky. Mezi aktivní krytí se řadí zejména prostředky s inhibitory matrix metalloproteináz, kolagenová krytí, krytí s kyselinou

hyaluronovou, růstové faktory a kožní náhrady (17, 52, 67, 122). Mezi kožní náhrady patří i kultivované epidermální keratinocyty mohou být alogenní (alografty) nebo autologní (autografty). Jsou k dispozici ve formě nativní, kryoprezervované nebo lyofilizované. Hlavní mechanismus účinku kultivovaných keratinocytů při hojení chronických ran spočívá zřejmě v tom, že uvolňují řadu cytokinů, které stimulují migraci a proliferaci reziduálních hostitelských keratinocytů z okrajů rány a z kožních adnex a rovněž modulují replikaci fibroblastů a syntézu kolagenu.

Kultivované epidermální keratinocyty v podobě autograftů či alograftů se používají v léčbě ran od 80. let 20. století. Základem metody byla práce Rheinwalda a Greena (1975), kterým se podařilo překonat omezení v proliferaci savčích buněk subkultivací humánních epidermálních keratinocytů v kultuře in vitro, což umožnilo mnohonásobně tyto buňky pomnožit (113). Metoda byla dále zdokonalena (40) a v roce 1981 v USA byly poprvé použity kultivované autologní keratinocyty u mladého pacienta s těžkými popáleninami, a to s velmi dobrým efektem (93). O dva roky později byly publikovány výsledky prvního použití kultivovaných epidermálních alograftů u popáleného pacienta (45). V terapii chronických bércových vředů byly KEC poprvé použity r. 1986 (44, 69). Postupně se KEC začaly využívat v širokém měřítku v popáleninové medicíně (13, 22, 28, 125), dále při terapii kongenitálních névů, tetováží a některých forem epidermolysis bullosa (16, 34, 98, 111).
Mechanismus účinku kultivovaných epidermálních alograftů dosud není plně objasněn. Zpočátku se někteří vědci domnívali, že alografty představují trvalé kožní kryty (45, 129). Vycházeli z toho, že nepřítomnost Langerhansových buněk v alograftech zabezpečuje toleranci štěpu proti HLA. Brzy se však ukázalo, že alografty jsou rychle kolonizovány Langerhansovými buňkami (101) a že dochází k odhojení alograftů jak u zvířat (25), tak u lidí (101). Pomocí analýzy DNA bylo prokázáno, že alogenní keratinocyty jsou postupně nahrazovány hostitelskými buňkami (3, 11, 14). Hlavní mechanismus účinku kultivovaných keratinocytů při hojení chronických ran spočívá zřejmě v tom, že uvolňují řadu cytokinů, které stimulují migraci a proliferaci reziduálních hostitelských keratinocytů z okrajů rány a z kožních adnex a rovněž modulují replikaci fibroblastů a syntézu kolagenu (5, 20, 23, 82, 112). Mezi nejdůležitější cytokiny produkované KEC patří EGF, TGF-alfa, beta, IL-1 a další. Vzhledem k tomu, že v současné době není známo zastoupení všech cytokinů ani jejich vzájemný poměr, ani přímá aplikace cytokinů nepřináší výsledky srovnatelné se sekrecí dárcovské epidermální buňky (23). Epitelizace začíná většinou z okrajů rány (tzv. „edge

effect“), což souvisí s popsaným mechanismem účinku (stimulace migrace hostitelských keratinocytů). Vzácnější tvorba epitelizačních ostrůvků v centru rány je důsledkem migrace hostitelských keratinocytů ze zbytků kožních adnex (5, 20, 68, 73, 78, 104).

Ve studii byla srovnávána účinnost kryoprezervovaných a lyofilizovaných kultivovaných epidermálních alograftů. Kryoprezervace je proces, při kterém dojde k prosycení buněk kultivačním médiem a následnému zmrazení. Keratinocyty jsou skladovány při teplotě -80°C až -150°C. Výhodou je, že kryoprezervované štěpy mohou být vytvořeny v laboratoři ve větším množství a uschovány v tkáňové bance, kde jsou kdykoliv připraveny k okamžitému použití (20, 124, 126). Kryoprezervované štěpy v porovnání s nativními štěpy dávají zcela srovnatelné výsledky při terapii bércových ulcerací (20, 126).

Lyofilizace je proces, při kterém dojde k zmrazení buněk na teplotu -80°C a následné sublimaci vody ve vakuu. Sterilita je zajištěna ozářením dávkou 25 kGy. Lyofilizace umožňuje jak skladování, tak transport KEC při pokojové teplotě, což je velkou výhodou oproti štěpům kryoprezervovaným, které vyžadují skladovací teplotu -80°C a transport s použitím suchého ledu. Na rozdíl od kryoprezervovaných štěpů, u kterých zůstává zachována vitalita keratinocytů, dochází u lyofilizace ke vzniku lyzátů keratinocytů, tzn. buňky ztrácejí svou vitalitu. Lyzáty si však uchovávají podobné složení jako vitální keratinocyty, tj. obsahují stejné cytokiny (23, 121). Proto mají lyofilizované KEC velmi podobný efekt jako nativní či kryoprezervované keratinocyty. Jedním z prvních autorů, kteří se zabývali použitím lyofilizovaných KEC, byl Duinslaeger, který prokázal, že lyofilizované lyzáty keratinocytů stimulují hojení ran u popálených pacientů s efektem velmi podobným nativním alograftům keratinocytů (23).

Materiál a metody

Do studie bylo zahrnuto celkem 50 pacientů léčených na I. dermatovenerologické klinice LF MU a FN u sv. Anny v Brně. Jednalo se o pacienty s venózními bércovými ulceracemi, případně smíšenými ulceracemi s převahou žilní složky, které trvaly déle než 3 měsíce a nehojily se při zavedené adekvátní kompresivní terapii.

Všichni pacienti byli komplexně vyšetřeni anamnesticky, klinicky, dopplerovskou ultrasonografií včetně stanovení indexu tlaku kotník/paže (ABPI) a digitální fotopletyzmografií. Bylo provedeno základní biochemické vyšetření včetně glykovaného hemoglobinu a bakteriologické vyšetření ze spodiny ulcerace. Na základě vyšetření byla stanovena etiologie ulcerace. Mezi vylučovací kritéria patřila čistě arteriální ulcerace,

ulcerace menší než 2 cm^2 a trvající méně než 3 měsíce, dekompenzovaný diabetes mellitus (glyk.Hb více než 85 mmol/l), výrazná anémie (hemoglobin méně než 100 g/l), dekompenzovaná srdeční insuficience, výrazná hypoproteinémie (albumin méně než 35 g/l), kotníkový index méně než 0,8, maligní tumor s generalizací a celková imunosupresívní terapie.

Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Pacienti byli randomizováni do 2 skupin – 25 pacientů bylo léčeno kryoprezervovanými KEA (skupina I) a 25 pacientů bylo léčeno lyofilizovanými KEA (skupina II). Do skupiny I bylo zařazeno 10 mužů a 15 žen s průměrným věkem 63 let (rozpětí 36-80 let), ve skupině II bylo 8 mužů a 17 žen s průměrným věkem 62,8 let (rozpětí 30–82 let). Obě skupiny pacientů byly srovnatelné stran pohlaví i věku. Průměrná doba trvání ulcerací byla na základě anamnestických údajů 30,7 měsíců (rozpětí 3–204 měsíců) ve skupině I a 16,7 měsíců (rozpětí 3-111 měsíců) ve skupině II.

Kryoprezervované i lyofilizované KEA byly vykultivovány v Tkáňové bance FN Brno. Zdrojem keratinocytů pro kultivaci byla kůže pacientů podstupujících elektivní plasticko-chirurgické výkony, např. operace apostázy, ptózy víček, fimózy. U všech dárců byl proveden pečlivý screening v souladu s všeobecnými doporučeními EATB (European Association of Tissue Banks), včetně podepsaného informovaného souhlasu. Vykultivované alografty byly buď kryoprezervovány nebo lyofilizovány.

Před aplikací KEA bylo nutno připravit spodinu ulcerace tak, aby byla ve stadiu granulace. Těsně před aplikací alograftů byla ulcerace obkladována fyziologickým roztokem po dobu 2-3 dnů. V případě vykultivovaného patogenního agens byla pacientovi podávána celkově antibiotika dle citlivosti. V den aplikace alograftů byla zdokumentována velikost ulcerace (fotodokumentace, nákres na fólii). Poté byly za sterilních podmínek přiloženy KEA na nosiči. Ty byly kryty silikonovou neadherentní mřížkou, vrstvou gázy, fixovány hydrofilním obinadlem a 2-3 krátkotažnými obinadly. Vzhledem k nutnosti přísného klidu na lůžku po dobu 48 hodin a dodržení standardních podmínek byla aplikace KEA prováděna za krátkodobé hospitalizace. První převaz následoval po 5 dnech – po obkladu fyziologickým roztokem byl sejmut nosič KEA (mastný tyl) a po fotodokumentaci byla ulcerace ošetřena neadherentním silikonovým krytím či krytím s aktivním uhlím. Následovala opět vrstva gázy, hydrofilní obinadlo a komprese krátkotažnými obinadly. Další převazy byly prováděny po 2-3 dnech. Pacienti byli sledováni 3 měsíce od aplikace KEA za průběžné dokumentace velikosti vředu (fotodokumentace, nákres na fólii).

Výsledky a diskuze

Po 3 měsících bylo zhojeno 21 pacientů ze skupiny I a 20 pacientů ze skupiny II, tj. celkem 41 pacientů (82 %) (Obr. 1). U zbývajících 9 pacientů (18 %) nebyly sice ulcerace zcela zhojeny, nicméně došlo k výrazné redukci velikosti vředů a k úlevě od bolesti. Průměrná doba hojení vředu byla 32,2 dny (rozpětí 12-90) dnů u skupiny I a 26,9 dnů (rozpětí 10-84 dnů) u skupiny II (Obr. 2). Mezi oběma skupinami nebyly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly v počtu zhojených ulcerací a v rychlosti hojení (RR 1,05, 95% konfidenční interval 0,81 – 1,36).

Obr. 1: Výsledky hojení během 3 měsíců (n – počet ulcerací)

Typ alograftu	**zhojeno**		**nezhojeno**	
	n	**%**	**n**	**%**
kryoprezervovaný	21	84	4	16
lyofilizovaný	20	80	5	20
celkem	40	82	9	18

Obr. 2: Rychlost hojení ulcerací během 3 měsíců

Typ alograftu	**Doba hojení (dny)**	**Průměrná doba hojení (dny)**
kryoprezervovaný	12-90	32.2
lyofilizovaný	10-84	26.9
celkem	10-90	29.5

Průměrná velikost ulcerací před aplikací alograftů byla 12,41 cm^2 u skupiny I a 9,04 cm^2 u skupiny II. Velikost vředů byla planimetricky hodnocena 7., 28. a 90. den od aplikace KEA (Obr. 3). Výrazné zmenšení velikosti vředů bylo patrné zejména během prvního týdne od

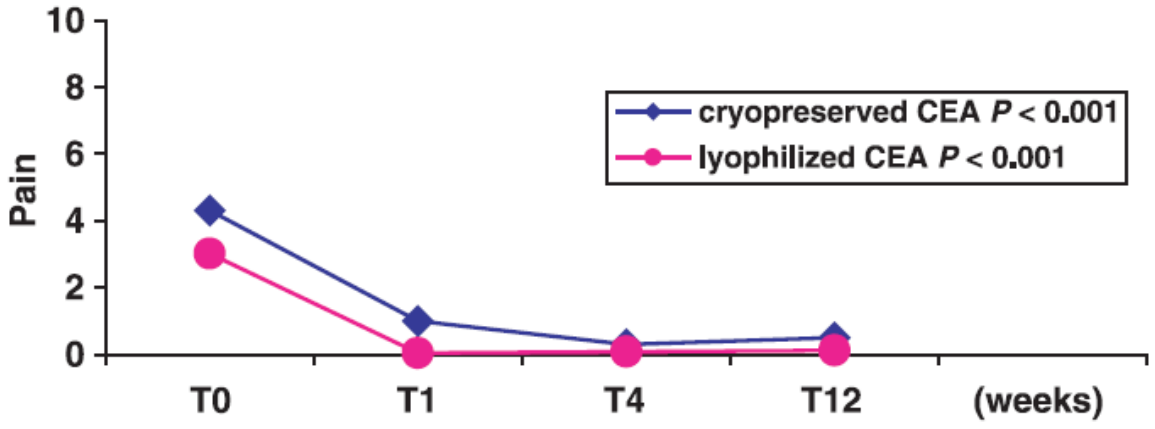
aplikace alograftů – 7. den byla průměrná velikost vředů 6,5 cm^2 u skupiny I a 5,06 cm^2 u skupiny II. Po měsíci (28. den) byla průměrná velikost vředů 2,04 cm^2 u skupiny I a 1,45 cm^2 u skupiny II. Po 3 měsících od aplikace alograftů (tj. 90. den) byla průměrná velikost vředů 1,99 cm^2 u skupiny I a 1,05 cm^2 u skupiny II. Změny velikosti vředů během prvního týdne léčby byly statisticky signifikantní u obou skupin a také byly u obou skupin srovnatelné (P<0,001).

Obr. 3: Planimetrické hodnocení ulcerací během léčby (T – počet dnů)

Typ alograftu	**Velikost ulcerace (cm^2)**			
	Před aplikací alograftu	**Po aplikaci alograftu**		
		T_7	**T_{28}**	**T_{90}**
kryoprezervovaný (n=25)	12.41	6.50	2.04	1.99
lyofilizovaný (n=25)	9.04	5.06	1.45	1.50
celkem	10.73	5.78	1.74	1.74

Součástí studie bylo také hodnocení bolesti pomocí VAS (vizuální analogová škála bolesti). Intenzita bolesti byla u obou skupin statisticky signifikantně redukována během prvního týdne po aplikaci alograftů (P<0,001) (Obr. 4).

Obr. 4: Průběh bolesti během léčby



Z výsledků naší studie vyplývá, že lyofilizované KEA mají efekt zcela srovnatelný s kryoprezervovanými KEA. Lyofilizované KEA se tak stávají mnohem výhodnější pro použití v běžné praxi, protože se dají transportovat i skladovat při pokojové teplotě a jsou tak kdykoliv připraveny k okamžitému použití. Rovněž se tím výrazně sníží finanční náklady.

Co se týče aplikace kryoprezervovaných KEA, jsou výsledky hojení ulcerací u pacientů v našem souboru zcela srovnatelné se studiemi zabývajícími se touto problematikou. Teepe et al. udává ve své studii průměrnou dobu hojení 26 dnů u venózních ulcerací léčených kryoprezervovanými alografty a 83 % kompletně zhojených ulcerací (i jiné etiologie než čistě venózních) během 12 týdnů (126). De Luca et al. udává průměrnou dobu hojení venózních ulcerací 5,7 týdne (při opakovaných aplikacích kryoprezervovaných alograftů) a 66,6 % ulcerací kompletně zhojených během 12 týdnů (v souboru byli i pacienti s jinými ulceracemi než venózními) (20).

Největší efekt léčby byl pozorován během prvního týdne od aplikace KEA, kdy došlo k výraznému zmenšení plochy ulcerací (hodnoceno planimetricky). Toto rychlé hojení lze nesporně přičíst působení KEC, protože za standardních podmínek zajištěných hospitalizací byl proveden jen jeden převaz (5. den), takže ostatní zevní terapie nemohla hrát velkou roli. Naše zjištění odpovídá i výsledkům jiných studií, v nichž také došlo k výrazné redukci plochy ulcerací během prvního týdne (56, 99), a souvisí s předpokládaným mechanismem účinku KEC, tj. s uvolněním řady cytokinů. Rychlá epitelizace většinou začínala z okrajů ulcerace (popisovaný „edge effect“), u rozsáhlejších ulcerací došlo i k tvorbě epitelizačních ostrůvků v centru, zřejmě migrací hostitelských keratinocytů ze zbytků kožních adnex (5, 10, 20, 49, 68, 73, 78, 100, 104, 126).

V následujících týdnech bylo hojení ulcerací ovlivněno řadou dalších faktorů týkajících se samotného pacienta (věk, statická zátěž, přidružená onemocnění), ale i ostatní lokální terapií, a především aplikací adekvátní komprese. Některé studie popisují opakovanou aplikaci KEA s časovým odstupem 1-2 týdnů, překážkou ovšem může být finanční náročnost takového postupu (5, 20, 43, 57, 74, 78, 126, 127).

U všech pacientů došlo okamžitě po aplikaci jak kryoprezervovaných, tak lyofilizovaných KEA ke zmenšení intenzity bolesti, a tím k výraznému zlepšení kvality života ještě před zhojením ulcerací. Úleva od bolesti je popisována ve všech studiích zabývajících se problematikou aplikace KEC a je zdůrazňována jako jedna z velkých předností této metody (5, 99, 100).

Na naši práci navázali někteří zahraniční autoři.

Jang et al (2013) ve své preklinické studii srovnávali kryoprezervované a lyofilizované KEA, a to jejich mikrostrukturu, cytokinový profil a jejich vliv na hojení ran na myších modelech (53). U lyofilizovaných KEA byly mikroskopicky zjištěny intaktní buňky se zřetelnými intracelulárními junkcemi. Lyofilizované KEA byly složeny ze 3-4 dobře zachovaných vrstev epidermis, což bylo prokázáno expresí keratinu, involukrinu a p63. Struktura epidermální vrstvy a exprese proteinů byly u lyofilizovaných a kryoprezervovaných KEA shodné a rovněž byly srovnatelné s nativními KEA. U lyofilizovaných KEA byly detekovány podobné hladiny TGF-α, EGF, VEGF, IL-1α a MMP jako u kryoprezervovaných KEA. Dále bylo provedeno srovnání účinnosti obou typů KEA na myších modelech. Rány léčené lyofilizovanými nebo kryoprezervovanými KEA se zhojily nejméně o 4 dny rychleji než neléčené rány. Rány léčené KEA se úplně zhojily do 10 dnů, zatímco neléčené rány nebyly zahojeny do 14. dne. U ran léčených KEA bylo ve srovnání s kontrolami nalezeno výrazně vyšší množství kolagenu v dermis v centru rány. Tato studie tedy prokázala, že u hojení ran jsou lyofilizované KEA klinicky stejně účinné jako kryoprezervované KEA. Tento výsledek je v souladu s našimi výsledky.

KEA uvolňují proteiny důležité pro proliferaci a migraci keratinocytů a fibroblastů. Mezi tyto proteiny patří růstové faktory – bFGF, TGF-α, TGF-β, EGF, VEGF, PDGF, dále cytokiny - IL-1α, IL-6, IL-8 a také proteiny ECM – kolagen, laminin a fibronektin. Byly zkoumány hladiny TGF-α, bFGF, EGF, VEGF a IL-1α u lyofilizovaných KEA. U lyofilizovaných KEA byly metodou ELISA detekovány vysoké hladiny VEGF a IL-1α. Tyto vysoké hladiny byly srovnatelné s kryoprezervovanými KEA. Rovněž hladiny TGF-α, EGF a bFGF byly srovnatelné u obou typů KEA. Na základě těchto výsledků bylo prokázáno, že lyofilizace neovlivňuje hladinu proteinů v KEA.

Soejima et al. (2013) vytvořili nové bioaktivní krytí s obsahem lyofilizovaných KEC a/nebo fibroblastů (120). Cílem studie bylo potvrdit účinnost lyofilizovaných produktů díky uvolnění růstových faktorů. Výsledky studie potvrdily, že kultivované buňky si zachovávají po lyofilizaci svou morfologii a dále uvolňují růstové faktory.

Bylo zjištěno, že při použití krytí s obsahem samotných fibroblastů dochází k uvolnění růstových faktorů v signifikantně vyšších koncentracích po lyofilizaci než po kryalizaci. Např. hladina bFGF byla téměř stokrát vyšší u lyofilizovaných buněk ve srovnání s kryoprezervovanými buňkami. Pokud byly keratinocyty a fibroblasty kultivovány spolu, byly

hladiny bFGF a VEGF vyšší u kryoprezervovaných krytí. Hladina růstových faktorů je pravděpodobně regulována vzájemnou interakcí keratinocytů a fibroblastů (36, 118).

O'Donnell (2006) ve své práci podal systematický přehled randomizovaných klinických studií (RCT), které se zabývaly krycími materiály pro hojení venózních bércových ulcerací a splňovaly vstupní kritéria, tj. aplikace komprese během studie jako základ konzervativní léčby a objektivní cíle popisující procento zhojených ulcerací (94). Celkem tomuto požadavku odpovídalo 20 RCT, mezi nimi i naše studie. RCT byly rozděleny do 3 skupin dle použitých krycích materiálů – semiokluzívní/okluzívní krytí (celkem 8 studií), růstové faktory (celkem 7 studií) a kožní náhrady (celkem 5 studií, mezi nimi i naše práce). Autor vyhledával RCT v databázích MEDLINE, CINAHL a Cochrane Controlled Trials Registry Database. Ve skupině kožních náhrad měla nejlepší výsledky studie srovnávající Apligraf a Tegapore. Apligraf je biosyntetický produkt tvořený 2 vrstvami. Vnitřní dermální vrstvu představují kultivované lidské fibroblasty v bovinním kolagenu typu 1, zevní epidermální vrstvu tvoří kultivované epidermální keratinocyty, které jsou schopny vytvářet stratum corneum. Apligraf je morfologicky, biochemicky a metabolicky podobný lidské kůži (24). Tegapore je tkaná polyamidová síťka, neadherentní krycí materiál s poměrně velkými póry. Výsledky studie potvrdily účinnost kožních náhrad, bylo zhojeno 63 % pacientů léčených Apligrafem ve srovnání se 49 % pacientů léčených Tegaporem (P 0,02).

Jones et al. publikovala v roce 2013 poslední systematický přehled kožních náhrad v léčbě venózních bércových ulcerací z databáze Cochrane (55). Do přehledu bylo zařazeno celkem 17 randomizovaných klinických studií (RCT), s celkovým počtem 1034 pacientů. Ve 12 studiích byla současně aplikována komprese. 11 studií srovnávalo kožní náhrady se standardní lokální terapií, v 6 studiích byly srovnávány různé kožní náhrady mezi sebou. Do této skupiny byla zařazena i naše práce (Obr.5).

Obr.5: Výsledky naší studie zahrnuté v databázi Cochrane srovnávající aktivní krytí při léčbě bércových ulcerací venózní etiologie (Jones et al 2013)

Analysis 9.1. Comparison 9 Frozen allograft compared with lyophilised keratinocyte, Outcome 1 Healing.

Review: Skin grafting for venous leg ulcers

Comparison: 9 Frozen allograft compared with lyophilised keratinocyte

Outcome: 1 Healing

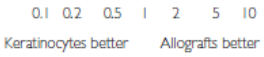
Study or subgroup	Frozen allograft n/N	Lyophilised Keratino n/N	Risk Ratio M-H,Fixed,95% CI	Weight	Risk Ratio M-H,Fixed,95% CI
Navratilova 2004	21/25	20/25		100.0 %	1.05 [0.81, 1.36]
Total (95% CI)	**25**	**25**		**100.0 %**	**1.05 [0.81, 1.36]**

Total events: 21 (Frozen allograft), 20 (Lyophilised Keratino)

Heterogeneity: not applicable

Test for overall effect: Z = 0.37 (P = 0.71)

Test for subgroup differences: Not applicable



Mechanismus hojení ran je velmi složitý. Ačkoliv lze k podpoře hojení ran aplikovat samotné růstové faktory, je léčba pomocí alogenních kultivovaných buněk mnohem účinnější a fyziologická, protože dochází k uvolnění řady mediátorů, které navzájem posilují své účinky.

Dále byla publikována v *Acta Dermatoven APA* naše kazuistika 67leté ženy s 4 roky trvajícími bércovými ulceracemi, které se po aplikaci lyofilizovaných KEA zhojily během 40 dnů a pacientka mohla podstoupit nezbytnou operaci kolenního kloubu pro gonartrózu.
Velikost všech ulcerací byla před aplikací lyofilizovaných KEA 22,7 cm^2, 7. den po aplikaci došlo k redukci na 16,5 cm^2, 28. den byla velikost 2,4 cm^2. Ihned po aplikaci pacientka udávala výrazný ústup bolestí. Ulcerace byly zcela zhojeny po 40 dnech od aplikace lyofilizovaných KEA. Pacientka pokračovala v aplikaci kompresívní terapie a mohla podstoupit operaci kolene. Po operaci došlo k výraznému zlepšení mobility pacientky, a tím k aktivaci žilně svalové pumpy a redukci žilní hypertenze. Důsledkem pak byla pomalejší progrese CVD.

III. Terapie chronických bércových ulcerací venózní etiologie – oxidovaná celulóza

1. Slonková V, Vašků V: Využití oxidované celulózy v terapii chronických ulcerací cévního původu – výsledky klinické studie. Čs Derm 2009; 84: 92-98.

   (kvantitativní podíl uchazeče - 80% - sběr a analýza dat, klinické vyšetřování a léčba pacientů, vyhledávání a analýza literatury, příprava textu publikace)

2. Slonková V, Vašků V: Úspěšná terapie bércových ulcerací pomocí hydrogenvápenaté soli oxidované celulózy. Referátový výběr z dermatovenerologie 2009; 51: 80-82.

   (kvantitativní podíl uchazeče - 80% - sběr a analýza dat, klinické vyšetřování a léčba pacientů, vyhledávání a analýza literatury, text publikace)

3. Slonková V, Vašků V: Využití hydrogenvápenaté soli oxidované celulózy (Traumacelu biodress) v terapii chronických ulcerací: shrnutí výsledků klinické studie a kazuistika. Lékařské listy 2008; 19: 27-29.

   (kvantitativní podíl uchazeče - 80% - sběr a analýza dat, klinické vyšetřování pacientů, vyhledávání a analýza literatury, příprava textu publikace)

Na I. dermatovenerologické klinice v Brně probíhala v letech 2006-2007 klinická studie, jejímž cílem bylo ověřit bezpečnost a účinnost oxidované celulózy (OC) v léčbě bércových ulcerací venózní nebo smíšené etiologie a porovnat účinnost obou forem oxidované celulózy, tj. čisté OC a hydrogenvápenaté soli OC.
Výsledky této klinické studie byly publikovány v českých recenzovaných časopisech.

Stav problematiky

Oxidovaná celulóza je produkt selektivní oxidace celulózy rostlinného původu (bavlny). Je plně biodegradabilní, je resorbována do 48-72 hodin v závislosti na množství exsudátu. V rámci studie byla zkoumána účinnost dvou forem OC – čisté oxidované celulózy (polyglukuronová kyselina) a částečně neutralizované OC (hydrogenvápenatá sůl polyglukuronové kyseliny - parciálně neutralizovaná OC zachovávající kyselý charakter látky). Čistá OC i hydrogenvápenatá sůl OC jsou využívány v chirurgii již řadu let především pro své hemostatické účinky. Ionty kalcia přítomné v hydrogenvápenaté soli OC se při hojení

ran navíc vážou na receptory bolesti, čímž je blokují (46). Výsledkem je snížení bolesti v ráně a tím zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením bércové ulcerace. Ionty kalcia rovněž podporují hojení tím, že zvyšují osmotický tlak v ráně, což podporuje migraci makrofágů a růstových faktorů do rány. Výsledkem je aktivace fibroblastů. Studie in vitro, které se zabývaly účinkem oxidované celulózy na dermální fibroblasty, prokázaly, že oxidovaná celulóza vede k přímé stimulaci proliferace fibroblastů a signifikantně zvyšuje jejich metabolickou aktivitu (46, 48). Přesný mechanismus účinku však dosud není znám.

Lze předpokládat i příznivý vliv OC v obou formách na snížení pH v ráně, čímž dochází ke snížení aktivity matrix metaloproteináz. MMP jsou proteolytické enzymy, které jsou součástí exsudátu chronických ran. MMP zpomalují hojení ran tím, že poškozují granulační tkáň a podporují zánětlivou fázi hojení ran. Aktivita MMP významně závisí na pH v ráně. Chronické rány mají průměrné pH 7,4 - při tomto pH vykazují MMP maximální aktivitu. Tato aktivita klesá při nižším, tj. lehce kyselém pH. Snížením pH v ráně tedy dochází ke snížení aktivity MMP a tím k urychlení hojení (86).

Materiál a metody

Do studie bylo zařazeno celkem 30 pacientů s chronickými bércovými ulceracemi venózní nebo smíšené etiologie, které trvaly déle než 3 měsíce a nejevily známky hojení při standardní terapii (lokální terapie a adekvátní kompresívní terapie). Výběr konkrétní formy OC závisel na pořadí pacienta ve studii – pacienti č. 1-5, dále 11-15 a dále 21-25 byli léčeni hydrogenvápenatou solí OC (skupina 1), pacienti č. 6-10, dále 16-20 a dále 26-30 byli léčeni čistou OC (skupina 2).

Z celkového počtu 30 pacientů bylo celkem 9 mužů a 21 žen. Průměrný věk pacientů ve skupině 1 byl 70,07 let (rozpětí 51-84 let), ve skupině 2 byl 68,73 let (rozpětí 48-84 let).

Průměrná doba trvání ulcerací byla u 1. skupiny 64,27 měsíců (s časovým rozpětím 5 měsíců - 38 let), u 2. skupiny byla 22,20 měsíců (s časovým rozpětím 3 měsíce - 7 let). Protože doba trvání má značný rozptyl a nemá normální rozdělení, byla pro srovnání data zlogaritmována. Potom mají již normální rozdělení a je možné použít t-test. Jednotlivé skupiny se neliší (i kdyby byly pro srovnání použity nelogaritmované hodnoty). Ve skupině 1 se jednalo u 7 pacientů o venózní ulcerace a u 8 pacientů o ulcerace smíšené etiologie, ve skupině 2 byly u 5 pacientů zjištěny venózní ulcerace a u 10 pacientů ulcerace smíšené.

Všichni pacienti byli podrobně vyšetřeni anamnesticky, klinicky, dopplerovskou ultrasonografií včetně stanovení indexu tlaku kotník/paže (ABI – ankle/brachial index) a

digitální fotopletysmografií. Dále byly provedeny laboratorní odběry – KO+diff a biochemické vyšetření - glykemie, urea, kreatinin, cholesterol, AST, ALT, GMT, bilirubin, CB, albumin, CRP, glykovaný Hb. Rovněž bylo provedeno bakteriologické vyšetření ze spodiny ulcerace. Na základě vyšetření byl stanoven charakter ulcerace.
Vylučovací kritéria byla následující: čistě arteriální ulcerace, ulcerace menší než 2 cm^2 či trvající méně než 3 měsíce, špatně kompenzovaný diabetes mellitus (glykovaný hemoglobin více než 8,5 %), výrazná anemie (hemoglobin méně než 100 g/l), dekompenzovaná srdeční insuficience, výrazná hypoproteinemie (albumin méně než 35 g/l), ABPI méně než 0,7, maligní tumor s generalizací, celková imunosupresívní terapie a alergie na oxidovanou celulózu.
Pacienti splňující kritéria byli na základě informovaného souhlasu zařazeni do studie.

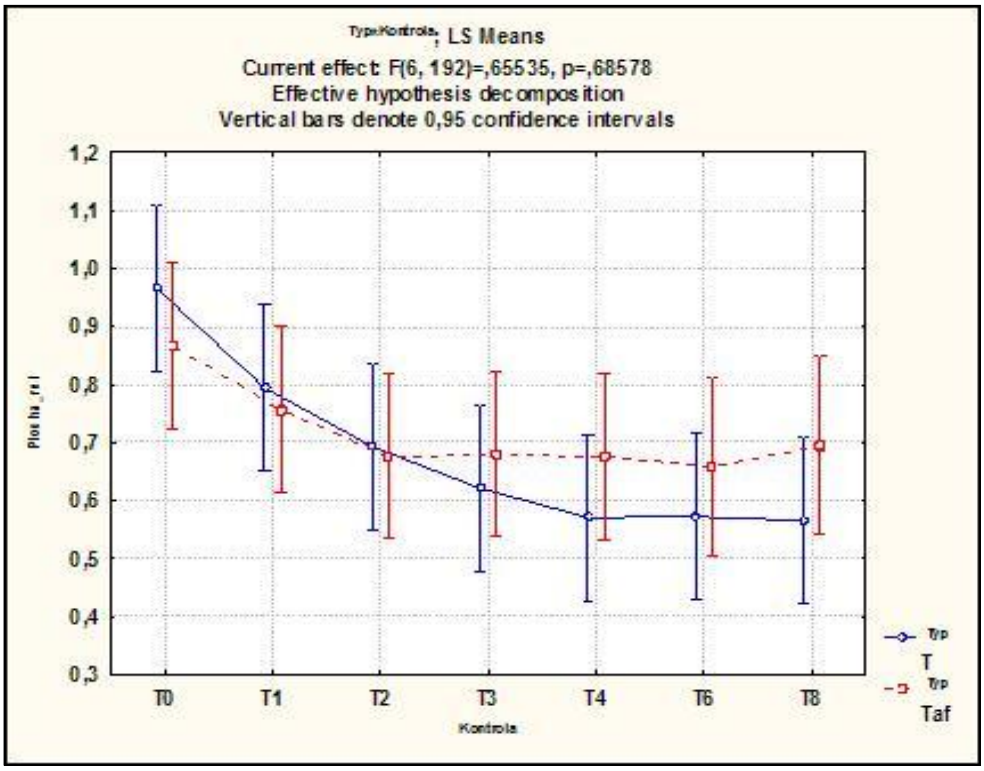
Před první aplikací porovnávaných forem OC byl zdokumentován charakter ulcerace (digitální fotografie, nákres na folii a planimetrické zpracování), byl zaznamenán stav spodiny ulcerace i jejího okolí, stupeň exsudace. Dále byla číselně zaznamenána bolest, kterou pacient cítí, a to pomocí numerické škály bolesti (NRS). Numerická škála bolesti představuje jednu z možností, jak kvantitativně hodnotit intenzitu bolesti. Před aplikací OC byla ulcerace obkladována Dermacynem, poté bylo ošetřeno okolí ulcerace zinkovým olejem a do ulcerace byla aplikována OC, která byla kryta mastným tylem, vrstvou gázy, fixována hydrofilním obinadlem a následně 2-3 krátkotažnými obinadly. Celková doba aplikace oxidované celulózy byla 8 týdnů. Převazy probíhaly po 1-3 dnech v závislosti na stupni exsudace, zpočátku většinou denně, ve 2. měsíci od zařazení do studie většinou po 2-3 dnech.
Klinické kontroly probíhaly 1. měsíc v týdenních intervalech, 2. měsíc po 2 týdnech. Při každé klinické kontrole byla hodnocena velikost ulcerace (digitální fotografie, nákres na folii a planimetrické zpracování), charakter spodiny ulcerace, stupeň exsudace, charakter okolí ulcerace. Pacienti číselně zaznamenali bolest, kterou cítí, a to pomocí numerické škály bolesti. Pomocí speciálního dotazníku byla hodnocena i kvalita života pacientů, a to před zahájením studie a poté při ukončení studie. Rovněž byla hodnocena spokojenost pacientů s terapií oxidovanou celulózou.

Výsledky a diskuze

Průměrná plocha vředu před zahájením studie byla u 1. skupiny 42,37 cm^2 a u 2. skupiny 34,55 cm^2. Průměrná bolest byla před zahájením studie u 1. skupiny 6,07 a u 2. skupiny 6,87

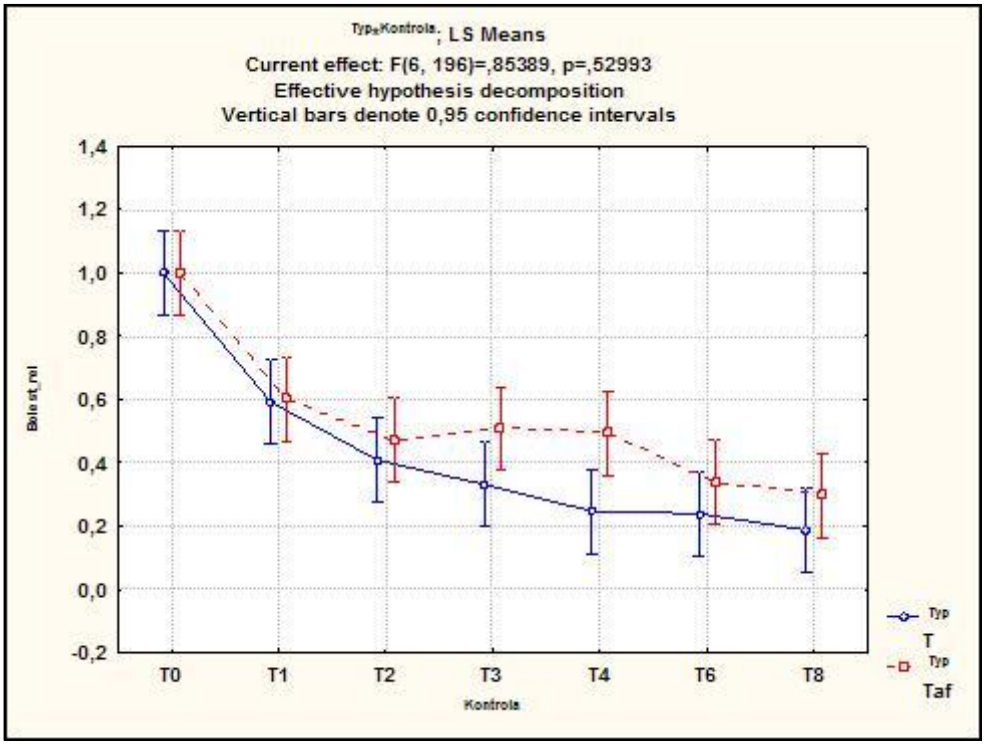
(hodnoceno numerickou škálou bolesti). Hodnoty velikosti ulcerací měly u pacientů velký rozptyl, a navíc neměly v průběhu léčení normální rozdělení. Z tohoto důvodu byly pro další analýzu použity hodnoty relativní, které navíc vykazovaly normální rozdělení. Pro hodnocení účinnosti léčby v závislosti na použité formě OC a době léčení byla použita dvoucestná metoda ANOVA. Čistá OC je v grafech označená jako Taf a hydrogenvápenatá sůl OC je v grafech označená jako T. Ukázalo se, že hodnoty relativní velikosti ulcerací se u skupiny 1 a u skupiny 2 vzájemně v průběhu léčby statisticky neliší. Statisticky významně však došlo ke zmenšení velikosti vředů (p=0,00027) - na základě následného post-hoc Tukey testu se již po 2 týdnech léčby hodnoty velikosti ulcerací (stav T2) statisticky liší od velikosti ulcerací na počátku léčení (stav T0). V grafu 1 jsou vyneseny střední hodnoty relativní velikosti ulcerací u obou forem OC během léčení. Je zřejmé, že lepších výsledků bylo dosaženo u skupiny 1 (tj. u pacientů léčených hydrogenvápenatou solí OC) - z grafu je zřejmý stálý klesající trend relativní velikosti vředů. Naopak u pacientů léčených čistou formou OC jsou hodnoty relativní velikosti vředů vyšší než u skupiny 1 a od kontroly v čase T2 (tj. po 2 týdnech léčby) se již prakticky nemění. Tato skutečnost je potvrzena také výsledky post-hoc Tukey testu, na základě kterého bylo prokázáno, že u skupiny 1 došlo navíc ke statisticky signifikantnímu zmenšení relativní velikosti vředů i po 3 týdnech léčby (T3) v porovnání s počátečním stavem, kdežto u skupiny 2 se hodnoty od času T2 v celém dalším průběhu již neliší.

Graf 1: Závislost střední hodnoty relativní plochy vředů u obou typů preparátu během léčení včetně 95% konfidenčních intervalů (T – hydrogenvápenatá sůl OC, Taf – čistá OC)



Hodnoty bolesti během léčení byly hodnoceny obdobným způsobem. Pro hodnocení byly opět použity relativní hodnoty bolesti, čímž se omezí subjektivní hodnocení pacienta a zdůrazní se změna během léčení. Po provedení ANOVA testu se signifikantně liší jak úroveň bolesti mezi skupinou 1 a skupinou 2 ($p=0{,}0057$), tak i úroveň bolesti při jednotlivých kontrolách ($p< 0{,}000001$). Z grafu 2, kde jsou vyneseny průběhy bolesti během léčení u obou skupin pacientů je vidět, že u skupiny 2 jsou hodnoty bolesti vyšší než u skupiny 1. Tato skutečnost byla potvrzena i post-hoc Tukey testem – skupiny 1 se statisticky významně liší bolest nejen při první kontrole po týdnu léčby (T1), ale navíc i relativní hodnoty bolesti po 4 týdnech léčby (T4) jsou statisticky významně nižší než v čase T1. V případě skupiny 2 se bolest statisticky významně sníží také při první kontrole, ale dále se již do konce sledování statisticky významně nemění.

Graf 2: Závislost střední hodnoty relativní bolesti u obou typů preparátu během léčení včetně 95% konfidenčních intervalů (T – hydrogenvápenatá sůl OC, Taf – čistá OC)



Korelace mezi průběhem léčení a věkem nebo dobou onemocnění nebyly zjištěny.

Oxidovaná celulóza použitá v této studii je získávána z dlouhovlákenné bavlny nejvyšší kvality s vysokým obsahem alfa-celulózy. Od ostatních forem celulózy se liší zejména výchozí surovinou (bavlna) a způsobem zpracování. Vlákna totiž nejsou klasicky lisována, ale jsou předena kroucením základních šroubovic, čímž nevznikají plná, ale dutá vlákna s větším specifickým povrchem. Toto speciální zpracování zajišťuje vyšší účinnost této formy OC.

V průběhu studie byl pozorován velmi příznivý efekt OC i na ulcerace s povleklou spodinou, postupně došlo k jejímu vyčištění a navození granulační fáze hojení. Tyto klinické zkušenosti byly potvrzeny i laboratorně – bylo prokázáno, že OC působí na některé mikroorganismy baktericidně (Staphylococcus aureus včetně methicilin-rezistentních kmenů, dále Streptococcus pyogenes, Streptococcus beta-haemolyticus non A non B), na jiné patogeny působí bakteriostaticky (gramnegativní bakterie - Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris) (134). Antibakteriální účinek vůči širokému spektru patogenních mikroorganismů byl potvrzen jak in vitro, tak in vivo, a je pravděpodobně dán snížením pH v ráně. To vede kromě jiného k aktivaci přirozených obranných mechanismů hostitele (59).

Po aplikaci hydrogenvápenaté soli OC byl zjištěn statisticky signifikantní ústup bolesti, čímž došlo ke zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením ulcerace. Bolest je jedním z hlavních faktorů, které snižují kvalitu života pacientů s bércovými vředy. Dle literárních údajů je bolestivých 60-80 % ulcerací venózní etiologie, z toho ve 20 % se jedná o bolest extrémní (50). Bolest a s ní související snížení kvality života má za následek pomalejší hojení rány. Chronická bolest totiž může vést k chronickému stresu, který negativně ovlivňuje hojení (83). Bolest tedy působí na hojení rány stejně negativně jako např. infekce v ráně (12).

Na základě provedené studie lze shrnout, že obě formy oxidované celulózy urychlují hojení chronických bércových vředů, dle statistického zhodnocení byly zjištěny lepší výsledky u skupiny pacientů léčených hydrogenvápenatou solí oxidované celulózy. Dle klinických zkušeností se jedná zejména o urychlení granulace a epitelizace ulcerací. Již po týdnu aplikace obou forem oxidované celulózy dochází k výrazné úlevě od bolesti, což vede ke zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením bércového vředu. Vzhledem k tomu, že se jedná o plně resorbovatelný materiál, probíhá výměna krytí bez traumatizace pacienta, což je jeden ze základních požadavků, který by mělo moderní krytí splňovat. Oxidovaná celulóza se velmi snadno aplikuje na ránu, což je další nespornou výhodou tohoto krytí. V průběhu celé studie nebyly zaznamenány nežádoucí účinky související s aplikací obou forem oxidované celulózy.

V současné době se hydrogenvápenatá sůl OC široce využívá v praxi k hojení chronických ran.

Příznivý vliv hydrogenvápenaté soli OC na hojení chronických ran prokázala i práce českých autorů, publikovaná v roce 2013 (33). Cílem studie bylo ověřit hypotézu, že hydrogenvápenatá sůl OC snižuje hladinu MMP-2, MMP-9 a TNF-alfa v exsudátu z rány, působí antibakteriálně a vede tak ke zmenšení velikosti rány. U 20 pacientů byly metodou ELISA analyzovány hladiny MMP-2, MMP-9 a TNF-alfa v exsudátu každých 14 dnů po dobu 6 týdnů. U 14 pacientů došlo ke zmenšení vředu a u 16 pacientů k ústupu bolesti. Hladiny MMP-2 odpovídaly produkci TNF-alfa. Hladiny MMP-9 zůstaly během studie beze změn. Rovněž došlo k signifikantnímu snížení bakteriální kontaminace v ráně. Studie potvrdila příznivý vliv hydrogenvápenaté soli OC na hojení chronických ran.

4. Závěr

Chronické žilní onemocnění představuje závažný celosvětový zdravotní problém. Onemocnění má progredující charakter, výrazně snižuje kvalitu života a náklady na léčbu především bércových ulcerací jsou vysoké. Genetická variabilita (polymorfismy) v určitých genech mohou hrát důležitou roli při vzniku žilního bércového vředu. Genetický screening může pomoci rozlišit pacienty s CVD s vysokým rizikem vzniku bércového vředu a pacienty s pomalým hojením ulcerace, a tím individualizovat léčebný plán u každého pacienta. Detekce rizikových variant genů může vést k rychlejšímu zavedení preventivních opatření a včasné léčbě pacientů s CVD, a zabránit tak vzniku bércových vředů a výrazně zlepšit kvalitu života pacientů. Genetické vyšetření nejdůležitějších polymorfismů asociovaných s CVD by mělo být zváženo zejména u pacientů s klinickým stádiem C3 a C4 a pozitivní rodinnou anamnézou.

Při léčbě bércových ulcerací venózní etiologie je často nutné využít aktivní krytí. Mezi nejmodernější z nich patří kryoprezervované a lyofilizované kultivované epidermální alografty, které výrazně urychlují hojení ulcerací a také vedou k okamžité úlevě od bolesti, čímž zlepšují kvalitu života pacientů ještě před zhojením ulcerací. Další moderní aktivní krytí představuje oxidovaná celulóza, která rovněž urychluje hojení ran a snižuje bolest. Vstupní náklady na moderní krytí (zejména kožní náhrady) jsou sice vyšší, ale ve svém konečném důsledku se vyplatí, protože dochází k velmi rychlému zhojení ulcerací a také ke zlepšení kvality života pacientů, což by mělo být prvotním zájmem léčby.

5. Literatura

1. Allaert FA. Meta-analysis of the impact of the principal venoactive drugs on malleolar venous edema, Int Angiol 2012; 31: 310-315.

2. Amin M, Pushpakumar S, Muradashvili N, Kundu S, Tyagi SC, Sen U. Regulation and involvement of matrix metalloproteinases in vascular diseases. Front Biosci (Landmark Ed) 2016; 21: 89-118.

3. Aubock J, Irschick E, Romani A. Rejection, after slightly prolonged survival time, of Langerhans cell-free allogeneic cultured epidermis used for wound coverage in humans. Transplantation 1988; 45:730–737.

4. Baker SR, Jopp-McKay AG, Hoskin SE, Thompson PJ. Epidemiology of chronic venous ulcers. Br J Surg 1991; 78: 864-867.

5. Beele H, Naeyaert JM, Goeteyn M et al. Repeated cultured epidermal allografts in the treatment of chronic leg ulcers of various origin. Dermatologica 1991; 183: 31–35.

6. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. Wound Repair Regen. 2008; 16: 642-648.

7. Benesová Y, Vasků A, Stourac P et al. Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2008; 205: 1-2. 105-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.08.007. Epub 2008 Oct

8. Bharath V, Kahn SR, Lazo-Langner A. Genetic polymorphisms of vein wall remodeling in chronic venous disease: a narrative and systematic review. Blood 2014; 124(8): 1242-1250. DOI 10.1182/blood-2014-03-558478.

9. Boisseau MR. Chronic venous disease and the genetic influence. Phlebolymphology 2014; 21: 100-111.

10. Bolivar-Flores YJ, Kuri-Harcuch W. Frozen allogeneic human epidermal cultured sheets for the cure of complicated leg ulcers. Dermatol Surg 1999; 25: 610–617.

11. Brain A, Purkis P, Coates P et al. Survival of cultured allogeneic keratinocytes transplanted to dermal bed assessed with probe specific for Y chromosome. Br Med J 1989; 298: 917–919.

12. Briggs M, Torra JE. Pain at wound dressing changes: a guide to management. EWMA Position Document: Pain at wound dressing changes 2002;12-17.

13. Brychta P, Suchánek I, Rihová H et al. Cultured epidermal allografts for the treatment of deep dermal burns. Acta Chir Plast 1995; 37: 20–24.

14. Burt AM, Pallett CD, Sloane JP. Survival of cultured allografts in patients with burns assessed with probe specific for Y chromosome. Br Med J 1989; 298: 915–917.

15. Caimi G, Ferrara F, Montana M, Muratori I, Amato C, Canino B, Lo Presti R, Hopps E. Behaviour of the plasma concentration of gelatinases and their tissue inhibitors in subjects with venous leg ulcers. Clin Hemorheol Microcirc 2015; 60: 309-16. doi: 10.3233/CH-141863.

16. Carter DM, Lin AN, Varghese MC et al. Treatment of junctional epidermolysis bullosa with epidermal autografts. J Am Acad Dermatol 1987; 17: 246–250.

17. Clark RF, Wound Repair, Principles of Tissue Engineering 2014; 10.1016/B978-0-12-398358-9.00076-8:1595-1617.

18. Cornu-Thenard A, Boivin P, Baud JM, De Vincenzi I and Carpentier PH: Importance of the familial factor in varicose disease. Clinical study of 134 families. J Dermatol Surg Oncol 1994; 20: 318-326.

19. Danziger N. Pathophysiology of pain in venous diseases, Phlebolymphology 2008; 15: 107-114.

20. De Luca M, Albanese E, Cancedda R et al. Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogeneic cultured epithelium. Arch Dermatol 1992; 128: 633–638.

21. Deatrick KB, Elfline M, Baker N, et al. Postthrombotic vein wall remodeling: preliminary observations. J Vasc Surg 2011; 53: 139-146.

22. Donati L, Magliacani G, Bormioli M et al. Clinical experience with keratinocyte grafts. Burns 1992; 18S: 19–26.

23. Duinslaeger L, Verbeken G, Reper P et al. Lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft-covered burn wounds with efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures. Plast Reconstr Surg 1996; 98: 110.

24. Eaglstein WH, Falanga V. Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. Clin Ther 1997; 19: 894–905.

25. Eisenger M. Regeneration of epidermis by cells grown in tissue culture. J Am Acad Dermatol 1985; 12: 402–408.

26. Eklöf B, Perrin M, Delis KT, Rutherford RB, Gloviczki P. Updated terminology of chronic venous disorders: The VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document. J Vasc Surg 2009; 49: 498-501.

27. Eklöf B, Rutherford RB, Bergan JJ, et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. J Vasc Surg 2004; 40: 1248–52. [PubMed: 15622385]

28. Eldad A, burt A, Clarke JA, Gusterson B. Cultured epithelium as a skin substitute. Burns 1987; 13: 173-180.

29. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. J Invest Dermatol 2007; 127: 514-525.

30. European Wound Management Association (EWMA): Position document: wound bed preparation in practice. Medical Education Partnership Ltd, London, 2004.

31. Flour M. Are we any better at identifying the risk factors for chronic venous disease progression? Medicographia 2011; 33: 315-319.

32. Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. Int J Dev Biol 2004; 48: 411-424.

33. Frankova J, Diamantova D, Vrbkova J, Ulrichova J. Influence of hydrogencalcium salts of oxidized cellulose on MMP-2, MMP-9 and TNF-α production and wound healing in non-healing wounds. Acta Dermatovenerol Croat 2013; 21: 219-23.

34. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC et al. Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. Plast Reconstr Surg 1989; 84:1–9.

35. Gemmati D, Federici F, Catozzi L et al. DNA-array of gene variants in venous leg ulcers: Detection of prognostic indicators. J Vasc Surg 2009; 50: 1444-1451.

36. Ghosh K, Clark R. Wound Repair, Principles of Tissue Engineering 2007; 1149-1166. 10.1016/B978-012370615-7/50080-9.

37. Gibson D, Cullen B, Legerstee R, Harding KG, Schultz G. MMPs Made Easy. Wounds International 2009; 1(1):Available from http://www.woundsinternational.com

38. Görmüş U, Kahraman OT. MMP2 gene polymorphisms and MMP2 mRNA levels in patients with superficial varices of lower extremities. In vivo 2011; 25: 387-392.

39. Graham ID, Harrison MB, Nelson EA, Lorimer K, Fisher A. A systematic review of prevalence studies of lower limb ulceration. Advances in Skin and Wound Care 2003;16:305-316.

40. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 5665–5668.

41. Grzela T, Bialoszewska A. Genetic risk factors of chronic venous leg ulceration: Can molecular screening aid in the prevention of chronic venous insufficiency complications? Mol Med Rep. 2010; 3: 205-11.

42. Harrison MB, Graham ID, Friedberg E, Lorimer K, Vandevelde CS. Assessing the population with leg and foot ulcers. Canadian Nurse 2001; 97: 18-23.

43. Harvima IT, Virnes S, Kauppinen L et al. Cultured allogeneic skin cells are effective in the treatment of chronic diabetic leg and foot ulcers. Acta Derm Venereol 1999; 79: 217–220.

44. Hefton JM, Caldwell D, Biozes DG et al. Grafting of skin ulcers with cultured autologous epidermal cells. J Am Acad Dermatol 1986; 14: 399–405.

45. Hefton JM, Madden MR, Finkelstein JL, Shires TG. Grafting of burn patients with allografts of cultured epidermal cells. Lancet 1983; 2: 428–430.

46. Hofman D, Wilson J, Poore S et al. A pilot study using a new dressing material: Traumacel. J Wound Care 2000; 9: 393-396.

47. Hotoleanu C, Jurj C. The Involvement of Genetic Factors in Chronic Venous Insufficiency. Rom J Intern Med 2008; 46: 119-123.

48. Hughes MA, Yang Y, Cherry GW. Effect of Traumacel P on the growth of human dermal fibroblasts in vitro. J Wound Care 2002; 11:149-154.

49. Hunziker T, Limat A. Cultured keratinocyte grafts. Curr Probl Dermatol 1999; 27: 57–64.

50. Hyland ME, ley A, Thomson B. Quality of life of leg ulcer patients: questionnaire and preliminary findings. J Wound Care 1994; 3:294-298.

51. Charles CA, Tomic-Canic M, Vincek V et al. A gene signature of nonhealing venous ulcers: Potential diagnostic markers. J Am Acad Dermatol 2008; 59: 758-71.

52. Chern PL, Baum CL, Arpey CJ. Biologic Dressings: Current Applications and Limitations in Dermatologic Surgery, Dermatologic Surgery 2009; 35: 891-906.

53. Jang H, Kim YH, Kim MK, Lee KH, Jeon S. Wound-Healing Potential of Cultured Epidermal Sheets Is Unaltered after Lyophilization: A Preclinical Study in Comparison to Cryopreserved CES, BioMed Research International 2013;1-6, http://dx.doi.org/10.1155/2013/907209.

54. Jebeleanu Gh., Procopciuc L. G20210A prothrombin gene mutation identified in patients with venosu leg ulcers. J Cell Mol Med 2001; 5: 397-401.

55. Jones JE, Nelson A, Al-Hity A. Skin grafting for venous leg ulcers. Cochrane Database of Systematic Reviews 2013, Issue 1. Art. No.: CD001737. DOI: 10.1002/14651858.CD001737.pub4.

56. Jones JE, Nelson A. Skin grafting for venous leg ulcers. Cochrane Database of Systematic Reviews 2007; 10.1002/14651858.CD001737.pub3.

57. Jones JE, Nelson EA. Skin grafting for venous leg ulcers. Cochrane Database Syst Rev 2000; 2: CD001737.

58. Kašpar S. Endovenózní léčba kmenových varixů dolních končetin pomocí laseru a radiofrekvence. Referátový výběr z dermatovenerologie Speciál I 2012; 54:18-26.

59. Kollár P, Suchý P, Muselík J, Bajerová M, Havelka P, Sopuch T. Hemostatické účinky oxidované celulosy. Česká a slovenská farmacie 2008; 57:11-16.

60. Kucera Z. Leg ulcer prevalence in the Czech Republic: Omnibus survey results 2006. EWMA Journal 2006; 6: 28-29.

61. Kucukguven A, Khalil RA. Matrix metalloproteinases as potential targets in the venous dilation associated with varicose veins. Curr Drug Targets 2013; 14: 287-324.

62. Kučera Z. Prevalence a některé aspekty léčby bércových vředů v České republice. Hojení ran 2007; 1: 20-23.

63. Kunt AT, Isbir S, Gormus U, Kahraman OT, Arsan S, Yilmaz SG, Isbir T. Polymorphisms of MMP9 and TIMP2 in Patients with Varicose Veins. In Vivo 2015; 29: 461-5.

64. Kurzawski M, Modrzejewski A, Pawlik A, Droździk M. Polymorphism of matrix metalloproteinase genes (MMP1 and MMP3) in patients with varicose veins. Clin Exp Dermatol 2009; 34: 613-617.

65. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, et al. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. Wound Repair Regen 2002; 10: 26-37.

66. Lamort AS, Gravier R, Laffitte A, Juliano L, Zani ML, Moreau T. New insights into the substrate specificity of macrophage elastase MMP-12. Biol Chem 2016; 397: 469-84. doi: 10.1515/hsz-2015-0254.

67. Layer LE, Ullrich O. Cell-Based Therapy During Exploration Class Missions, The Immune System in Space: Are we prepared? 2016; 10.1007/978-3-319-41466-9_8:97-109.

68. Leigh IM, Purkis PE, Navsaria HA, Phillips TJ. Treatment of chronic venous leg ulcers with sheets of cultured allogenic keratinocytes. Br J Dermatol 1987; 117: 591–597.

69. Leigh IM, Purkis PE. Culture grafted leg ulcers. Clin Exp Dermatol 1986; 11: 650–652.

70. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease - Part I: Inflammatory biomarkers in wound healing. Biochim Biophys Acta 2016; 1862(10):1964-74. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.018. Epub 2016 Jul 28.

71. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease - Part II: Proteolytic biomarkers in wound healing. Biochim Biophys Acta 2016; 1862: 1900-8. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.011. Epub 2016 Jul 25.

72. Lim CS, Shalhoub J, Gohel MS, Shepherd AC, Davies AH. Matrix metalloproteinases in vascular disease--a potential therapeutic target? Curr Vasc Pharmacol 2010; 8: 75-85.

73. Límová M, Grekin RC. Synthetic membranes and cultured keratinocyte grafts. J Am Acad Dermatol 1990; 23: 713–719.

74. Lindgren C, Marcusson JA, Toftgard R. Treatment of venous leg ulcers with cryopreserved cultured allogeneic keratinocytes: a prospective open controlled study. Br J Dermatol 1998; 139: 271–275.

75. Liu Y, Min D, Bolton T, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. Diabetes Care 2009; 32: 117-19.

76. MacColl E, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and function: Implications in Chronic Venous Disease. J Pharmacol Exp Ther 2015; 355: 410–428.

77. Mannello F, Raffetto JD. Matrix metalloproteinase activity and glycosaminoglycans in chronic venous disease: the linkage among cell biology, pathology and translational research. Am J Transl Res 2011; 3: 149-158.

78. Marcusson JA, Lindgren C, Berghard A, Toftgard R. Allogeneic cultured keratinocytes in the treatment of leg ulcers (a pilot study). Acta Derm Venereol 1992; 72: 61–64.

79. Margolis DJ, Berlin JA, Strom B. Risk factors associated with the failure of a venous ulcer to heal. Arch Dermatol 1999; 135: 920-92614.

80. McCarty SM, Cochrane CA, Clegg PD et al. The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: A focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. Wound Rep Reg 2012; 20: 125-136.

81. McCulloch JM, Kloth LC. Wound Healing: Evidence-Based Management. F. A. Davis 2010.

82. McKay IA, Leigh IM. Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. Br J Dermatol 1991; 124: 513–518.

83. Moffatt CJ, Franks PJ, Hollinworth H. Understanding wound pain and trauma: an international perspective. EWMA Position Document: Pain at wound dressing changes, 2002; 2-7.

84. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. Genome Biology [online] 2011; 12: 233. DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-233.

85. Mwaura B, Mahendran B, Hynes N, Defreitas D, Avalos G, Adegbola T, Adham M, Connolly CE, Sultan S. The impact of differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer, matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 and PDGF-AA on the chronicity of venous leg ulcers. Eur J Vasc Endovasc Surg 2006; 31: 306-10.

86. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Review. Cardiovascular Research 2006; 69: 562–573.

87. Nagy N, Szabad G, Szolnoky G et al. Chronic nonhealing wounds: Could leg ulcers be hereditary? Hindawi Publishing Corporation, Ulcers 2013; Article ID 219257, 4 pages, http://dx.doi.org/10.1155/2013/219257.

88. Nagy N, Szolnoky G, Szabad G et al. Tumor Necrosis factor-alpha-308 polymorphism and leg ulceration – possible association with obesity. J Invest Dermatol 2007; 127: 1768.

89. Nagy N, Szolnoky GY, Szabad G et al. Single Nucleotide Polymorphisms of the Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Gene in Patients with Chronic Venous Insufficiency with Leg Ulcer. Journal of Investigative Dermatology 2005; 124, 1085–1088.

90. Nelzen O, Bergqvist D, Lindhagen A. Venous and non-venous leg ulcers: clinical history and appearance in a population study. Br J Surg 1994; 81: 182-187.

91. Nemeth KA, Harrison MB, Graham ID, Burke S. Understanding venous leg ulcer pain: results of a longitudinal study. Ostomy/Wound Manage 2004; 50: 34-46.

92. Nicolaides A., Kakkos S, Eklof B et al. Management of chronic venous disorders of the lower limbs. Guidelines according to scientific evidence. Int Angiol 2014; 33: 87-208.

93. O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. Lancet 1981; 1: 75–78.

94. O'Donnell TF, Lau J. A systematic review of randomized controlled trials of wound dressings for chronic venous ulcer. Journal of Vascular Surgery 2006; 44: 1118.

95. Pavkova Goldbergova M, Jarkovsky J, Lipkova J et al. Relationship of long-term prognosis to MMP and TIMP polymorphisms in patients after ST elevation myocardial infarction. J Appl Genet 2017 Jan 18. doi: 10.1007/s13353-016-0388-8. [Epub ahead of print]

96. Perrin MR, Eklof B. Chronic venous disease guidelines and terminology: sharing a common language. Medicographia 2011; 33: 245-252.

97. Persoon A, Heinen MM, Vleuten CJM, Rooij MJ, Kerkhof PCM, Achterberg T. Leg ulcers: a review of their impact on daily life. J Clin Nurs 2004; 13: 341-354.

98. Phillips TJ, Gilchrest BA. Cultured allogeneic keratinocyte grafts in the management of wound healing: prognostic factors. J Dermatol Surg Oncol 1989; 15: 1169–1176.

99. Phillips TJ, Gilchrest BA. Cultured epidermal grafts in the treatment of leg ulcers. Adv Dermatol 1990; 5: 33–50.

100. Phillips TJ, Kehinde O, Green H, Gilchrest BA. Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. J Am Acad Dermatol 1989; 21: 191–199.

101. Phillips TJ, Leigh IM, Purkis PE. Expression of keratin polypeptides and histocompatibility antigens in wounds treated with allografts of cultured keratinocytes. J Invest Dermatol 1986; 87: 101.

102. Pospíšilová A. Chronické žilní onemocnění a léčba venofarmaky. Česká dermatovenerologie 2011; 1: 27-33.

103. Pospíšilová A. Komplexní pojetí léčby chronických ran. Čs Derm 2005; 80: 82-86.

104. Pospíšilová A. Léčba ulcerací dolních končetin kultivovanými epidermálními štěpy. Prakt Flebol 1995; 1: 8–11.

105. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. J Biol Chem 2001; 276: 7549-58.

106. Rabe E, Guex JJ, Puskas A, Scuderi A, Fernandez Quesada F. Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program. Int Angiol 2012; 31: 105-15.

107. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. Biochem Pharmacol 2008; 75: 346-59.

108. Ramelet AA, Boissean MR, Allegra C. Veno-active drugs in the management of chronic venous disease. An international consensus statement: Current medical position, prospective views and final resolution. Clin Hemorheol Microcirc 2005; 33: 309-319.

109. Ramelet AA, Perrin M, Kern P, Bounameaux H. Phlebology. Elsevier Masson 2008.

110. Rayment EA, Upton Z., Shooter GK. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. Br J Dermatol 2008; 158: 951-61.

111. Renner R, Teuwen I, Gebhardt C, Simon JC. Mathematical model for wound healing following autologous keratinocyte transplantation. International Wound Journal 2008; 5: 445.

112. Resl V. Hojení chronických ran. Grada Publishing, 1997; 201: 177–179, 326–328.

113. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of colonies from single cells. Cell 1975; 6: 331–344.

114. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CJ. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. BBA Molecular Cell Research 2010; 1803: 39–54.

115. Ruckley CV. Socioeconomic impact of chronic venous insufficiency and leg ulcers. Angiology 1997; 48: 67-69.

116. Saito S, Trovato MJ, You R, et al. Role of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in chronic venous insufficiency. J Vasc Surg 2001; 34: 930-938.

117. Schultz GS, Mast BA. Molecular analysis of the environment of healing and chronic wounds: cytokines, proteases and growth factors. Wounds 1998; 10 (Suppl. F): 1F-9F.

118. Singer AJ, Simon M. Wound Healing and Skin Substitutes, Stem Cell and Gene-Based Therapy 2006; (375-393, 10.1007/1-84628-142-3_27.

119. Singh K, Agrawal NK, Gupta SK, Singh K. A functional single nucleotide polymorphism -1562C>T in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers. Int J Low Extrem Wounds 2013; 12: 199-204. doi: 10.1177/1534734613493289. Epub 2013 Sep 16.

120. Soejima K, Shimoda K, Kashimura T, Yamaki T, Kono T, Sakurai H, Nakazawa H. Wound dressing material containing lyophilized allogeneic cultured cells. Cryobiology 2013; 66: 210.

121. Somers T, Duinslaeger L, Delaey B et al. Stimulation of epithelial healing in chronic postoperative otorrhea using lyophilized cultured keratinocyte lysates. Am J Otol 1997; 18: 702–706.

122. Tang L, Liu H, Wang Y, Xian Ch, Su A. Evaluation of the biocompatibility of acellular porcine dermis. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2007; 57: 215.

123. Tatsioni A, Balk E, O'Donnell TF, Lau J. Usual Care in the Management of Chronic Wounds: A Review of the Recent Literature. Journal of the American College of Surgeons 2007; 205: 617.

124. Teepe RG, Koebrugge EJ, Zeeman RJ et al. The treatment of chronic skin ulcers with cryo-preserved cultured allogeneic epidermis. Ned Tijdschr Geneeskd 1990; 134: 750–754.

125. Teepe RG, Kreis RW, Koebrugge EJ et al. The use of cultured autologous epidermis in the treatment of extensive burn wounds. J Trauma 1990; 30: 269–275.

126. Teepe RGC, Koebrugge EJ, Ponec M, Vermeer BJ. Fresh versus cryopreserved cultured allografts for the treatment of chronic skin ulcers. Br J Dermatol 1990; 122: 81–89.

127. Terskikh VV, Vasiliev AV. Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. Int Rev Cytol 1999; 188: 41–72.

128. Thakral G, La Fontaine J, Kim P, Najafi B, Nichols A, Lavery LA. Treatment Options for Venous Leg Ulcers, Advances in Skin & Wound Care 2015; 28: 164.

129. Thivolet J, Faure M, Demidem A. Long term survival and immunological tolerance of human epidermal allografts produced in culture. Transplantation 1986; 4: 274–280.

130. Vaalamo M, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J and Saarialho-Kere U. Distinct Expression Profiles of Stromelysin-2 (MMP-10), Collagenase-3 (MMP-13), Macrophage Metalloelastase (MMP-12), and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 (TIMP-3) in Intestinal Ulcerations. Am J Pathol 1998; 152: 1005-1014.

131. Vasku A, Vasku JB, Necas M, Vasku V. Matrix metalloproteinase-2 promoter genotype as a marker of cutaneous T-cell lymphoma early stage. J Biomed Biotechnol 2010; 2010: 805907. doi: 10.1155/2010/805907. Epub 2010 Jun 29.

132. Visse R., Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Structure, Function, and Biochemistry. Circ Res 2003; 92: 827-839.

133. Vojtíšková, J. Czech Vein Program – výsledky epidemiologického programu. Prakt. flebol. 2012; 21: 8–13.

134. Vytrasova J, Tylsova A, Brozkova I, Cervenka L, Pejchalova M, Havelka P. Antimicrobial effect of oxidized cellulose salts. J Ind Microbiol Biotechnol 2008; 35: 1247-52. doi: 10.1007/s10295-008-0421-y. Epub 2008 Aug 20.

135. Wallace HJ, Vandongen YK, Stacey MC. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism associated with increased susceptibility to venous ulceration. J Invest Dermatol 2006; 126: 921-925.

136. Wang L, Ma Y et al. Association of MMP-9 gene polymorphisms with acute coronary syndrome in the Uygur population of China. World J Emerg Med 2011; 2: 104-110.

137. Widgerow AD. Chronic wound fluid – thinking outside the box. Wound Rep Reg 2011; 19: 287-291.

138. Xu HM, Zhao Y, Zhang XM, Zhu T, Fu WG. Polymorphisms in MMP-9 and TIMP-2 in Chinese patients with varicose veins. J Surg Res 2011; 168: e143-e148.

139. Yang W, Lu J, Yang L, Zhang J. Association of Matrix Metalloproteinase-9 Gene -1562C/T Polymorphism with Essential Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis Article. Iran J Public Health 2015; 44: 1445-52.

6. Abstrakt

A background of chronic venous leg ulcers and their treatment

Background: Chronic leg ulcers represent a major health problem and they have a long-term negative influence on quality of life of the patients. Venous leg ulcers are the most serious stage of chronic venous disease. Genetic background of chronic venous disease as well as new modalities of treatment (cultured epidermal allografts and oxidated cellulose) were investigated.

Aims and methods: Gene polymorphisms can play an important role in the progression of chronic venous disease and the development of venous leg ulcers. The project was scheduled as a case–control study to investigate the correlation between MMP-2 (rs243864), MMP-9 (3918242), MMP-12 (rs7123600) and TIMP-2 (rs8176329) polymorphisms and chronic venous disease (CVD) risk. The genotype and phenotype research envisages the testing of possible associations between MMP and TIMP-2 genotypes and phenotypes of CVD. 150 patients with CVD and 227 controls were enrolled into the study. The MMPs and TIMP-2 genotypes were identified by the PCR method and restriction analysis according to standard protocols.

We also investigated new treatment modalities of chronic venous leg ulcers. Two large studies were conducted. The aim of our first study was to compare the effect of cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of venous leg ulcers as there was no clinical experience with the use of lyophilized allografts in this indication in our country yet. Fifty patients were selected to this study and the treatment was evaluated over a 3-month period after application.

In our second study, safety and effectivity of oxidated cellulose (OC) in the treatment of chronic venous leg ulcers were evaluated. Thirty patients were involved in this study. Half of patients was treated with the hydrogencalcium salt of OC, the other half was treated with the pure OC. Healing was evaluated weekly for the period of two months.

Results: We found exciting results concerning genetic background of chronic venous disease. The G allele of MMP-2 -790 T/G was 1.85 times more frequent in men with CVD than in the control group (P = 0.008). The T allele of MMP-9 -1562 C/T was observed 2.571 times more frequently in patients with CVD than in the control individuals (both in men and women) with

clinically significant specificity (P = 0.0000009). The G allele of MMP-12 rs7123600 was determined 2.082 times more frequently in female patients with CVD than in the control group with clinically significant specificity (P = 0.02). No significant result in TIMP-2 rs8176329 polymorphism in the case–control study was observed. CVD women with G allele in MMP-2 -790 T/G in the genotype–phenotype study are seen to develop ulceration 2.539 times more frequently (P = 0.003). The G allele of MMP-12 rs7123600 was detected 3.167 times more frequently in CVD women with ulceration compared with CVD women without ulceration (P = 0.007). In CVD men in C6 stage, the incidence of AG genotype in rs7123600 MMP-12 polymorphism was found to be 4.675 times higher compared to CVD women with C6 staging (P = 0.005). The AG genotype in TIMP 2 rs8176329 polymorphism was found to be associated with higher risk of tumour (P = 0.01).

In our next clinical study, we found that the cryopreserved and lyophilized cultured allografts are comparable in healing rate, course of healing and relief of pain, and also in planimetric changes during the healing of venous leg ulcers. Lyophilized allografts are more convenient for routine use than cryopreserved allografts as they can be stored and transported at room temperature and the cost of the treatment is lower.

We also proved that oxidated cellulose (OC) accelerates chronic leg ulcers healing especially influencing granulation and epithelisation. Statistical evaluation showed better results in patients treated with hydrogencalcium salt of OC than in patients treated with pure OC. After one week the pain relief was already evident thus improving the quality of life even before wound closure.

Conclusions: Genetic screening and studying gene polymorphisms can contribute to better identification of patients who are at higher risk of developing CVD, while providing the most appropriate prevention and treatment strategies for limiting the progression and complications of CVD. Application of cultured epidermal allografts takes place in the modern treatment of chronic leg ulcers. Our results could give rise to the more frequent use of lyophilized allografts in slowhealing venous leg ulcers. Oxidated cellulose accelerates wound healing and leads to pain relief and improvement of quality of life.

7. Seznam zkratek

ABPI .....index tlaku kotník/paže (ankle/brachial pressure index)

ACS.....akutní koronární syndrom (acute coronary syndrome)

BM.....bazální membrána

CVD.....chronické žilní onemocnění (chronic venous disease)

CVI .....chronická žilní insuficience (chronic venous insufficiency)

DNA.....deoxyribonukleová kyselina

ECM.....extracelulární matrix

EDTA.....ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)

EGF.....epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)

FGF.....fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)

HLA.....hlavní histokompatibilní komplex (Human Leucocyte Antigen)

ICH DKK.....ischemická choroba dolních končetin

ICHS.....ischemická choroba srdeční

IL.....interleukin

KEA.....kultivované epidermální alografty

KEC.....kultivované epidermální keratinocyty

MMP.....matrix metaloproteinázy

mRNA.....messengerová ribonukleová kyselina (messenger RNA)

NRS.....numerická škála bolesti (numerical rating scale)

OC.....oxidovaná celulóza

OR.....odds ratio

PCR.....polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PDGF.....růstový faktor z destiček (platelet derived growth factor)

RCT.....randomizovaná klinická studie (randomized control trial)

SNP.....jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotid polymorphism)

TGF .....transformující růstový faktor (transforming growth factor)

TIMP.....tkáňové inhibitory MMP

TNF.....tumor-nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)

VAD.....venoaktivní léky (venoactive drugs)

VAS.....vizuální analogová škála (visual analogue scale)

VEGF.....vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

Přílohy

ORIGINAL ARTICLE

Genetic predisposition for chronic venous insufficiency in several genes for matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MMP-12) and their inhibitor TIMP-2

V. Slonková,[1,*] V. Slonková Jr,[2] A. Vašků,[2] V. Vašků[1]

[1]First Department of Dermatovenereology, St. Ann's Faculty Hospital and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

[2]Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

*Correspondence: V. Slonková. E-mail: veronika.slonkova@fnusa.cz

Abstract

Objective The project was scheduled as a case–control study to investigate the correlation between MMP-2 (rs243864), MMP-9 (3918242), MMP-12 (rs7123600) and TIMP-2 (rs8176329) polymorphisms and chronic venous disease (CVD) risk. The genotype and phenotype research envisages the testing of possible associations between MMP and TIMP-2 genotypes and phenotypes of CVD.

Material and Methods 150 patients with CVD and 227 controls were enrolled into the study. The MMPs and TIMP-2 genotypes were identified by the PCR method and restriction analysis according to standard protocols.

Results The G allele of MMP-2 -790 T/G was 1.85 times more frequent in men with CVD than in the control group ($P = 0.008$). The T allele of MMP-9 -1562 C/T was observed 2.571 times more frequently in patients with CVD than in the control individuals (both in men and women) with clinically significant specificity ($P = 0.0000009$). The G allele of MMP-12 rs7123600 was determined 2.082 times more frequently in female patients with CVD than in the control group with clinically significant specificity (P = 0.02). No significant result in TIMP-2 rs8176329 polymorphism in the case–control study was observed. CVD women with G allele in MMP-2 -790 T/G in the genotype–phenotype study are seen to develop ulceration 2.539 times more frequently ($P = 0.003$). The G allele of MMP-12 rs7123600 was detected 3.167 times more frequently in CVD women with ulceration compared with CVD women without ulceration ($P = 0.007$). In CVD men in C6 stage, the incidence of AG genotype in rs7123600 MMP-12 polymorphism was found to be 4.675 times higher compared to CVD women with C6 staging ($P = 0.005$). The AG genotype in TIMP 2 rs8176329 polymorphism was found to be associated with higher risk of tumour ($P = 0.01$).

Conclusion Studying these polymorphisms can contribute to better identification of patients at higher risk of developing CVD, while providing the most appropriate prevention and treatment strategies for limiting the progression and complications of CVD.

Received: 7 April 2017; Accepted: 21 June 2017

Conflicts of interest

None delcared.

Funding sources

This publication was written at Masaryk university as part of the project "Hodnocení diagnostických a terapeutických metod u pacientů s vybranými kožními nemocemi", number 1420/2016 and "Patofyziologické biomarkery u komplexních nemocí", number 1401/2016 with the support of the Specific University Research Grant, as provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Introduction

The chronic venous disease (CVD) is a common disorder of lower extremities.[1] CVD has seven clinical stages C0-6 according to CEAP (clinical–aetiology–anatomy–pathophysiology) classification, with C0 indicating no visible sign of venous disease, C1 telangiectasies (spider veins), C2 are varicose veins (VVs), C3 is oedema, C4a are skin pigmentation or eczema, C4b is lipodermatosclerosis or atrophy blanche, C5 is a healed ulcer and C6 is an active ulcer. Stages C4-6 presents the advanced stage of the disease and they are called chronic venous insufficiency (CVI).[1,2] Only 10% of individuals with stage C2 (VVs) develop venous leg ulcers (VLU).[3]

 © 2017 European Academy of Dermatology and Venereology

The major risk factors for venous disease include age, female gender, obesity, pregnancy, prolonged orthostasis, history of deep vein thrombosis (DVT) and family history.[4] Genetic predisposition is another important risk factor of CVD. It has been found that the probability of developing varicose veins in an individual amounts to 90%, if both parents suffer from this disease, but not more than 20%, if the family history is negative.[5,6] Genetic risk factors can substantially contribute to the risk of DVT, while impairing the wound healing process, and can also be related to vein wall remodelling.[7]

Venous hypertension and changes in the venous wall structure play an important role in the pathophysiology of CVD.[8,9] Prolonged increase of venous pressure and vein wall tension is thought to induce MMP activators leading to increased MMP expression/activity and ECM degradation, VSM relaxation and venous dilation.[1,10] Leucocyte infiltration and inflammation of the vein wall cause further increase in MMPs, vein wall dilation and valve dysfunction.[10] Remodelling and fibrosis of the venous wall is the final result of this vicious circle,[8] and it leads to progressive venous dilation and VVs formation.[1] The extracellular matrix composition depends on MMPs and may affect the vein wall structure.[4] Certain unbalanced collagen types in the venous wall are present in CVD – the level of collagen type III is low, whereas the collagen type I is seen to have risen. As type I collagen supports rigidity and collagen type III provides distensibility of tissues, these changes can result in weakening and reduced elasticity of VV.[8]

MMPs are zinc-binding endopeptidases that degrade various components of ECM, such as collagen and elastin. Gelatinases include MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B). They digest gelatine, but also type IV, V and XI collagens and laminin. Gelatinases have three fibronectin type II repeats inserted in the catalytic domain that bind to gelatin.[1,11] Pathophysiologically, excess activation of MMPs in tissue is controlled by their endogenous inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). An imbalance between activities of MMPs and TIMPs can cause increased levels of different MMPs in the tissue, with high probability of resulting in pathological changes of the vein wall and leading to CVD.[1] This imbalance in MMPs and TIMPs expressions can be modulated genetically.[8] Therefore, the genetic polymorphisms of MMPs and TIMPs are considered to be important predisposing factors for this imbalance.[5,12,13]

The study has been envisaged as a case–control study to investigate the relationship between MMP-2 (rs243864), MMP-9 (rs3918242), MMP-12 (rs7123600) and TIMP-2 (rs8176329) polymorphisms and CVD risk. In addition to that, it focuses upon the investigation of genotypes and phenotypes by way of testing the possible correlations between MMPs and TIMP-2 genotypes and phenotypes of CVD.

Materials and methods

Subjects

A total of 150 Czech patients (63 men and 87 women) with chronic venous disease (clinical stages C2-6 according to CEAP classification) and 227 control persons without signs of cardiovascular diseases were enrolled in the study.

All these patients were treated at the First Department of Dermatovenereology, St. Ann Faculty Hospital in Brno, Czech Republic.

Demographic data are shown in Table 1. The patients with CVD were treated also for many comorbidities: totally 105 patients were treated for hypertension (49 men and 56 women), 50 patients (34 men and 16 women) were treated for ischaemic heart disease and 51 patients with CVD for diabetes mellitus (24 men and 27 women). More than 50% of patients with CVD were obese – 81 patients (30 men and 51 women). In 12 patients, thrombophilia state in personal history was reported (7 men and 5 women); 21 patients suffered with tumour (11 men and 10 women).

The control group consisted of 227 healthy persons without signs of cardiovascular diseases and diabetes and without any associated therapy. Age and sex proportion were comparable between patients with CVD and controls.

The study was performed in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration and was approved by the Ethics Committee of the Masaryk University in Brno, Czech Republic. A written informed consent was obtained from each subject in the study.

Genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral leucocytes by a standard technique using proteinase K. Genotyping for MMP-2, MMP-9 and MMP-12 was performed by PCR with restriction analysis according to standardized protocols.[12,13]

Genotype in TIMP-2 polymorphism was identified by PCR method and restriction analysis according to standard protocols. PCR was performed using sense 5′-GCCCAGGGTGTTCTG-GATGG-3′ and antisense 5′-CTCCGGCTGATGGCCCCACT-3 primers with a PCR product of 221 bp. After the restriction analysis with Bsrl at 65°C for 4 h, using 2% agarose with ethidium bromide, UV light enabled to distinguish three genotypes: GG (221 bp), GA (221, 160, 61 bp) and AA (160, 61 bp).

Statistical analysis

In all investigated cohorts, the distributions of genotype and allelic frequencies and their differences were calculated using chi-square tests and Fisher's exact test. The consistency of genotype frequencies with the Hardy–Weinberg equilibrium was tested using chi-square tests on a contingency table of observed genotype frequencies vs. the predicted ones. Odds ratio (OR) and 95% confidence

 © 2017 European Academy of Dermatology and Venereology

Table 1 Demographic characteristics of patients with CVD

	Men (*N* = 63)	Women (*N* = 87)	*P*-value
Birth year (median, range)	1943 (1915-1975)	1946 (1923-1990)	0.069
Age of onset (median, range)	44 (21-90)	35 (16-80)	0.0004 P_{corr} = 0.01*
Duration of ulceration (months; median, range)	2 (0-144)	0 (0-168)	0.434
Dg according to CEAP classification (%)	C1 - 0	C1 – 1 (1)	0.580
	C2 - 0	C2 – 2 (2)	0.335
	C3 - 0	C3 – 12 (14)	0.001
	C4 – 8 (13)	C4 – 7 (8)	0.462
	C5 – 17 (27)	C5 – 24 (28)	0.543
	C6 – 38 (60)	C6 – 41 (47)	0.076
Ulceration (%)	39 (62)	24 28)	0.050
Relapsing ulceration (%)	53 (84)	34 (39)	0.312
Ischaemic disease of low limbs (%)	27 (43)	20 (23)	0.008
Family history of CVD (%)	39 (62)	68 (78)	0.05
Varices surgery (%)	9 (14)	12 (14)	0.557
Compression treatment (%)	61 (97)	83 (95)	0.502
Detralex therapy (%)	57 (90)	79 (91)	0.580
Cyclo 3 fort therapy (%)	1 (2)	3 (3)	0.440
Anticoagulation therapy (%)	29 (46)	26 (30)	0.032
Venous inflammation(%)	37 (59)	51 (59)	0.562
Erysipelas (%)	23 (37)	33 (38)	0.498
Home care (%)	17 (27)	14 (16)	0.078
Ischaemic heart disease (%)	34 (54)	16 (18)	0.00001 P_{corr} = 0.0003*
Hypertension (%)	49 (78)	56 (64)	0.055
Obesity (%)	30 (48)	51 (59)	0.121
Diabetes mellitus (%)	24 (38)	27 (31)	0.234
Thrombophilia (%)	7 (11)	5 (6)	0.186
Tumour (%)	11 (17)	10 (11)	0.211

Bonferroni correction for multiple comparison.

interval were calculated to estimate the risks related to detected polymorphisms. Then Fisher's exact test was used to calculate the significance of OR. Sensitivity and specificity of results were determined by Clinical Calculator 1 http://faculty.vassar.edu/lowry/clin1.html). An appropriate correction of multiple comparisons was achieved by way of Bonferroni correction. The program package Statistica v. 12.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK) was used.

Results

In demographic characteristics, two significant differences were observed between CVD men and women: earlier onset of CVD in women compared to men with comparable birth year (P_{corr} = 0.01) and significantly higher occurrence of ischaemic heart diseases in CVD men compared to women (P_{corr} = 0.0003, Table 1).

Case–control study

MMP-2 rs 243864 (-790 T/G, promoter) The frequencies of MMP-2 -790 T/G alleles and genotypes differed significantly between male patient with CVD and control groups (P_a = 0.02; P_g = 0.01). The G allele was 1.85 times more frequent in men with CVD than in the control group (46/80 vs. 55/177, P = 0.008, P_{corr} = 0.03, odds ratio = 1.85, 95% confidence interval 1.154-2.968, sensitivity 0.365, specificity 0.763, power test 0.693). Similar correlations were not calculated in women whose genotype was in the Hardy–Weinberg disequilibrium of CVD women (Table 2).

MMP-9 rs 3918242 (-1562 C/T, promoter) The frequencies of MMP-9 -1562 C/T alleles as well as the distribution of genotypes significantly differed between patient with CVD and control groups ($P_a = 8.9 \times 10^{-6}$; $P_g = 9.4 \times 10^{-6}$), both in men and women. The T allele was observed 2.571 times more frequently in patients with CVD than in the control individuals with clinically significant specificity (61/239 vs. 41/413, $P = 10^{-5,}$ odds ratio = 2.571, 95% confidence interval = 1.678-3.939, sensitivity 0.203, specificity 0.910, power test 0.984, Table 2).

 © 2017 European Academy of Dermatology and Venereology

Table 2 Case–control study in polymorphisms

Genotypes and alleles	MMP-2 (-790 T/G), rs243864						
	TT (%)	TG (%)	GG (%)	P_g	T	G	P_a
CVD group Men (*N* = 63)	25 (40)	30 (47)	8 (13)	**0.02**	0.63	0.37	**0.01**
Control group Men (*N* = 116)	71 (61)	35 (30)	10 (9)		0.76	0.24	
CVD group Women (*N* = 87)	40 (46)	27 (31)	20 (23)	HWD	0.61	0.39	HWD
Control group Women (*N* = 111)	60 (54)	35 (32)	16 (14)		0.70	0.30	
Genotypes and alleles	**MMP-9 (-1562 C/T), rs3918242**						
	CC (%)	CT (%)	TT (%)	P_g	C	T	P_a
CVD group Men (*N* = 63)	38 (60)	23 (37)	2 (3)	**0.0008**	0.79	0.21	**0.0002**
Control group Men (*N* = 116)	99 (85)	16 (14)	1 (1)		0.92	0.08	
CVD group Women (*N* = 87)	55 (63)	30 (35)	2 (2)	**0.007**	0.80	0.20	**0.01**
Control group Women (*N* = 111)	91 (82)	17 (15)	3 (3)		0.90	0.10	
CVD group – all (*N* = 150)	93 (62)	53 (35)	4 (3)	**9.4×10^{-6}**	0.80	0.20	**8.9×10^{-6}**
Control group – all (*N* = 227)	190 (84)	33 (15)	4 (1)		0.91	0.09	
Genotypes and alleles	**MMP-9 279 R/Q**						
	GG(%)	GA (%)	AA (%)	P_g	A	G	P_a
CVD group Men (*N* = 63)	24 (38)	28 (44)	11 (18)	0.984	0.60	0.40	0.996
Control group Men (*N* = 116)	45 (39)	50 (43)	21 (18)		0.60	0.40	
CVD group Women (*N* = 87)	33 (38)	36 (41)	18 (21)	0.395	0.59	0.41	0.145
Control group Women (*N* = 111)	52 (47)	42 (38)	17 (15)		0.66	0.34	
Genotypes and alleles	**MMP-12, rs7123600**						
	AA (%)	AG (%)	GG (%)	P_g	A	G	P_a
CVD group Men (*N* = 63)	52 (83)	8 (13)	3 (4)	HWD	0.89	0.11	HWD
Control group Men (*N* = 116)	98 (84)	16 (14)	2 (2)		0.91	0.09	
CVD group Women (*N* = 87)	62 (71)	25 (28)	1 (1)	**0.07**	0.85	0.15	**0.02**
Control group Women (*N* = 111)	93 (84)	18 (16)	0 (0)		0.92	0.08	
Genotypes and alleles	**TIMP-2, rs8176329**						
	GG (%)	GA (%)	AA (%)	P_g	G	A	P_a
CVD group Men (*N* = 63)	47 (75)	16 (25)	0 (0)	0.317	0.83	0.13	0-585
Control group Men (*N* = 116)	93 (83)	21 (17)	2 (0)		0.89	0.11	
CVD group Women (*N* = 87)	72 (83)	15 (17)	0 (0)	NA	0.91	0.09	0.380
Control group Women (*N* = 111)	97 (87)	14 (13)	0 (0)		0.94	0.06	

P_g - significance of a difference in genotype distribution.
P_a - significance of a difference in allelic frequencies.

© 2017 European Academy of Dermatology and Venereology

MMP-9 (rs3918242) 279 R/Q No significant result for the case–control study was observed (Table 2).

MMP-12 rs 7123600 (G/A, Intron) It was found that the frequencies of MMP-12 alleles and the genotypes differed significantly between female patient with CVD and control groups (P_a = 0.02; P_g = 0.07).

The G allele was observed 2.082 times more frequently in female patients with CVD than in the control group with clinically significant specificity (27/147 vs. 18/204, P = 0.02, odds ratio = 2.082, 95% confidence interval 1.105 – 3.920, sensitivity 0.155, specificity 0.919, power test 0.636, Table 2).

TIMP-2 rs8176329 No significant result for the case–control study was observed (Table 2).

Genotype–phenotype study

CVD women with G allele of MMP-2 -790 T/G polymorphism develop 2.539 times more frequently ulceration [allelic model of inheritance, 41/41 vs. 66/26, P = 0.0026, Pcorr = 0.01, OR = 2.539 (1.356-4.753), sensitivity 0.500, specificity 0.717, power test 0.812]. No substantial differences were found in men. As to the comparison between men and women, only insignificant differences were observed.

In addition to that, CVD women with the G allele in MMP-2 -790 T/G require 2.967 times more frequently home care compared to CVD women with other MMP-2 genotypes [allelic model of inheritance, 11/17 vs. 96/50, OR = 2.967 (1.291-6.818), P = 0.0083, P_{corr} = 0.03; sensitivity 0.393, specificity 0.342, power test = 0.713].

The results reflect a higher incidence of home care need in women patients with ulceration. No significant differences were found in men. However, only minor differences were observed between men and women.

In patients with CVD, the Q allele in MMP-9 R279Q was found to be significantly associated with obesity. The Q allele was observed 1.767 times more frequently in obese patients compared to lean ones with CVD (allelic model of inheritance; 92/46 vs. 86/76, P = 0.0115, P_{corr} = 0.05, OR = 1.767 (1.105-2.827), sensitivity 0,469, specificity 0,667, power test = 0.313).

The CT genotype carriers (-1562 C/T MMP-9) in patients with CVD appear 2.789 times more frequently in obese individuals, compared to both homozygote genotype carriers (heterozygote advantage model, CT vs. (CC+TT): 16/53 vs. 37/44, P = 0.0032, P_{corr} = 0.01, OR = 2.789 (1.370-5.664), sensitivity 0.457, specificity 0.768, power test = 0.799).

The G allele of MMP-12 rs7123600 is detected 3.167 times more frequently in CVD women with ulceration compared with CVD women without ulceration (allelic model: 84/8 vs. 63/19, P = 0.0074, P_{corr} = 0.03, OR = 3.167 (1.303-7.698), sensitivity 0.232, specificity 0.913, power test 0.669). Other comparisons are not significant.

Table 3 TIMP-2 rs 8176329 and family history of CVD and personal history of tumour

Family history of CVD	TIMP-2 rs8176329 GG	TIMP-2 rs8176329 AG	Row Totals
Negative	41 (91%)	4 (9%)	45
Positive	78 (74%)	27 (26%)	105
All Groups	119	31	150
Personal history of Tumour	**TIMP-2 rs8176329 GG**	**TIMP-2 rs8176329 AG**	**Row Totals**
Negative	107 (83%)	22 (17%)	129
Positive	12 (57%)	9 (43%)	21
All Groups	119	31	150

In CVD men with C6 staging, 4.675 times higher incidence of AG genotype in rs7123600 MMP-12 polymorphism compared to CVD women with C6 staging was found (heterozygote advantage model: AG vs. (AA+ GG): 5/33 vs. 17/24, P = 0,0047, P_{corr} = 0.02, OR = 4.675 (1.514-14.433), sensitivity 0.115, specificity 0.868, power test = 0.687).

In TIMP 2 rs8176329 polymorphism, there was a significant difference of diagnosis related to the age of CVD patients between GG and AG genotype carriers (P = 0.02). The AG genotype has 3.55 times more frequently positive family history of CVD compared to the GG genotype carriers (heterozygote advantage model, 27/78 vs. 4/41, OR = 3.55 (1.16-10.83), P = 0.01, P_{corr} = 0.04, sensitivity 0.262, specificity 0.911, power test 0.580, Table 3). Similarly, the AG genotype in TIMP 2 rs8176329 polymorphism was found to be burdened by higher risk of tumour (heterozygote advantage model, 9/12 vs. 22/107, OR = 3.65 (1.37-9.70), P = 0.01, P_{corr} = 0.04, sensitivity 0.429, specificity 0.829, power test 0.657, *Table* 3).

Discussion

We have found no publication studying the MMP-2 (-790 T/G) polymorphism association with CVD. We observed that the G allele was 1.85 times more frequent in men with CVD than in the control group. *In silico*, three transcription factors could be found in the DNA sequence including the T allele, but not G allele of −790 G/T MMP-2 polymorphism: KLF4 (Kruppel-like factor 4, S8 and Evi1 – ectopic viral integration site 1 encoded factor (according to the Transfac Matrix Table (MatInspector V2.2)). KLF4 represents the essential transcription factor, which is critical and selective for the establishment of the proper barrier function of the skin.[14] KLF4 was proved to interact with beta-catenin and to inhibit Wnt signalling.[15] Wnt probably induces a T-cell phenotype capable of migration through collagen.[16] The substantial evi1 is the highly conserved transcription factor that was shown to upregulate cell proliferation, to impair cell differentiation and also to induce malignant transformation.[17] Gormus *et al.*[9] studied two functional gene polymorphisms in -735 and -1306 regions of MMP-2 which are in linkage disequilibrium with MMP-2 (-790 T/G). The CC

 © 2017 European Academy of Dermatology and Venereology

genotype and C allele for MMP-2 -735 gene region were more common in the control group. However, there was no significant difference between groups for MMP-2 -1306 gene polymorphism. Wallace *et al.*[18] conducted a case–control study comparing the frequency of gene polymorphisms in 181 Caucasian patients with a history of confirmed venous leg ulceration and 181 age- and gender-matched healthy controls. Polymorphism in the MMP-2 (-1306 C/T) was not associated with ulceration in this study.

MMP-2 plays an important role in the progression of CVD leading to venous leg ulcer.

It was found that MMP-2 may induce venous relaxation or inhibit venous contraction[3] and that MMP-2 can influence remodelling of ECM in vascular structures.[9] MMP-2 and MMP-9 were also shown to be upregulated in experimentally induced venous hypertension.[19] Higher concentrations of MMP-2 in wound exudate have been found to correlate with impaired venous ulcer healing.[19] Non-healing venous ulcers are associated with high levels of MMP-2 as well as with low levels of TIMP-2 in the wound fluid.[20]

We proved a highly significant association of MMP-9 -1562C/T polymorphism with CVD. The T allele was observed 2.571 times more frequently in patients with CVD than in the control individuals with clinically significant specificity and power test values. This is not in agreement with results of Xu *et al.*[21] In their study, the CC genotype was associated with VVs patients compared to the controls. The difference between results can be explained by different composition of the patients group; VVs of our patient group represent only two persons according to the CEAP classification (Table 1).

Kunt *et al.*[5] investigated the relationship between polymorphisms of MMP-9 (-1562 C/T) and TIMP2 (418G/C) and varicose vein risk in the Turkish population. The frequencies of MMP-9 alleles and genotypes did not differ significantly between patient and control groups. The difference between this study and the Chinese study could be explained by the difference between control groups.

MMP-9 -1562C/T polymorphism has been reported to be associated with several cardiovascular diseases like atrial fibrillation, atherosclerosis, carotid atherosclerosis and coronary artery disease.[22–24] Wang *et al.*[23] proved that MMP-9 -1562C>T polymorphism is associated with the susceptibility to acute coronary syndrome (ACS) in the Uygur population of China. The frequency of CT and TT genotypes in patients with ACS was significantly higher than that in the control group. Yang *et al.*[22] performed a systematic review and meta-analysis to evaluate the association of MMP-9 -1562C/T polymorphism with essential hypertension. MMP-9 -1562C/T polymorphism was associated with essential hypertension under the allelic model (T vs. C, $P < 0.0001$). Singh *et al.*[25] found the T allele risk in MMP-9 -1562C>T) polymorphism for higher expression MMP-9 in diabetic foot ulcers (DFUs).

Another SNP (R279Q) polymorphism of MMP-9 is not significantly associated with the risk of ACS.[23]

MMP-9 is considered to be the main protease in ECM degradation in chronic wounds.[26] It is critical for keratinocyte migration, reepithelialization and angiogenesis. The levels of MMP-9 are much higher in chronic wounds.[26] It has been found that high levels of MMP-9 correlate with slower wound healing.[26–29]

MMP-9 levels have been shown to be high in cases of varicose veins and venous ulcers.[7] Deatrick *et al.*[30] revealed that MMP-9 influences vein remodelling by modulating vein wall collagen content, thus contributing to inflammation and fibrosis.

In the near future, the wound exudate is planned to be tested in patients included in this project for studying the activity of the corresponding MMPs.

In intron polymorphism rs7123600 in MMP-12, the G allele was observed 2.082 times more frequently in female patients with CVD than in the control group with clinically significant specificity in our study. Gemmati *et al.*[31] investigated single nucleotide polymorphism of MMP-12 -82A/G in patients with CVD. It was proved that the AA genotype suffered from higher venous leg ulcer risk in primary venous leg ulcers ($P = 0.01$). Patients with MMP-12 -82GG genotype had a significantly ($P = 0.001$) smaller mean ulcer size than patients with -82AA a -82AG genotypes (twofold smaller). This is the result of the protective effect of SNP-specific genotypes, leading to a faster healing.[8]

MMP-12 (macrophage metalloelastase) enables the macrophages to migrate by digesting several ECM components. MMP-12 may block angiogenesis by converting plasminogen to angiostatin, acting as a potent inhibitor of angiogenesis.[31] MMP-12 is highly expressed in venous leg ulcers.[32] Ligi *et al.*[33] found that wound fluid (WF) from inflammatory (Infl) phase of venous leg ulcers (VLU) contained significantly increased concentrations of MMP-12 compared to WF from the granulating (Gran) phase of VLU.

In our genotype–phenotype study, leg ulceration was associated with G allele of MMP-2-790 T/G polymorphism as well as with the AG genotype of rs7123600 MMP-12 polymorphism. The AG genotype in MMP-12 carries an almost five times higher risk of developing the C6 stage in CVD men compared to women. The result is highly clinically specific.

A significant association with obesity was observed (the T allele of MMP-2 -790 T/G, Q allele in MMP-9 R279Q polymorphisms). It is very well known that obese patients suffer from more complicated wound healing process due to a number of reasons: decrease of tissue perfusion, hypoxia, increased intraabdominal pressure, immobilization, infection related often to long-term hospitalization. The risk characteristics of obesity has been confirmed by several long-time studies.[8] Although our case–control study did not reveal significant differences in TIMP-2 rs8176329 polymorphism, the AG genotype was associated with family history of CVD as well as with personal history

 © 2017 European Academy of Dermatology and Venereology

related to tumours, reflecting the participation of this polymorphism in the disequilibrium between MMPs and TIMPs expression in tissue during wound healing.

Studying these polymorphisms can support better identification of patients who are at higher risk of developing CVD, while providing the most appropriate prevention and treatment strategies for limiting the progression and complications of CVD and reducing the recurrence of VVs.

References

1 Kucukguven A, Khalil RA. Matrix metalloproteinases as potential targets in the venous dilation associated with varicose veins. *Curr Drug Targets* 2013; **14**: 287–324.

2 Eklöf B, Rutherford RB, Bergan JJ *et al.* Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J Vasc Surg* 2004; **40**: 1248–52. [PubMed: 15622385].

3 Flour M. Are we any better at identifying the risk factors for chronic venous disease progression? *Medicographia* 2011; **33**: 315–319.

4 Kurzawski M, Modrzejewski A, Pawlik A, Droździk M. Polymorphism of matrix metalloproteinase genes (MMP1 and MMP3) in patients with varicose veins. *Clin Exp Dermatol* 2009; **34**: 613–617.

5 Kunt AT, Isbir S, Gormus U *et al.* Polymorphisms of MMP9 and TIMP2 in Patients with Varicose Veins. *In Vivo* 2015; **29**: 461–5.

6 Cornu-Thenard A, Boivin P, Baud JM, De Vincenzi I, Carpentier PH. Importance of the familial factor in varicose disease. Clinical study of 134 families. *J Dermatol Surg Oncol* 1994; **20**: 318–326.

7 Bharath V, Kahn SR, Lazo-Langner A. Genetic polymorphisms of vein wall remodeling in chronic venous disease: a narrative and systematic review. *Blood* 2014; **124**: 1242–1250. https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-558478.

8 Boisseau MR. Chronic venous disease and the genetic influence. *Phlebolymphology* 2014; **21**: 100–111.

9 Görmüş U, Kahraman OT. MMP2 gene polymorphisms and MMP2 mRNA levels in patients with superficial varices of lower extremities. *In Vivo* 2011; **25**: 387–392.

10 MacColl E, Khalil RA. Matrix metalloproteinases as regulators of vein structure and function: implications in chronic venous disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2015; **355**: 410–428.

11 Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Review. Cardiovascular Research* 2006; **69**: 562–573.

12 Benesová Y, Vasků A, Stourac P *et al.* Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008; **205**(1–2): 105–9. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.08.007. Epub 2008 Oct.

13 Vasku A, Vasku JB, Necas M, Vasku V. Matrix metalloproteinase-2 promoter genotype as a marker of cutaneous T-cell lymphoma early stage. *J Biomed Biotechnol* 2010; **2010**: 805907. https://doi.org/10.1155/2010/805907. Epub 2010 Jun 29.

14 Segre JA, Bauer C, Fuchs E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* 1999; **22**: 356–360.

15 Evans PM, Chen X, Zhang W, Liu C. KLF4 interacts with β-catenin/TCF4 and blocks p300/CBP recruitment by β-catenin. *Mol Cell Biol* 2010; **30**: 372–381.

16 Wu B, Crampton SP, Hughes CCW. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 2007; **26**: 227–239.

17 Fuchs O. EVI1 and its role in myelodysplastic syndrome, myeloid leukemia and other malignant diseases. *Casopis Lekaru Ceskych* 2006; **145**: 619–624.

18 Wallace HJ, Vandongen YK, Stacey MC. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism associated with increased susceptibility to venous ulceration. *J Invest Dermatol* 2006; **126**: 921–925.

19 Lim CS, Shalhoub J, Gohel MS, Shepherd AC, Davies AH. Matrix metalloproteinases in vascular disease–a potential therapeutic target? *Curr Vasc Pharmacol* 2010; **8**: 75–85.

20 Mwaura B, Mahendran B, Hynes N *et al.* The impact of differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer, matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 and PDGF-AA on the chronicity of venous leg ulcers. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; **31**: 306–10.

21 Xu HM, Zhao Y, Zhang XM, Zhu T, Fu WG. Polymorphisms in MMP-9 and TIMP-2 in Chinese patients with varicose veins. *J Surg Res* 2011; **168**: e143–e148.

22 Yang W, Lu J, Yang L, Zhang J. Association of matrix metalloproteinase-9 gene -1562C/T polymorphism with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis article. *Iran J Public Health* 2015; **44**: 1445–52.

23 Wang L, Ma Y, Xie X *et al.* Association of MMP-9 gene polymorphisms with acute coronary syndrome in the Uygur population of China. *World J Emerg Med* 2011; **2**: 104–110.

24 Pavkova Goldbergova M, Jarkovsky J, Lipkova J *et al.* Relationship of long-term prognosis to MMP and TIMP polymorphisms in patients after ST elevation myocardial infarction. *J Appl Genet* 2017. https://doi.org/10.1007/s13353-016-0388-8. [Epub ahead of print]

25 Singh K, Agrawal NK, Gupta SK, Singh K. A functional single nucleotide polymorphism -1562C>T in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds* 2013; **12**: 199–204. https://doi.org/10.1177/1534734613493289. Epub 2013 Sep 16.

26 Widgerow AD. Chronic wound fluid – thinking outside the box. *Wound Rep Reg* 2011; **19**: 287–291.

27 Ladwig GP, Robson MC, Liu R, Kuhn MA, Muir DF, Schultz GS. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; **10**: 26–37.

28 Liu Y, Min D, Bolton T *et al.* Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2009; **32**: 117–19.

29 Rayment EA, Upton Z, Shooter GK. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *Br J Dermatol* 2008; **158**: 951–61.

30 Deatrick KB, Elfline M, Baker N *et al.* Postthrombotic vein wall remodeling: preliminary observations. *J Vasc Surg* 2011; **53**: 139–146.

31 Gemmati D, Federici F, Catozzi L *et al.* DNA-array of gene variants in venous leg ulcers: detection of prognostic indicators. *J Vasc Surg* 2009; **50**: 1444–1451.

32 Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. *Wound Repair Regen* 2008; **16**: 642–648.

33 Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease - Part II: proteolytic biomarkers in wound healing. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1862**: 1900–8. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.07.011. Epub 2016 Jul 25.

 © 2017 European Academy of Dermatology and Venereology

C1 MMP-9 GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH CHRONIC VENOUS DISEASE

Veronika Slonková [1], Vladimír Vask [1], Anna Vask [2]
[1] *St.Ann University Hospital, Brno, Czech Republic*
[2] *Medical Faculty, Masaryk University, Brno, Czech Republic*

AIM Chronic venous disease (CVD) is a common disorder of lower extremities. Genetic predisposition is known to be an important risk factor for CVD. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene -1562C/T polymorphism has been reported to be associated with several cardiovascular diseases. The aim of this case-control study was to investigate the relationship between polymorphism of MMP-9 (-1562 C/T) and CVD risk.

MATERIALS AND METHODS A total of 150 Czech patients with chronic venous disease (clinical stages C2-6 according to CEAP classification) and 227 controls were enrolled in the study. The patients were genotyped for the polymorphism in MMP-9(-1562 C/T) gene using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-based methodology.

RESULTS A significant association between CVD and -1562C/T polymorphism in MMP-9 gene was found. The frequencies of MMP-9 alleles and distribution of genotypes significantly differed between CVD patient and control groups (Pa =8.94x10-6; Pg =9.46x10-6), both in men and women. The T-allele was observed 2.571times more frequently in CVD patients than in the control individuals with clinically significant specificity (61/239 *vs.* 41/413, P= 0.0000009, odds ratio =2.571, 95% confidence interval = 1.678-3.939; sensitivity 0.203, specificity 0.910, power test 0.984).

CONCLUSION These results suggest that MMP-9 polymorphism (-1562 C/T) is significantly associated with CVD in the Czech population.

phoma. However, negative results of sporotrichin and tuberculin tests in our patient indicated reduced cellular immunity, since sporotrichin made from cultured *S. schenckii* is a valid antigen for diagnosis of sporotrichosis with limitation [9]. The duration of the depression of cellular immunity by the lymphoma may not have been long enough for the patient to develop lymphatic and systemic involvement.

Itraconazole is reported to be suitable for treatment of HIV-infected patients with sporotrichosis [10]. Sporotrichosis in our patient with disseminated malignant lymphoma also responded well to itraconazole, suggesting that itraconazole is effective against sporotrichosis in immunocompromised patients.

References

1 Honbou S, Urabe H: Sporotrichosis; in Yamamura R, Kukita A, Sano E, Seiji M (eds): Handbook of Dermatology 7A (in Japanese). Tokyo, Nakayama Shoten, 1982, pp 96–109.
2 Heller HM, Fuhrer J: Disseminated sporotrichosis in patients with AIDS: Case report and review of the literature. AIDS 1991;5:1243–1246.
3 Johnson RA, Dover JS: Cutaneous manifestations of human immunodeficiency virus disease; in Fitzpatric TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds): Dermatology in General Medicine. New York, McGraw-Hill, 1993, pp 2637–2689.
4 Hiruma M, Katoh T, Yamamoto I, Kagawa S: Local hyperthermia in the treatment of sporotrichosis. Mykosen 1987;30:315–321.
5 Lynch PJ, Voorhees JJ, Harrell R: Systemic sporotrichosis. Ann Intern Med 1970;73:23–30.
6 Wilson DE, Mann JJ, Bennett JE, Utz JP: Clinical features of extracutaneous sporotrichosis. Medicine 1967;46:265–279.
7 Kumar S, Kumar D, Gourley WK, Alperin JB: Sporotrichosis as a presenting manifestation of hairy cell leukemia. Am J Hematol 1994;46:134–137.
8 Hay RJ, Roberts SOB, MacKenzie DWR: Mycology; in Champion RH, Burton JL, Ebling FJG (eds): Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1992, pp 1127–1216.
9 Ishizaki H, Nakamura Y, Hasegawa A: Low-titer agglutinins to *Sporothrix schenckii* in nonsporotrichotic human and animal sera. J Dermatol 1983; 10:501–504.
10 Bolao F, Podzamczer D, Ventin M, Gudiol F: Efficacy of acute phase and maintenance therapy with itraconazole in an AIDS patient with sporotrichosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:609–612.

Hatsuki Shiraishi, MD
Department of Dermatology, Teikyo University School of Medicine, Ichihara Hospital, Anesaki 3426-3, Ichihara, Chiba 299-0111 (Japan), Tel. +81 436 62 1211, Fax +81 436 62 1273

Dermatology 1999;198:101–103

Cultured Epithelial Autografts for the Management of a Chronic Pretibial Leg Ulcer due to Congenital Valvular Aplasia

V. Slonkova[a], M. Kino-oka[b], S. Mazza[b], C. Nievergelt[b], J.E. Prenosil[b], G. Burg[a], J. Hafner[a]

[a]Department of Dermatology, University Hospital of Zurich, and
[b]Department of Chemical Engineering, ETH Zurich, Switzerland

Key Words
Cultured epithelial autografts • Keratinocyte graft • Leg ulcer • Congenital valvular aplasia

Cultured epithelial autografts (CEA) and allografts are a promising treatment for recalcitrant leg ulcers of various causes [1–4]. Currently, different methods are under clinical evaluation, such as the classical Rheinwald and Green method (keratinocyte allografts on a vaseline gauze) [5], the Limat and Hunziker method using outer root sheath cells from unplugged hair [3] or keratinocyte allografts on a dermis equivalent of bovine collagen [6]. In 1996, Prenosil and co-workers at the ETH of Zurich developed an automated bioreactor that allowed for the culture of keratinocyte monolayers on a polytetrafluoroethylene (Teflon) foil [7]. Recently, the method has been modified for secondary culture in serum-free medium (Keratinocyte Serum-Free Medium™, Life Technologies). The primary culture entails trypsinization of the skin sample and culture on a preformed feeder layer of postmitotic 3T3 mouse fibroblasts for one passage. The medium of the primary culture contains 10% fetal calf serum, Dulbecco's modified Eagle's medium, Ham's F12, glutamine, hydrocortisone, insulin, transferrin, tri-iodothyronine, cholera toxin and adenine. The subculture for grafts larger than 75 cm^2 is grown in a bioreactor growth chamber where exchange of the serum-free medium is fully automated and the monitoring of the gas exchange, pH and temperature is guaranteed. The reactor circumvents tedious manual work and makes the production of large surfaces of CEA more economic. Smaller grafts are cultured manually in Petri cell culture dishes. Subconfluent keratinocyte monolayers on Teflon foil are available within 15–21 days after biopsy. Since 1996, we have had the opportunity to treat selected patients with recalcitrant leg ulcers with CEA cultured by this method. In the following we report on a 30-year-old man with severe chronic venous insufficiency due to congenital valvular aplasia. He was successfully treated using Prenosil's CEA method on an out-patient basis.

A 30-year-old male had an 11-year history of bilateral recurrent pretibial leg ulcers. He was an enthusiastic soccer player and skier. Progressive dermatoliposclerosis in the gaiter area developed when he was only 15 years old, especially at the sites that were exposed to repeated contusions when playing football in summer and to frictional trauma caused by the rim of his ski boots in the winter. Currently he presented with a pretibial leg ulcer of his left leg that did not improve under hydrocolloid dressings and class 3 compression stockings (exerting a compression of 36–45 mm Hg in the gaiter area). Routine laboratory and immunoserological tests (rheumatoid factor, antinuclear antibodies, antineutrophil cytoplasmic antibodies, cryoglobulins and an immuno-electrophoresis) were unremarkable. Histology showed non-specific ulceration with granulation tissue, and direct immunofluorescence was negative. Bidirectional continuous-wave Doppler sonography revealed deep-vein insufficiency of both legs. Phlebography (both ascending and descending) showed bilateral valvular aplasia of both the deep and the superficial veins, except for one single valve in the superficial femoral vein on the left side and normal valves in the deep femoral vein on the right side.The veins had smooth walls, a normal diameter and did not reveal any postthrombotic changes, such as intraluminal irregularities or remnants of destroyed deep valves (fig. 1a, b). Based on these findings the diagnosis of primary chronic venous insufficiency due to congenital valvular aplasia was made.

Ten years ago the patient had pinch grafts that failed to take and a conventional split-skin graft as an in-patient procedure that resulted in a complete take. However, the ulcer recurred soon after this procedure and the patient was not motivated to undergo further in-patient treatment, nor did he accept another course of pinch grafts. Therefore, the patient was selected for the application of CEA with keratinocyte monolayers on Teflon foils, according to the method of Prenosil and

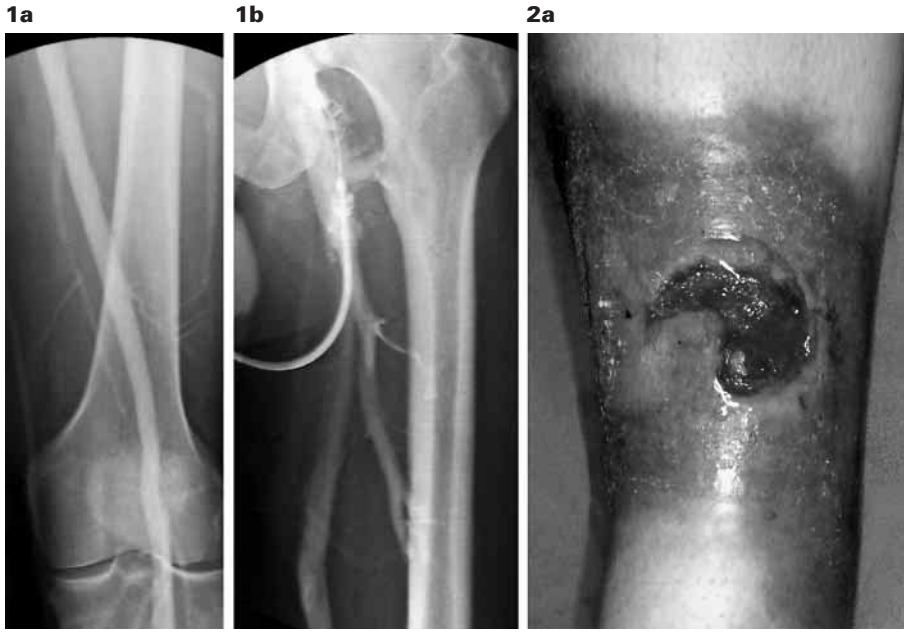
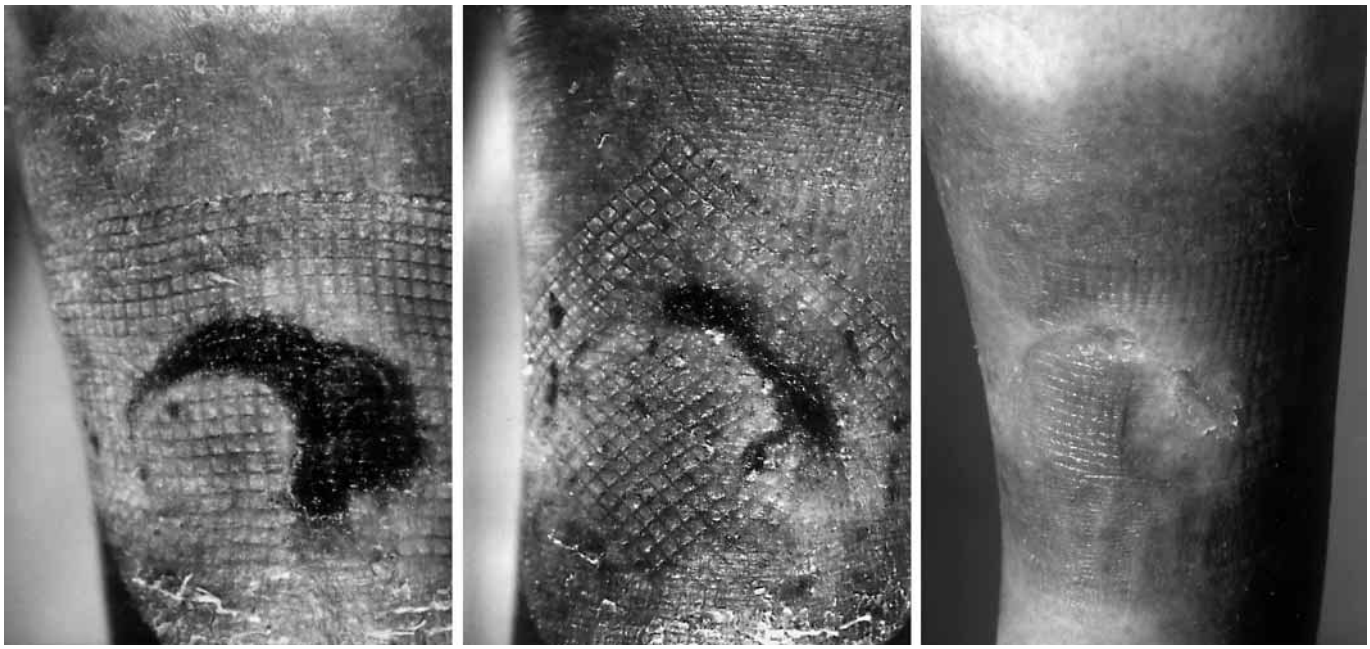


Fig. 1a, b. Ascending and descending venogram of the left thigh area revealing valvular aplasia of both the deep and superficial vein systems.

Fig. 2a–d. Pretibial leg ulcer in congenital valvular aplasia: five sequential CEA transplantations resulted in an 'edge effect' and finally in complete healing (9.5 cm^2 – 4.5 cm^2 – 2.2 cm^2 – healed).



Villeneuve [7]. A split-skin graft of 2 × 3 cm and 0.3 mm thickness was sampled from his right thigh. The donor site healed with virtually no scarring within 3 weeks using a hydro-occlusive dressing. Five consecutive CEA transplantations were required within 3 months of outpatient treatment in order to achieve complete wound healing. Skin sampling from the thigh had to be repeated once. Each transplantation induced epithelization from the wound edge until complete healing was achieved (fig. 2a–d). Under continued compression therapy with grade 3 calf stockings the patient remained without recurrence for 1 year of follow-up.

Congenital valvular aplasia is an uncommon cause of venous leg ulcers in young individuals [8–12]. Valvular aplasia and dysplasia are both currently classified as forms of venous angiodysplasias [13]. Valvular aplasia results in chronic ambulatory venous insufficiency which in turn leads to trophic skin changes with cutaneous microangiopathy and eventually to venous leg ulcers [14]. The diagnosis can be based on venography (absence of vein valves, but no postthrombotic alterations, such as irregularities of the vein walls, incomplete recanalization or intraluminal septae) or on duplex ultrasound (deep venous reflux, smooth vein walls and absence of valves). Compression therapy is still the mainstay in the prevention and the treatment of chronic venous insufficiency due to valvular aplasia, while surgical valve transplantation (e.g. from an arm vein to the popliteal vein) is experimental and usually leads to thrombosis of the transplanted sec-

tion [15, 16]. The atypical location of the leg ulcers in our patient can be attributed to the repeated contusions at the shin during soccer plays and frictional trauma by the rim of ski boots.

Management of leg ulcers must encompass both treatment of the underlying disease and local wound care [17]. CEA does not replace the management of the aetiology of a chronic wound. However, it can induce wound healing in recalcitrant cases where standard therapies are unsuccessful. In our case, compliance with compression therapy (grade 3 calf stockings) was excellent, but nevertheless the wound did not show a tendency to heal. The patient was offered the CEA procedure, because he wanted to avoid a conventional split-skin graft requiring immobilization, as well as pinch grafts that had been applied without any success several years before. CEA did not result in complete take of the grafted cells, but induced epithelization from the wound edge, a phenomenon known as 'edge effect' [1]. We therefore hypothesize that CEA stimulates wound healing rather than being directly integrated into the new epithelium, although these two processes are difficult to be distinguished when autologous keratinocytes are used. In our experience [4], CEA seems to be beneficial independently of the aetiology in the management of recalcitrant wounds with little exudate. As the proliferation capacity of autologous keratinocytes declines with age, younger patients seem to respond better than patients older than 75 years [2]. Automated culturing of epidermal equivalents according to Prenosil and Villeneuve [7] might be especially interesting under economical aspects.

Acknowlegdements

The work was supported by the Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation. We thank Dr. E.P. Scheidegger for proof-reading the manuscript.

References

1 Phillips TJ, Kehinde O, Green H, Gilchrest BA: Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. J Am Acad Dermatol 1989;21:191–198.
2 Harris IR, Bottomley W, Wood EJ, Cunliffe WJ: Use of autografts for the treatment of leg ulcers in elderly patients. Clin Exp Dermatol 1993;18:417–420.
3 Limat A, Mauri D, Hunziker T: Successful treatment of chronic leg ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer root sheath cells. J Invest Dermatol 1996;107:128–135.
4 Hafner J, Kinooka M, Villeneuve PE, Prenosil JE, Senti G, Burg G: Autologous pancellular skin culture (PASC) in the treatment of leg ulcers: Preliminary report (abstract). Dermatology 1997;195:199.
5 Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 1975;6:331–344.
6 Eaglstein WH, Falanga V: Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. Clin Ther 1997;19:894–905.
7 Prenosil JE, Villeneuve P: Automated production of cultured epidermal autografts and pan-cellular skin grafts in a computer-controlled bioreactor. Biotech Bioeng 1998, in press.
8 Lodin A: Congenital absence of valves in the deep veins of the leg, a factor in venous insufficiency. Part I. Acta Derm Venereol (Stockh) 1961;41 (suppl 45):7–65.
9 Lindvall N, Lodin A: Congenital absence of valves in the deep veins of the leg, a factor in venous insufficiency. Part II. Acta Derm Venereol (Stockh) 1961;41(suppl 45):69–91.
10 Bollinger A, Wirth W, Brunner U: Klappenagenesie und -dysplasie der Beinvenen. Schweiz Med Wochenschr 1971;101:1348–1353.
11 Friedman EI, Taylor LM Jr, Porter JM: Congenital venous valvular aplasia of the lower extremities. Surgery 1988;103:24–26.
12 Jian ME: Congenital absence of vein valves of the lower extremities. Chung Hua Wai Ko Tsa Chih 1991;30:358–360, 382–383.
13 Belov S: Classification of congenital vascular defects. Int Angiol 1990;9: 141–146.
14 The Alexander House Group: Consensus paper on venous leg ulcer. J Dermatol Surg Oncol 1992;18:592–602.
15 Karagoz HY, Dogan N, Kocailik A, Sungun M, Duran E: Treatment of congenital venous avalvulosis using a surgically created autogenous vein valve. Cardiovasc Surg 1993;1:131–133.
16 Perrin M, Bayon JM, Castells-Ferrer P, Hiltbrand B: Résultats de la chirurgie restauratrice dans le reflux veineux profond à l'étage sous-inguinal. Phlébologie 1992;45:315–330.
17 Hafner J, Bounameaux H, Burg J, Brunner U: Management of venous leg ulcers.Vasa 1996;25:161–167.

Jürg Hafner, MD
Department of Dermatology, University Hospital of Zurich
CH–8091 Zurich (Switzerland)
Tel. +41 1 255 11 11, Fax +41 1 255 44 03

Dermatology 1999;198:103–105

Unsuccessful Association of Zidovudine and Interferon Alpha for Acute Adult T-Cell Leukemia Lymphoma

H. Dega[a] *O. Chosidow*[a] *F. Charlotte*[b] *C. Francès*[a] *S. Herson*[a] *V. Leblond*[c]

Departments of [a]Internal Medicine, [b]Pathology and [c]Hematology, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Université Paris-6, Paris, France

Key Words

Adult T-cell leukemia lymphoma • Interferon α • Zidovudine

The prognosis of acute adult T-cell leukemia lymphoma (ATL), a malignancy related to human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), is poor with a median survival time of 6 months [1]. Encouraging results have been reported with the combination of interferon alpha (IFN-α) and zidovudine (AZT) [2, 3]. We describe herein the case of an acute ATL treated with this combination in whom the disease rapidly relapsed after 3 months.

A 39-year-old woman from French Guiana was admitted in November 1994 because of vomiting and abdominal pain. She had no fever, and the physical examination was unremarkable. The leukocyte count was $25 \cdot 10^9$/l with 75% leukemic flower cells. The gastric endoscopy showed 7 antral ulcers. Gastric histological examination revealed cytomegalovirus and toxoplasma infections, associated with a T-cell infiltrate. Bone marrow and gastric biopsy specimens showed a lymphomatous infiltrate of medium-size cells. PCR amplification of γ T-cell receptor showed the same monoclonal T-cell population on bone marrow and gastric specimens. The immunophenotype of tumor cells was CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD25+, HLA DR+, CD45Ro+ and CD7–. She was seropositive for HTLV-1. Southern blot showed monoclonal HTLV-1 integration in the tumor cells. The lactate dehydrogenase level (LDH) was 600 IU/l and the serum calcium concentration was normal. The diagnosis of acute ATL was made according to Shimoyama's criteria [4]. The patient received AZT, 1 g per os, and IFN-α, 9 million units subcutaneously per day. Because of neutropenia, the doses of AZT and IFN-α were reduced by half after a week. By week 10, the patient was considered as partial responder (75% remission): the white-cell count had decreased to $1.6 \cdot 10^9$/l with 15% leukemic cells. The calcium level was normal, but LDH had increased to 1,150 IU/l.

Čes.-slov. Derm. 77, 2002, No. 4, p. 168-171

Kultivované epidermální keratinocyty v terapii ulcus cruris Část I.

Slonková V., Navrátilová Z., Semrádová V.

I. dermatovenerologická klinika FN u sv. Anny, Brno,
přednostka prof. MUDr. V. Semrádová, CSc.

Souhrn

Kultivované epidermální keratinocyty v terapii ulcus cruris

Práce shrnuje dosavadní poznatky o terapii chronických ulcerací dolních končetin s použitím kultivovaných keratinocytů. Zaměřuje se hlavně na zhodnocení výhod a srovnání jednotlivých typů kultivovaných keratinocytů - epidermálních autograftů a alograftů. U alograftů podtrhuje rozdíly mezi keratinocyty nativními, kryoprezervovanými a lyofilizovanými.

Klíčová slova: **kultivované epidermální keratinocyty - bércové ulcerace - kryoprezervace - lyofilizace**

Summary

Cultured Epidermal Keratinocytes in the Treatment of Leg Ulcers - Part I

The article presents recent knowledge of use of the cultured epidermal keratinocytes in the therapy of chronic leg ulcers.

The main part of the article compares advantages and disadvantages of particular types of cultured keratinocytes - epidermal autografts and allografts. The difference among native, cryopreserved and lyophilized keratinocytes is emphasized.

Key words: **cultured epidermal keratinocytes - leg ulcers - cryopreservation - lyophilization**

ÚVOD

Chronické ulcerace dolních končetin představují závažný problém jak ve smyslu morbidity, tak i svou ekonomickou náročností pro společnost. Udává se, že ve vyspělých zemích trpí bércovými vředy 0,5-1,5 % populace (36). Terapie zahrnuje jak postupy konzervativní, tak chirurgické, mnohdy i při hospitalizaci pacienta. V konzervativní terapii se kromě klasických postupů stále častěji uplatňují moderní obvazová krytí (hydrokoloidy, hydrogely, polyuretanové fólie aj.), která umožňují hojení rány ve vlhkém prostředí, čímž snižují bolestivost, urychlují granulaci, angiogenezi a epitelizaci. Kožní transplantáty představují další z možností, které výrazněji urychlují hojení bércových vředů. Lze je aplikovat ve formě **autotransplantátů** dermoepidermálních štěpů (podle Reverdine, Tiersche). Možnosti **alotransplantace** (transplantace kůže z člověka na člověka) či **xenotransplantace** (transplantace kůže zvířete na člověka) se ukázaly jako velmi omezené (30). V moderní terapii se v posledních 15 letech začaly používat i tzv. aktivní buněčné kryty - kultivované epidermální keratinocyty v podobě autograftů či alograftů (36).

Historie

Základem metody byla průkopnická práce Rheinwalda a Greena (31). Tito badatelé překonali omezení v proliferaci savčích buněk subkultivací humánních epidermálních keratinocytů v kultuře in vitro, což umožnilo mnohonásobně tyto buňky pomnožit. Metoda byla dále zdokonalena (16) a v roce 1981 v USA byly poprvé použity kultivované autologní keratinocy-

Projekt probíhá s podporou grantu IGA MZ ČR č. 5876-3.

ty u mladého pacienta s těžkými popáleninami, a to s velmi dobrým efektem (24). O dva roky později byly publikovány výsledky prvního použití alograftů kultivovaných epidermálních buněk rovněž u popáleného pacienta (18). Postupně se kultivované epidermální keratinocyty začaly využívat v širokém měřítku zejména v oblasti popáleninové medicíny, kde hrají nezastupitelnou roli u popálenin stupně IIb (10, 14, 35). V terapii chronických bércových vředů byly kultivované epidermální keratinocyty poprvé použity v r. 1986 (17, 20). Metoda našla uplatnění i při terapii kongenitálních névů, tetováží a některých forem epidermolysis bullosa (8, 15, 25).

METODIKA

Způsob kultivace

Kultivované epidermální keratinocyty jsou připravovány v laboratoři ve sterilním prostředí. Malý vzorek kůže získaný biopsií je trypsinizován, takže dojde k separaci epidermis od dermis. Izolované keratinocyty jsou resuspendovány v živném roztoku s růstovými faktory a poté inokulovány na výživnou vrstvu (např. 3T3 myší fibroblasty) (16). Kultivace probíhá v plastikových lahvích v přesně definovaných podmínkách. Již po 24 h vznikají kolonie nových buněk, po 3 dnech dochází ke spojování buněčných kolonií a asi po týdnu se vytváří souvislý „monolayer" epitelových buněk. Primokultura je většinou sériově subkultivována, čímž dojde k mnohonásobnému pomnožení buněk. Další kultivací vzniká „multilayer", v němž už dochází k diferenciaci buněk (1, 5).

V terapii chronických ulcerací lze použít jak autografty, tak alografty, přičemž buňky mohou být nativní, kryoprezervované nebo lyofilizované.

Kultivované epidermální autografty

Zdrojem keratinocytů pro kultivaci je v tomto případě kůže pacienta, jde tedy o autologní keratinocyty. Kultivované epidermální autografty proto představují trvalé kožní kryty. Další **výhoda** spočívá v možnosti krytí velkých ploch štěpy z jedné malé kožní biopsie, s dobrými kosmetickými výsledky. Kryoprezervace buněk umožňuje okamžité použití u téhož pacienta v budoucnu (12).

Použití autologních keratinocytů ale s sebou přináší, zvláště u starších pacientů - kterých je však většina - několik **nevýhod**. Je nutno odebrat biopsii, která bývá bolestivá, autografty jsou k dispozici až za 3-4 týdny (zhruba tuto dobu trvá kultivace) a navíc je známo, že keratinocyty starších lidí mají in vitro menší růstový potenciál (3, 27).

Kultivované epidermální alografty

Zdrojem keratinocytů pro kultivaci je v tomto případě kůže dárce, jde tedy o alogenní keratinocyty. Dárcem může být: 1. pacient podstupující elektivní plasticko-chirurgický výkon (např. operace apostázy, ptózy víček, fimózy aj.), 2. kadaverózní dospělý dárce, 3. kadaverózní fétus. Podmínkou je pečlivý screening - vyloučení dárců s infekčními chorobami, malignitami, negativní sérologické vyšetření přenosných onemocnění (v ČR je povinný screening HIV 1, 2, HBsAg, HCV, RRR a TPHA).

Výhodou alografů je jejich okamžitá dostupnost, neinvazívnost (odpadá nutnost kožní biopsie), promptní úleva od bolesti po jejich aplikaci (26, 27, 36). Podstatný je i fakt, že neonatální keratinocyty mají vysoký růstový potenciál (26, 27). **Nevýhodou** je možnost přenosu infekčních onemocnění.

Mechanismus účinku kultivovaných epidermálních alografů dosud není plně objasněn. Zpočátku se někteří autoři (18, 37) domnívali, že alografty představují trvalé kožní kryty. Vycházeli z toho, že nepřítomnost Langerhansových buněk v alograftech zabezpečuje toleranci štěpu proti HLA. Brzy se však ukázalo, že alografty jsou rychle kolonizovány Langerhansovými buňkami (28) a že dochází k odhojení alografů jak u zvířat (13), tak u lidí (28). Pomocí analýzy DNA bylo prokázáno, že alogenní keratinocyty jsou postupně nahrazovány hostitelskými (vlastními) buňkami (2, 4, 7). Hlavní význam alografů při urychlení hojení spočívá především v tom, že uvolňují řadu cytokinů. Tyto cytokiny stimulují migraci a proliferaci reziduálních hostitelských keratinocytů z okrajů rány a z kožních adnex a rovněž modulují replikaci fibroblastů a syntézu kolagenu (3, 9, 11, 23, 30). Mezi nejdůležitější cytokiny produkované kultivovanými keratinocyty patří EGF (epidermal growth factor), TGF-α,β (transforming growth factor), IL-1 a řada dalších. Vzhledem k tomu, že v současné době není známo složení všech cytokinů ani jejich vzájemný poměr, ani přímá aplikace cytokinů nepřináší výsledky srovnatelné se sekrecí živé dárcovské epidermální buňky (11).

Epitelizace začíná většinou z okrajů rány (tzv. *„edge effect"*), což souvisí s popsaným mechanismem účinku (stimulace migrace hostitelských keratinocytů). Vzácnější tvorba epitelizačních ostrůvků v centru rány bývá připisována migraci hostitelských keratinocytů ze zbytků kožních adnex (3, 9, 19, 21, 22, 29).

Keratinocyty nativní

Nativní keratinocyty jsou získány expanzí keratinocytů v podmínkách in vitro a ihned aplikované v nativním stavu.

Keratinocyty kryoprezervované

Kryoprezervace je proces, při kterém dojde k prosycení buněk kryoprezervačním médiem a následnému zmrazení. Keratinocyty jsou skladovány při teplotě -80 °C až -150 °C. **Výhodou** je, že kryoprezervované štěpy mohou být vytvořeny v laboratoři ve větším množství a uschovány v tkáňové bance, kde jsou kdykoliv připraveny k okamžitému použití. Kryoprezervace výrazně redukuje problémy spojené s dostupností a transportem kultivovaných epidermálních keratinocytů. Dají se transportovat a jejich aplikace je snadná, zcela nezatěžující pro pacienta (9, 34, 36). Přitom

kryoprezervované štěpy v porovnání s nativními štěpy dávají zcela srovnatelné výsledky při terapii bércových ulcerací (9, 36).

Keratinocyty lyofilizované

Lyofilizace je proces, při kterém dojde k zmrazení buněk na teplotu -80 °C a následné sublimaci vody ve vakuu. Sterilita je zajištěna ozářením dávkou 25 kGy. Lyofilizace umožňuje jak skladování, tak i transport kultivovaných keratinocytů při pokojové teplotě, což je nesporně velkou **výhodou** oproti štěpům kryoprezervovaným, které vyžadují skladovací teplotu -80 °C a transport s použitím suchého ledu.

Na rozdíl od kryoprezervovaných štěpů, u kterých zůstává zachována vitalita keratinocytů, dochází u lyofilizace ke vzniku lyzátů keratinocytů, tzn. že buňky ztrácejí svou vitalitu. Lyzáty si však uchovávají podobné složení jako vitální keratinocyty, tj. obsahují stejné cytokiny. Z tohoto důvodu by měly mít lyofilizované keratinocyty velmi podobný efekt jako nativní či kryoprezervované keratinocyty. Použitím lyofilizovaných keratinocytů se dosud zabývalo několik autorů. Jedním z prvních byl Duinslaeger, který prokázal, že lyofilizované lyzáty keratinocytů stimulují hojení ran u popálených pacientů s efektem velmi podobným nativním alograftům keratinocytů (11). Lyofilizované keratinocyty byly s velmi dobrými výsledky použity i při stimulaci epiteliálního hojení u chronické pooperační otorei po tympanoplastice (33).

ZÁVĚR

Kultivované epidermální keratinocyty urychlují hojení ran včetně bércových vředů. Léčebný účinek spočívá především v tom, že uvolňují řadu cytokinů, které stimulují migraci a proliferaci reziduálních hostitelských keratinocytů z okrajů rány a z kožních adnex a rovněž modulují replikaci fibroblastů a syntézu kolagenu.

Nabízí se samozřejmě argument, že lze aplikovat jednotlivé cytokiny syntetické, získané rekombinantní DNA technologií. Tyto syntetické růstové faktory jsou však extrémně finančně nákladné, nejsou všeobecně k dispozici a navíc v současné době není známo přesné složení všech cytokinů, jejich vzájemný poměr ani synergistické či antagonistické interakce mezi jednotlivými cytokiny. Nelze opomenout ani fakt, že některé růstové faktory jsou produkovány ve formě prekurzorů. Vzhledem k tomu, že keratinocyty obsahují cytokiny ve fyziologickém množství, ve vysoce stabilizované formě, mohou být klinicky mnohem účinnější než aplikace jednoho růstového faktoru.

Kultivované epidermální keratinocyty se používají k léčbě dlouhodobých, na terapii rezistentních ulcerací. Nejlepších výsledků bývá dosaženo u ulcerací venózní etiologie. Kultivované epidermální keratinocyty výrazně urychlují hojení bércových vředů, čímž jednoznačně zlepšují kvalitu života pacientů.

LITERATURA

1. **Adler, J., Komárková, J., Brychta, P.:** Transplantation von Keratinocyten und Wundheilung. Wundheilung und Wundauflagen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1996.
2. **Aubock, J., Irschick, E., Romani, A.:** Rejection, after slightly prolonged survival time, of Langerhans cell-free allogeneic cultured epidermis used for wound coverage in humans. Transplantation 45, 1988, s. 730-737.
3. **Beele, H., Naeyaert, J. M., Goeteyn, M., De Mil, M., Kint, A.:** Repeated cultured epidermal allografts in the treatment of chronic leg ulcers of various origin. Dermatologica 183, 1991, s. 31-35.
4. **Brain, A., Purkis, P., Coates, P., Hackett, M., Navsaria, H., Leigh, I. M.:** Survival of cultured allogeneic keratinocytes transplanted to dermal bed assessed with probe specific for Y chromosome. Brit. med. J. 298, 1989, s. 917-919.
5. **Brychta, P., Adler, J., Komárková, J.:** Jedno- a vícevrstevný epitel a způsob jeho přípravy. Patentová PCT přihláška, Ústav průmyslového vlastnictví, 31.5.1994.
6. **Brychta, P., Suchánek, I., Říhová, H., Adler, J., Komárková, J.:** Cultured epidermal allografts for the treatment of deep dermal burns. Acta Chir. Plast. 37, 1995, s. 20-24.
7. **Burt, A. M., Pallett, C. D., Sloane, J. P.:** Survival of cultured allografts in patients with burns assessed with probe specific for chromosome. Brit. med. J. 298, 1989, s. 915-917.
8. **Carter, D. M., Lin, A. N., Varghese, M. C., Caldwell, D., Pratt, L. A., Eisinger, M.:** Treatment of junctional epidermolysis bullosa with epidermal autografts. J. Amer. Acad. Derm. 17, 1987, s. 246-250.
9. **De Luca, M., Albanese, E., Candedda, R., Viacava, A., Faggioni, A., Zambruno, G., Gianetti, A.:** Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogeneic cultured epithelium. Arch. Derm. 128, 1992, s. 633-638.
10. **Donati, L., Magliacani, G., Bormioli, M., Signorini, M., Baruffaldi, P.:** Clinical experience with keratinocyte grafts. Burns 18, 1992, s. 19-26.
11. **Duinslaeger, L., Verbeken, G., Reper, P., Delaey, B., Vanhalle, S., Vanderkelen, A.:** Lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft-covered burn wounds with efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures. Plast. Reconstr. Surg. 98, 1996, s. 10.
12. **Eaglstein, W. H., Falanga, V.:** Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. Clin. Therapeutics 19, 1997, s. 894-905.
13. **Eisenger, M.:** Regeneration of epidermis by cells grown in tissue culture. J. Amer. Acad. Derm. 12, 1985, s. 402-408.
14. **Eldad, A., Burt, A., Clarke, J. A., Gusterson, B.:** Cultured epithelium as a skin substitute. Burns 13, 1987, s. 173-180.
15. **Gallico, G. G., O'Connor, N. E., Compton, C. C., Remensnyder, J. P., Kehinde, O., Green, H.:** Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. Plast. Reconstr. Surg. 84, 1989, s. 1-9.
16. **Green, H., Kehinde, O., Thomas, J.:** Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1979, s. 5665-5668.
17. **Hefton, J. M., Caldwell, D., Biozes, D. G., Balin, A. K., Carter, D. M.:** Grafting of skin ulcers with cultured autologous epidermal cells. J. Amer. Acad. Derm. 14, 1986, s. 399-405.
18. **Hefton, J. M., Madden, M. R., Finkelstein, J. L., Shires, T. G.:** Grafting of burn patients with allografts of cultured epidermal cells. Lancet 2, 1983, s. 428-430.

19. **Leigh, I. M., Purkis, P. E., Navsaria, H. A., Phillips, T. J.:** Treatment of chronic venous leg ulcers with sheets of cultured allogeneic keratinocytes. Brit. J. Derm. 117, 1987, s. 591-597.
20. **Leigh, I. M., Purkis, P. E.:** Culture grafted leg ulcers. Clin. Exp. Derm. 11, 1986, s. 650-652.
21. **Limová, M., Grekin, R. C.:** Synthetic membranes and cultured keratinocyte grafts. J. Amer. Acad. Derm. 23, 1990, s. 713-719.
22. **Marcusson, J. A., Lindgren, C., Berghard, A., Toftgard, R.:** Allogeneic cultured keratinocytes in the treatment of leg ulcers (a pilot study). Acta Derm. Venereol. 72, 1992, s. 61-64.
23. **McKay, I. A., Leigh, I. M.:** Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. Brit. J. Derm. 124, 1991, s. 513-518.
24. **O'Connor, N. E., Mulliken, J. B., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O., Green, H.:** Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. Lancet 1, 1981, s. 75-78.
25. **Phillips, T. J., Gilchrest, B. A.:** Cultured allogeneic keratinocyte grafts in the management of wound healing: prognostic factors. J. Derm. Surg. Oncol. 15, 1989, s. 1169-1176.
26. **Phillips, T. J., Gilchrest, B. A.:** Cultured epidermal grafts in the treatment of leg ulcers. Adv. Derm. 15, 1990, s. 33-50.
27. **Phillips, T. J., Kehinde, O., Green, H., Gilchrest, B. A.:** Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. J. Amer. Acad. Derm. 21, 1989, s. 191-199.
28. **Phillips, T. J., Leigh, I. M., Purkis, P. E.:** Expression of keratin polypeptides and histocompatibility antigens in wounds treated with allografts of cultured keratinocytes. J. Invest. Derm. 87, 1986, s. 101.
29. **Pospíšilová, A.:** Léčba ulcerací dolních končetin kultivovanými epidermálními štěpy. Prakt. Flebol. 1, 1995, s. 8-11.
30. **Resl, V.:** Hojení chronických ran. Praha, Grada Publishing, 1997, s. 155-156, 177-179, 201, 231-238, 326-328.
31. **Rheinwald, J. G., Green, H.:** Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of colonies from single cells. Cell 6, 1975, s. 331-344.
32. **Slonková, V., Kino-oka, M., Mazza, S., Nievergelt, C., Prenosil, J. E., Burg, G., Hafner, J.:** Cultured epithelial autografts for the management of a chronic pretibial leg ulcer due to congenital valvular aplasia. Dermatology 198, 1999, s. 101-103.
33. **Somers, T., Duinslaeger, L., Delaey, B., Verbeken, G., Van Halle, S., Boedts, D., Govaerts, P., Offeciers, E.:** Stimulation of epithelial healing in chronic postoperative otorrhea using lyophilized cultured keratinocyte lysates. Amer. J. Otol. 18, 1997, s. 702-706.
34. **Teepe, R. G., Koebrugge, E. J., Zeeman, R. J., van der Rhee, H. J., Vermeer, B. J.:** The treatment of chronic skin ulcers with cryopreserved cultured allogeneic epidermis. Ned Tijdschr. Geneeskd. 134, 1990, s. 750-754.
35. **Teepe, R. G., Kreis, R. W., Koebrugge, E. J., Kempanaar, J. A., Vloemans, A. F. et al.:** The use of cultured autologous epidermis in the treatment of extensive burn wounds. J. Trauma 30, 1990, s. 269-275.
36. **Teepe, R. G. C., Koebrugge, E. J., Ponec, M., Vermeer, B. J.:** Fresh versus cryopreserved cultured allografts for the treatment of chronic skin ulcers. Brit. J. Derm. 122, 1990, s. 81-89.
37. **Thivolet, J., Faure, M., Demidem, A.:** Long-term survival and immunological tolerance of human epidermal allografts produced in culture. Transplantation 4, 1986, s. 274-280.

Došlo do redakce: 4. 12. 2001

MUDr. Veronika Slonková
I. dermatovenerologická klinika FN
u sv. Anny v Brně
Pekařská 53
656 91 Brno

FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

Heinz Lüllmann, Klaus Mohr, Martin Wehling

„Farmakologie a toxikologie" je kniha mezi učebnicemi farmakologie zcela ojedinělá. Shrnuje dlouholeté zkušenosti farmakologa prof. H. Lüllmanna, vedoucího autora, který od r. 1964 vydal již 14 vydání farmakologické učebnice; některá z nich byla přeložena do dalších jazyků.Kniha má mimořádně bohatou a názornou barevnou dokumentaci, obrazovou i tabelární. Toto čtrnácté, kompletně nově přepracované vydání vzešlo ze spolupráce s farmakologem prof. K. Mohrem za spoluúčasti internisty a klinického farmakologa prof. M. Wehlinga. Tak vzniklo dílo velmi výrazně nové svým pojetím a charakterizované zřetelným zaměřením. Kniha názorným, srozumitelným a velmi čtivým způsobem přihlíží i k těm nejnovějším látkám a trendům, které se zcela recentně ve farmakoterapii objevily. Zabývá se i hledisky hospodárnosti preskripce a poukazuje na běžně dostupné možnosti, jak dosáhnout požadovaného terapeutického efektu co nejhospodárnějším výběrem přípravků. Neobvykle širokým přístupem k problematice, mimořádnou názorností, vysokou kritičností a v neposlední řádě charakterem kontaktu se čtenářem vznikl text, který se velmi výrazně liší ode všeho, co jsme zvyklí jako „učebnici" farmakologie číst: nutí k samostatnému přemýšlení a velmi zřetelně naznačuje, o čem všem dalším ještě musí předepisující lékař při výběru vhodné farmakoterapie uvažovat.

Vydala Grada Publishing. ISBN 80-7169-976-4, R4, pevná vazba, 696 stran, cena 2450.- Kč.

Objednávku můžete zaslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 02/242 66 226, e-mail: nts@iol.cz

Čes.-slov. Derm. 77, 2002, No. 6, p. 239-244

Kultivované epidermální keratinocyty v terapii ulcus cruris

Část II. Srovnání účinnosti kryoprezervovaných a lyofilizovaných alograftů

Slonková V.[1], Navrátilová Z.[1], Semrádová V.[1], Adler J.[2]

[1]I. dermatovenerologická klinika LF MU a FN u sv. Anny v Brně
přednostka prof. MUDr. V. Semrádová, CSc.
[2]Tkáňová banka, FN Brno, Jihlavská 20
přednosta doc. MUDr. J. Adler, CSc.

Souhrn

Kultivované epidermální keratinocyty v terapii ulcus cruris
Část II. Srovnání účinnosti kryoprezervovaných a lyofilizovaných alograftů

Východisko: V moderní terapii chronických ulcerací dolních končetin se poslední dobou začaly uplatňovat i kultivované epidermální keratinocyty v podobě autograftů či alograftů. Použití kryoprezervovaných alograftů v léčbě tohoto onemocnění sice hodnotí řada studií, v České republice však nejsou v současné době žádné klinické zkušenosti s použitím lyofilizovaných keratinocytů v terapii ulcus cruris venosum.

Cíl: Cílem projektu je srovnat účinnost kryoprezervovaných a lyofilizovaných kultivovaných epidermálních alograftů (KEA) v léčbě ulcus cruris venosum.

Materiál a metodika: U 20 pacientů s ulcus cruris venosum byly aplikovány na spodinu vředu kultivované epidermální alografty (u 10 pacientů kryoprezervované - skupina I a u 10 lyofilizované - skupina II). Technika aplikace byla standardizována. Srovnávali jsme hojení vředů u obou skupin (rychlost hojení, planimetrické vyhodnocení).

Výsledky: 9 pacientů ze skupiny I a 7 ze skupiny II se kompletně zhojilo do 3 měsíců (80 %). Průměrná doba hojení vředu byla 29,7 dnů (28,3 dne u skupiny I a 31,1 u skupiny II). Průměrná plocha vředů před aplikací byla 10,13 cm^2 (9,93 cm^2 u skupiny I a 10,32 cm^2 u skupiny II). Po 3 měsících byla plocha redukována na 1,67 cm^2 (1,34 cm^2 ve skupině I a 1,99 cm^2 ve skupině II).

Závěr: Účinnost lyofilizovaných KEA v terapii ulcus cruris venosum je zcela srovnatelná s účinností kryoprezervovaných KEA. Lyofilizované alografty jsou proto výhodnější pro použití v praxi, protože se dají transportovat i uchovávat při pokojové teplotě, čímž jsou okamžitě k dispozici a značně se sníží finanční náklady.

Klíčová slova: kultivované epidermální alografty - bércové ulcerace - kryoprezervace - lyofilizace - keratinocyty

Summary

Cultured Epidermal Keratinocytes in the Treatment of Leg Ulcers. Part II. Comparison of the Effect of Cryopreserved and Lyophilized Allografts

Background: Application of cultured epidermal keratinocytes (in the form of autografts or allografts) took place in the modern therapy of chronic wounds. The use of cryopreserved allografts in the therapy of leg ulcers is evaluated in some studies. But there are no clinical experiences with the use of lyophilized allografts in this indication in our country yet.

Objectives: The aim of the project is to compare the cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of venous leg ulcers.

Material and methods: 20 patients with venous leg ulcer were treated by cultured epidermal allografts (10 cryopreserved - group I and 10 lyophilized - group II). The technique of application was standardized. We compared the tendency to healing in both groups (healing rate, planimetric evaluation).

Projekt probíhá za podpory grantu IGA MZ ČR č. 5876-3

Results: 9 patients in group I and 7 in group II were healed complety in 3 months (80 %). The medium healing time was 29.7 days (28.3 in group I and 31.1 in group II). The average area of ulcers was 10.13 cm^2 before application (9.93 cm^2 in group I and 10.32 cm^2 in group II). After three months the average area was 1.67 cm^2 (1.34 cm^2 in group I and 1.99 cm^2 in group II).

Conclusions: The therapeutic effect of lyophilized cultured epidermal allografts could be compared with therapeutic effect of cryopreserved ones. These results prefer application of lyophilized keratinocytes, because they could be stored and transported at room temperature and the cost of the therapy is lower.

Key words: cultured epidermal allografts - leg ulcers - cryopreservation - lyophilization - keratinocytes

ÚVOD

V posledních 15 letech se rozšířily možnosti terapie chronických venózních ulcerací kromě jiného i o použití biologických krytí v podobě kultivovaných epidermálních keratinocytů ve formě autograftů či alograftů.

Použití kryoprezervovaných alograftů v léčbě bércových vředů sice hodnotí řada studií, v České republice však nejsou v současné době žádné klinické zkušenosti s použitím lyofilizovaných keratinocytů v terapii ulcus cruris (a podle dostupných informací dosud nebyla publikována ani v zahraničí studie zabývající se touto problematikou). Předkládáme proto první výsledky studie srovnávající účinnost kryoprezervovaných a lyofilizovaných kultivovaných epidermálních alograftů v terapii ulcus cruris venosum.

MATERIÁL A METODIKA

Charakteristika souboru

Na I. DVK FN u sv. Anny v Brně byly KEA aplikovány od září 2000 do dubna 2001 celkem u 20 pacientů s chronickými venózními ulceracemi dolních končetin, trvajícími déle než 3 měsíce a nehojícími se po zavedené důsledné kompresivní terapii. Prvních 10 pacientů bylo léčeno kryoprezervovanými alografty (skupina I) a druhých 10 pacientů lyofilizovanými alografty (skupina II). Oba typy alograftů byly vykultivovány ve Tkáňové bance FN Brno. Z 20 pacientů bylo 8 mužů (40 %) a 12 žen (60 %). Průměrný věk pacientů v souboru byl 59,4 let, z toho u mužů 55,3 roku a u žen 63,6 roku, v rozpětí 43-80 let. Rozdělení souboru podle pohlaví a věku uvádí tab. 1. Z tabulky je patrné, že obě skupiny pacientů jsou srovnatelné.

Indikace k aplikaci alograftů byly vředy žilní nebo vředy smíšené s převahou žilní složky. U 16 pacientů šlo o vředy venózní, pouze u 4 pacientů o vředy smíšené s podílem složky arteriální, diabetu či polyneuropatie (tab. 2).

Srovnatelnost obou skupin pacientů dokladují i vybraná anamnestická data (tab. 3). Pozitivní flebologickou rodinnou anamnézu mělo celkem 75 % pacientů, povrchovou flebitidu 50 % pacientů, flebotrombózu dolních končetin 65 % pacientů.

Průměrná doba trvání ulcerací byla 24,5 měsíců, přičemž u skupiny I to bylo 23,9 měsíce s časovým rozpětím 3-96 měsíců a u skupiny II to bylo 25,0 měsíců s časovým rozpětím 5-111 měsíců (tab. 4).

Tab. 1. Rozdělení souboru podle pohlaví a věku

Druh KEA	Počet pacientů			∅ věk		
	muži	ženy	celkem	muži	ženy	celkem
Kryoprezervované	5	5	10	53,8	63,2	58,5
Lyofilizované	3	7	10	56,7	64,0	60,4
Celkem	8	12	20	55,3	63,6	59,4

KEA = kultivované epidermální alografty

Tab. 2. Charakteristika souboru podle etiologie ulcerace

Druh KEA	Venózní	Smíšené		
		+ arteriální	+ diabetické	+ polyneuropatie
Kryoprezervované	9	0	0	1
Lyofilizované	7	1	2	0
Celkem	16	1	2	1

Tab. 3. Vybraná anamnestická data

Anamnestické údaje	Druh KEA		
	kryoprezervované	lyofilizované	celkem
Varixy v rodině	7 (70 %)	8 (80 %)	15 (75 %)
Flebitida	5 (50 %)	5 (50 %)	10 (50 %)
Flebotrombóza	7 (70 %)	6 (60 %)	13 (65 %)

Tab. 4. Délka trvání ulcerace (anamnesticky)

Druh KEA	Doba trvání vředu (měsíce)	∅ doba trvání vředu (měsíce)
Kryoprezervované	3-96	23,9
Lyofilizované	5-111	25,0
Celkem	3-111	24,5

Tab. 5. Výsledky hojení ulcerací

Druh KEA	Zhojeno do 3 měsíců		Nezhojeno do 3 měsíců		Relaps během 3 měsíců		Zhojeno po 3 měsících	
	a	%	a	%	a	%	a	%
Kryoprezervované	9	90	1	10	2	22	7	70
Lyofilizované	7	70	3	30	1	14	6	60
Celkem	16	80	4	20	3	18	13	65

Vyšetření pacientů

Všichni pacienti byli komplexně vyšetřeni anamnesticky, klinicky, dopplerovskou ultrasonografií včetně stanovení indexu tlaku kotník/paže a digitální fotopletyzmografií. Bylo provedeno základní biochemické vyšetření včetně glykovaného hemoglobinu (glyk. Hb) u diabetiků a bakteriologické vyšetření ze spodiny ulcerace. Na základě vyšetření byl stanoven charakter ulcerace. Vylučovací kritéria byla následující:

1. čistě arteriální ulcerace;
2. ulcerace menší než 2 cm^2 či trvající méně než 3 měsíce;
3. špatně kompenzovaný diabetes mellitus (glyk. Hb více než 8,5);
4. výrazná anémie (hemoglobin méně než 100 g/l);
5. dekompenzovaná srdeční insuficience;
6. výrazná hypoproteinémie (albumin méně než 35 g/l);
7. kotníkový index méně než 0,8;
8. maligní tumor s generalizací;
9. celková imunosupresivní terapie.

Pacienti splňující kritéria byli na základě informovaného souhlasu do této studie zařazeni.

Standardizace léčebného postupu

Před aplikací KEA byla u všech pacientů řádně vyčištěna spodina ulcerace.

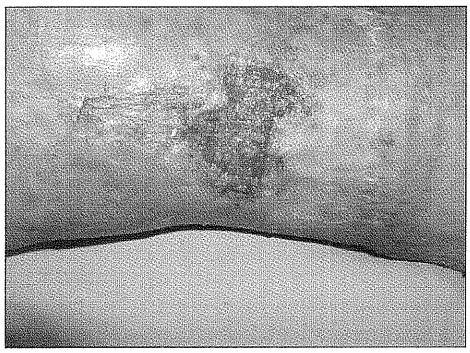
K tomu účelu jsme používali algináty, obvazy s aktivním uhlím a stříbrem, hydrogely, hydrokoloidy, ojediněle i enzymatické preparáty. Těsně před aplikací alograftů byla ulcerace obkladována fyziologickým roztokem po dobu 2-3 dnů. V případě vykultivovaného patogenního agens byla pacientovi podávána celkově antibiotika podle citlivosti. V den aplikace alograftů byla zdokumentována velikost ulcerace (fotodokumentace, nákres na fólii). Poté byly za sterilních podmínek přiloženy KEA na nosiči. Ty byly kryty silikonovou neadherentní mřížkou, vrstvou gázy, fixovány hydrofilním obinadlem a 2-3 krátkotažnými obinadly. Vzhledem k nutnosti přísného klidu na lůžku po 48 hodin a dodržení standardních podmínek byla aplikace prováděna za krátkodobé hospitalizace.

První převaz následoval po 5 dnech - po obkladu fyziologickým roztokem byl sejmut nosič KEA (mastný tyl) a po fotodokumentaci byla ulcerace ošetřena neadherentním silikonovým krytím či krytím s aktivním uhlím. Následovala opět vrstva gázy, hydrofilní obinadlo a elastická bandáž. Další převazy byly prováděny po 2-3 dnech. Pacienti byli sledováni 3 měsíce od aplikace KEA za průběžné dokumentace velikosti vředu (fotodokumentace, nákres na fólii).

VÝSLEDKY

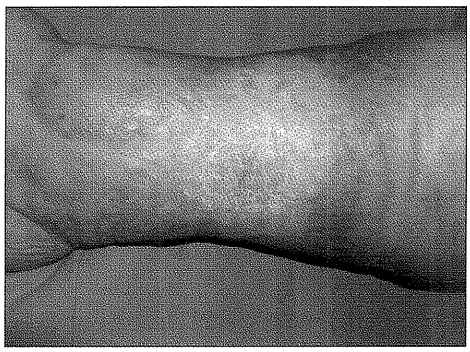
Během 3 měsíců se zhojilo 9 pacientů ze skupiny I (léčené kryoprezervovanými KEA) a 7 pacientů ze skupiny II (léčené lyofilizovanými KEA), tzn. celkem 16 pacientů (80 %). Nezhojeni zůstali 4 pacienti - 1 pacient ze skupiny I a 3 pacienti ze skupiny II. Šlo o pacienty s rozsáhlými dlouhotrvajícími vředy a s řadou přidružených chorob. I u nich jsme však pozoro-

Obr. 1. 70letá žena, 8 let trvající ulcus cruris venosum, před aplikací kryoprezervovaných KEA.



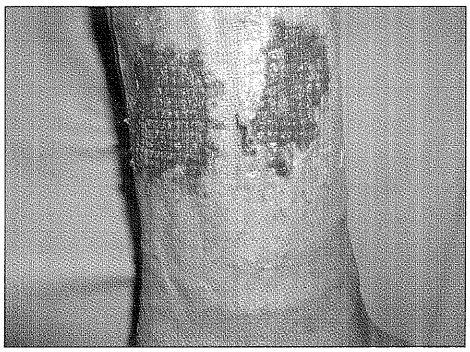
Obr. 2. Táž pacientka 5. den po aplikaci, stav po sejmutí nosiče KEA.

Obr. 3. Táž pacientka 28. den po aplikaci, epitelizace z okrajů.



Obr. 4. Táž pacientka 2 měsíce po aplikaci, vřed zhojen.

Obr. 5. 80letá žena, 2 roky trvající ulcera cruris venosa, před aplikací lyofilizovaných KEA.



Obr. 6. Táž pacientka 5. den po aplikaci, stav po sejmutí nosiče KEA.

Obr. 7. Táž pacientka 28. den po aplikaci, edge-effect (epitelizace u okrajů).

Obr. 8. Táž pacientka 2 měsíce po aplikaci, vřed zhojen.

Tab. 6. Rychlost hojení ulcerací

Druh KEA	Doba nutná ke zhojení (dny)	∅ doba nutná ke zhojení (dny)
Kryoprezervované	12-84	28,3
Lyofilizované	10-84	31,1
Celkem	10-84	29,7

Tab. 7. Planimetrické zhodnocení ulcerací v průběhu terapie

Druh KEA	Velikost ulcerace (cm^2)			
	před aplikací KEA	po aplikaci KEA		
		T_7	T_{28}	T_{90}
Kryoprezervované	9,93	2,98	1,43	1,34
Lyofilizované	10,32	5,86	1,76	1,99
Celkem	10,13	4,42	1,60	1,67

Vysvětlivky: T = počet dnů od aplikace

vali zmenšení plochy vředů, výraznou stimulaci granulace a úlevu od bolesti. Z 16 zhojených pacientů došlo během námi sledované doby 3 měsíců u 3 z nich k relapsu (u 2 pacientů ze skupiny I a 1 pacienta ze skupiny II), což ovšem nepovažujeme za selhání terapie KEA. Důvodem relapsu byla ve všech případech špatná kompresivní terapie nebo obezita a výrazná statická zátěž vedoucí k selhání žilního návratu.

Po 3 měsících tedy zůstalo zhojeno celkem 13 pacientů (65 %) - 7 pacientů z I. skupiny a 6 pacientů ze II. skupiny (obr. 1-8). Výsledky hojení ulcerací znázorňuje tab. 5.

Doba nutná ke zhojení vředu byla průměrně 29,7 dnů. Během této doby se zhojilo 8 pacientů léčených kryoprezervovanými KEA (z celkového počtu 9 zhojených) a 5 pacientů léčených lyofilizovanými KEA (z celkového počtu 7 zhojených). Průměrná doba nutná ke zhojení vředu byla u skupiny I 28,3 dne s časovým rozpětím 12-84 dnů a u skupiny II byla 31,1 dne s časovým rozpětím 10-84 dnů. Rychlost hojení ulcerací uvádí tab. 6.

Průměrná plocha vředů před aplikací alograftů byla 10,13 cm^2 (9,93 cm^2 u skupiny I a 10,32 cm^2 u skupiny II). Velikost vředů byla dále planimetricky hodnocena 7., 28. a 90. den od aplikace KEA. Výrazné zmenšení plochy vředů je patrné zejména během prvního týdne od aplikace alograftů - 7. den byla průměrná plocha vředů 4,42 cm^2 (2,98 cm^2 u skupiny I a 5,86 cm^2 u skupiny II), po 3 měsících (tj. 90. den) byla průměrná plocha vředů 1,67 cm^2 (1,34 cm^2 u skupiny I a 1,99 cm^2 u skupiny II). Planimetrické zhodnocení vředu v průběhu terapie zachycuje tab. 7.

DISKUSE

Cílem naší práce bylo porovnat účinnost kryoprezervovaných a lyofilizovaných KEA v léčbě chronických venózních ulcerací dolních končetin. Z dosavadních výsledků studie vyplývá, že lyofilizované kultivované epidermální alografty mají efekt zcela srovnatelný s kryoprezervovanými alografty. Lyofilizované KEA se tak stávají mnohem výhodnější pro použití v běžné praxi, protože se dají jak transportovat, tak i uchovávat při pokojové teplotě. Jsou tak kdykoliv připraveny k použití a výrazně se sníží finanční náklady. Je jisté, že zatím jde o předběžné výsledky malého souboru (lze je chápat jako pilotní studii), studie počítá s aplikací KEA u celkem 50 pacientů.

Co se týče aplikace kryoprezervovaných alograftů, jsou výsledky hojení vředů u pacientů v našem souboru zcela srovnatelné se zahraničními studiemi zabývajícími se touto problematikou. Teepe et al. (14) udává ve své studii průměrnou dobu hojení 26 dnů u venózních ulcerací léčených kryoprezervovanými alografty a 83 % kompletně zhojených vředů (i jiné etiologie než čistě venózních) během 12 týdnů. De Luca et al. (2) udává průměrnou dobu hojení venózních ulcerací 5,7 týdne (při opakovaných aplikacích kryoprezervovaných alograftů) a 66,6 % ulcerací kompletně zhojených během 12 týdnů (v souboru jsou i pacienti s jinými ulceracemi než venózními).

Z tabulky 7 zachycující planimetrické zhodnocení vředu v průběhu terapie vyplývá i velký efekt léčby během prvního týdne od aplikace KEA, kdy došlo k výraznému zmenšení plochy vředů. Toto rychlé hojení lze nesporně přičíst působení kultivovaných epidermálních keratinocytů, neboť za standardních podmínek zajištěných hospitalizací byl proveden jen jeden převaz (5. den), takže ostatní zevní terapie nehrála velkou roli. Rovněž některé studie popisují nejdramatičtější zmenšení plochy vředu během prvního týdne, což souvisí s uvolněním řady cytokinů (9). Rychlá epitelizace většinou začínala z okrajů ulcerace (popisovaný „edge effect"), u několika pacientů, kteří měli rozsáhlejší ulcerace, došlo i k tvorbě epitelizačních ostrůvků v centru ulcerací zřejmě migrací hostitelských keratinocytů ze zbytků kožních adnex (1-5, 7, 10, 11, 14).

V následujících týdnech již bylo hojení ulcerací jistě ovlivněno řadou dalších faktorů týkajících se jednak samotného pacienta (věk, statická zátěž, přidružená onemocnění), jednak ostatní zevní terapií a především, vzhledem k etiologii venózních ulcerací, správnou aplikací kompresivní terapie. Je nutné si uvědomit, že léčba KEA je pouze jedním ze způsobů zevní terapie a proto správné nošení komprese je nejdůležitějším faktorem v další péči o bércové vředy žilní etiologie (14). V dalším vývoji je proto třeba uvažovat o opakované aplikaci alograftů s časovým odstupem 1-2 týdnů, tak jak je popisovaná v některých studiích (1, 2, 6, 7, 14). Problémem je zde ovšem otázka ekonomická.

Vyhodnocení ekonomické náročnosti bude další částí studie, tj. srovnání finančních nákladů nutných ke zhojení vředu při klasickém způsobu terapie a při terapii alografty. Léčba KEA je sice drahá (cena obou typů alograftů je 4200,- Kč za 20 cm^2), ale porovnáme-li dobrý efekt léčby, rychlost hojení, počet zhojených pacientů a výrazné zlepšení jejich kvality života na straně jedné a náklady na materiál, ošetření atd. u dlouhodobě nezhojených vředů při klasickém způsobu terapie na straně druhé, potom se léčba alografty již tak finančně náročná nejeví. Je ovšem nutné zdůraznit, že aplikaci KEA lze doporučit až u dlouhotrvajících vředů, rezistentních na jinou obvyklou terapii, ne jako metodu první volby. Nejlepších výsledků bývá dosaženo u ulcerací venózní etiologie, kdežto ulcerace smíšené, arteriální, diabetické či revmatoidní se hojí pomaleji (1, 2, 7, 14).

Všichni pacienti shodně udávali okamžitou úlevu od bolesti po aplikaci jak kryoprezervovaných, tak lyofilizovaných KEA. Tím došlo k výraznému zlepšení jejich kvality života ještě před zhojením ulcerací. Úleva od bolesti je popisována ve všech studiích zabývajících se problematikou aplikace kultivovaných epidermálních keratinocytů a je zdůrazňována jako jedna z velkých předností této metody (1, 9, 10).

ZÁVĚR

Z výsledků této pilotní studie vyplývá, že lyofilizované kultivované epidermální alografty mají efekt zcela srovnatelný s kryoprezervovanými. Lyofilizované KEA se tak stávají mnohem výhodnější pro použití v běžné praxi, protože se dají jak transportovat, tak i uchovávat při pokojové teplotě. Jsou tak kdykoliv připraveny k použití a výrazně se sníží finanční náklady. Léčbu lze doporučit u dlouhotrvajících, na ostatní terapii rezistentních vředů. Vzhledem k etiologii venózních ulcerací je v další péči o pacienta nejdůležitější správná aplikace kompresivní terapie, neboť léčba kultivovanými alografty je pouze jedním, byť vysoce účinným a moderním, způsobem zevní terapie. Důležitý je i fakt, že po aplikaci KEA dochází k okamžité úlevě od bolesti a tím ke zlepšení kvality života pacienta ještě před zhojením ulcerace.

Poděkování

Děkujeme prim. MUDr. J. Strejčkovi, CSc. za pomoc s planimetrickým zhodnocením plochy vředů.

LITERATURA

1. **Beele, H., Naeyaert, J. M., Goeteyn, M., De Mil, M., Kint, A.:** Repeated cultured epidermal allografts in the treatment of chronic leg ulcers of various origin. Dermatologica 183, 1991, s. 31-35.
2. **De Luca, M., Albanese, E., Cancedda, R., Viacava, A., Faggioni, A., Zambruno, G., Gianetti, A.:** Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogeneic cultured epithelium. Arch. Derm. 128, 1992, s. 633-638.
3. **Duinslaeger, L., Verbeken, G., Reper, P., Delaey, B., Vanhalle, S., Vanderkelen, A.:** Lyophilized keratinocyte cell lysate contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft - covered burn wounds with efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures. Plast. Reconstr. Surg. 98, 1996, s. 110.
4. **Leigh, I. M., Purkis, P. E., Navsaria, H. A., Phillips, T. J.:** Treatment of chronic venous leg ulcers with sheets of cultured allogeneic keratinocytes. Brit. J. Derm. 117, 1987, s. 591-597.
5. **Límová, M., Grekin, R. C.:** Synthetic membranes and cultured keratinocyte grafts. J. Amer. Acad. Derm. 23, 1990, s. 713-719.
6. **Lindgren, C., Marcusson, J. A., Toftgard, R.:** Treatment of venous leg ulcers with cryopreserved cultured allogeneic keratinocytes: a prospective open controlled study. Brit. J. Derm. 139, 1998, s. 271-275.
7. **Marcusson, J. A., Lindgren, C., Barghard, A., Toftgard, R.:** Allogenic cultured keratinocytes in the treatment of leg ulcers (a pilot study). Acta Derm. Venereol. 72, 1992, s. 61-64.
8. **McKay, I. A., Leigh, I. M.:** Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. Brit. J. Derm. 124, 1991, s. 513-518.
9. **Phillips, T. J., Gilchrest, B. A.:** Cultured epidermal grafts in the treatment of leg ulcers. Adv. Derm. 5, 1990, s. 33-50.
10. **Phillips, T. J., Kehinde, O., Green, H., Gilchrest, B. A.:** Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. J. Amer. Acad. Derm. 21, 1989, s. 191-199.
11. **Pospíšilová, A.:** Léčba ulcerací dolních končetin kultivovanými epidermálními štěpy. Prakt. Flebol. 1, 1995, s. 8-11.
12. **Resl, V.:** Hojení chronických ran. Grada Publishing, Praha, 1997, s. 177-179, 326-328.
13. **Somers, T., Duinslaeter, L., Delaey, B., Verbeken, G., Van Halle, S., Boedts, D., Govaerts, P., Offeciers, E.:** Stimulation of epithelial healing in chronic postoperative otorrhea using lyophilized cultured keratinocyte lysates. Amer. J. Otol. 18, 1997, s. 702-706.
14. **Teepe, R. G. C., Koebrugge, E. J., Ponec, M., Vermeer, B. J.:** Fresh versus cryopreserved cultured allografts for the treatment of chronic skin ulcers. Brit. J. Derm. 122, 1990, s. 81-89.

Došlo do redakce: 4. 12. 2001

MUDr. Veronika Slonková
I. dermatovenerologická klinika
FN u sv. Anny v Brně
Pekařská 53
656 91 Brno

Successful treatment of chronic venous leg ulcers with lyophilized cultured epidermal allografts

V. Slonková, Z. Navrátilová, V. Semrádová and J. Adler

SUMMARY

The case of a 67-year-old woman with chronic venous leg ulcers and severe gonarthrosis is described. In spite of intensive therapy, the leg ulcers had persisted for 4 years and made the intended orthopaedic operation of the right knee impossible. The patient was treated with lyophilized cultured epidermal allografts and her leg ulcers healed within 40 days. Lyophilized cultured epidermal allografts represent a modern type of active wound dressing that leads to rapid healing of chronic venous leg ulcers and enables patients to undergo surgical intervention.

KEY WORDS

leg ulcers, cultured epidermal allografts, lyophilization, orthopaedic operation

Introduction

Standard treatments of leg ulcers comprise mechanical and enzymatic debridement, various types of dressing (alginates, hydrocolloids, hydrogels, dressing with active charcoal and silver etc.) and an appropriate compressive therapy.

Cultured epidermal allograft (CEA) is a method of active wound dressing and represents a modern therapy for leg ulcers. The best results are seen in venous leg ulcers while leg ulcers of other origin (ischaemic, diabetic, rheumatoid) heal more slowly (1-4). The CEA were prepared in the Tissue Bank under sterile conditions. Skin biopsies were obtained from patients undergoing plastic surgery. All donors were screened according to EATB general standards for HIV 1 and 2, hepatitis B antigen (HbsAg), hepatitis C virus (HCV) and syphilis. Skin samples were trypsinized which led to separation of keratinocytes. Isolated keratinocytes were resuspended in a culture medium and then inoculated to a 3T3 fibroblast feeder-layer. In the stage of subconfluency, repeated subculturing was made according to a slightly modified version of the Rheinwald-Green procedure.

The treatment can be recommended in the case of long-lasting, non-healing leg ulcers that are resistant to conventional therapy. In our patient, a rapid healing of the leg ulcers was necessary in order to prepare her for an orthopaedic operation.

Case report

A 67-year-old woman was admitted to the phlebology clinic of our department with ulcers on the right leg

which had persisted in spite of intensive therapy for four years. She was hospitalized in the Orthopaedic department where she was treated for gonarthrosis of her right lower limb, and an operation on the right knee (which displayed total endoprosthesis) was planned following the healing of the leg ulcers. The patient had diabetes mellitus that was being treated with oral antidiabetics, a history of hypertension, and had undergone hysterectomy and bilateral adnexectomy with subsequent radiotherapy because of a cancer 6 years previously. In August 2002 she was admitted to our department. At that time there were three ulcerations on the medial aspect of the right shin with a granulating, slightly covered ulcer base that encompassed an area of 22,7 cm^2 (Fig. 1). Phlebologic examination showed chronic venous insufficiency with incipient peripheral diabetic microangiopathy.

The patient was treated with mechanical debridement, nonadherent wound dressings and compression therapy. Systemic treatment included peroral ciprofloxacin (bacterial culture revealed Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa) administered for 10 days, and intravenous pentoxifylline. Lyophilized cultured epidermal allografts were applied on the clean, granulating wound bed under sterile conditions. The allografts were covered with a layer of nonadherent silicone dressing, several layers of dry gauze pads, a gauze bandage and a low-strength elastic bandage. The patient was advised to rest in bed with the limb elevated for 48 hours after grafting. The dressings were first removed after 5 days, and subsequent dressings were changed at 3-day intervals using a nonadherent dressing and low-strength bandages. The initial ulcer size (evaluated by planimetry) was 22,7 cm^2 before grafting (Fig. 1) and had reduced to 16,5 cm^2 on the 7th day (Fig. 2), and to 2,4 cm^2 on the 28th day after grafting (Fig. 3). The patient reported immediate pain relief following the application of CEA. The leg ulcers healed completely within 40 days of grafting (Fig. 4) and the patient was able to undergo the planned orthopaedic operation. To date there has been no recurrence of the leg ulcers. The patient has continued with an appropriate compressive treatment that constitutes the most important part of the conservative therapy of chronic venous insufficiency.

Discussion

Successful treatment of chronic venous leg ulcers with cultured epidermal allografts (CEA) was first reported in 1987 (5). Initially some authors (6, 7) hypothesised that the CEA were not rejected and that the absence of Langerhans´ cells in the allografts promoted a graft tolerance with respect to the major histocompatibility barriers. However it has been found that the allografts are rapidly colonized by Langerhans´ cells (8) and are rejected both in animals (9) and in humans (8). DNA fingerprint analysis has showed that allogeneic keratinocytes are rapidly replaced by the recipient's keratinocytes (10-12) and that the epidermal regeneration is due to the migration and proliferation of the recipient's residual keratinocytes (3). CEA release many cytokines, such as epidermal growth factor (EGF), transforming growth factors (TGF) alpha and beta, platelet-derived growth factor (PDGF), interleukin-1 and further mediators (2, 13, 14). These cytokines stimulate migration and proliferation of the recipient's keratinocytes and modulate fibroblast replication and collagen synthesis (2, 3, 15, 16).

CEA can be used fresh, cryopreserved or lyophilized. Fresh allografts are limited for common use because they must be applied immediately, and in a fresh state. Cryopreservation facilitates the availability and transport of CEA (1). Cryopreserved allografts can be produced on a large scale by the same laboratory and stored at -80 °C in a tissue bank where they remain ready for use at any time (1, 3). Their application is a simple and safe procedure that causes no discomfort to patients (1, 3, 17). Cryopreserved CEA give comparable results to fresh CEA in the healing of chronic leg ulcers (1, 3).

Although cryopreserved allografts are more convenient to use than fresh ones, there are a number of limitations to their common clinical use. They must be transported at the temperature of -80 °C, which is expensive and time-consuming in case of hospitals located at a major distance from the laboratory. Lyophilized CEA solve such problems. They can be stored and transported at room temperature and they are immediately available, and so reduce the cost of treatment considerably in comparison to cryopreserved allografts. During lyophilization, CEA are frozen at temperatures of up to -80 °C and then dried in high vacuum (10^{-5} Pa). This process leads to keratinocyte lysis, which means that the keratinocytes loose their integrity. However keratinocyte lysates contain the same cytokines as native keratinocytes and for this reason the effectiveness of lyophilized CEA is very similar to that of fresh or cryopreserved CEA (18).

There are only a few reports concerning the healing of wounds with lyophilized CEA in medical literature. Duinslaeger et al showed that lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft-covered burn wounds with an efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures (15). Somers et al reported stimulation of epithelial healing in chronic post-operative otorrhea using lyophilized cultured keratinocyte lysates (19). Recently we reported the results of a pilot study which compared cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of leg ulcers (18). This study was performed at our department in the years 2000 – 2002, and included 50 pa-

Figure 1. Leg ulcers before application of cultured epidermal allografts (CEA).

Figure 2. Seven days after application of cultured epidermal allografts (CEA), "edge effect".

tients with chronic leg ulcers of venous origin. The results of our study indicate that lyophilized CEA are comparable to cryopreserved ones in terms of the healing rate, the course of healing, relief from pain, and also in planimetric changes during the healing of venous leg ulcers (18).

In our patient, re-epithelization started at the wound edges, the so-called "edge effect" (Fig. 2), and later on islands of epithelium could be observed in the central part of the ulcer that represented keratinocyte outgrowth from the hair follicles (2-5, 20, 21).

Our patient reported immediate pain relief following the application of CEA in a way that is comparable with other studies dealing with cultured epidermal grafts (2, 13, 14, 22). Pain relief is singled out as a particular advantage of the method because it contributes to the improvement of quality of life even before healing of the leg ulcer.

In our patient, the rapid epithelization of leg ulcers was crucial to allow for the planned orthopaedic surgery. A pronounced improvement of the patient´s mobility led to the enhanced function of the musculo-venous pump which, in its turn, also improved the healing.

Figure 3. 28 days after application of cultured epidermal allografts (CEA).

Figure 4. 40 days after application of cultured epidermal allografts (CEA), healed ulcers.

Conclusion

CEA treatment is relatively expensive but the relative cost-effectiveness depends on other circumstances. The healing time of leg ulcers is significantly reduced with CEA. For this reason the treatment is recommended in cases in which epithelisation has to be accelerated as well as a last resort in non-healing chronic leg ulcers that are resistant to conventional therapy.

Acknowledgements

This work was supported by IGA MZ CR 5876-2.

References

1. Teepe RGC, Koebrugge EJ, Ponec M, Vermeer BJ. Fresh versus cryopreserved cultured allografts for the treatment of chronic skin ulcers. Br J Dermatol 1990; 122: 81-9.

2. Beele H, Naeyaert JM, Goeteyn M, De Mil M, Kint A. Repeated cultured epidermal allografts in the treatment of chronic leg ulcers of various origin. Dermatologica 1991; 183: 31-5.

3. De Luca M, Albanese E, Cancedda R, Viacava A, Faggioni A, Zambruno G, Gianetti A. Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogeneic cultured epithelium. Arch Dermatol 1992; 128: 633-8.

4. Marcusson JA, Lindgren C, Berghard A, Toftgard R. Allogeneic cultured keratinocytes in the treatment of leg ulcers (a pilot study). Acta Derm Venereol 1992; 72: 61-4.

5. Leigh IM, Purkis PE, Navsaria HA, Phillips TJ. Treatment of chronic venous leg ulcers with sheets of cultured allogenic keratinocytes. Br J Dermatol 1987; 117: 591-7.

6. Hefton JM, Madden MR, Finkelstein JL, Shires TG. Grafting of burn patients with allografts of cultured epidermal cells. Lancet 1983; 2: 428-30.

7. Thivolet J, Faure M, Demidem A. Long term survival and immunological tolerance of human epidermal allografts produced in culture. Transplantation 1986; 4: 274-80.

8. Phillips TJ, Leigh IM, Purkis PE. Expression of keratin polypeptides and histocompatibility antigens in wounds treated with allografts of cultured keratinocytes. J Invest Dermatol 1986; 87: 101.

9. Eisenger M. Renegeration of epidermis by cells grown in tissue culture. J Am Acad Dermatol 1985; 12: 402-8.

10. Aubock J, Irschick E, Romani A. Rejection, after slightly prolonged survival time, of Langerhans cell-free allogeneic cultured epidermis used for wound coverage in humans. Transplantation 1988; 45: 730-7.

11. Brain A, Purkis P, Coates P, Hackett M, Navsaria H, Leigh IM. Survival of cultured allogeneic keratinocytes transplanted to dermal bed assessed with probe specific for Y chromosome. Br Med J 1989; 298: 917-9.

12. Burt AM, Pallett CD, Sloane JP. Survival of cultured allografts in patients with burns assessed with probe specific for chromosome. BMJ 1989; 298: 915-17.

13. Phillips TJ, Kehinde O, Green H, Gilchrest BA. Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. J Am Acad Dermatol 1989; 21: 191-9.

14. Phillips TJ, Gilchrest BA. Cultured epidermal grafts in the treatment of leg ulcers. Adv Dermatol 1990; 5: 33-50.

15. Duinslaeger L, Verbeken G, Reper P, Delaey B, Vanhalle S, Vanderkelen A. Lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft - covered burn wounds with efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures. Plast Reconstr Surg 1996; 98: 110.

16. McKay IA, Leigh IM. Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. Br J Dermatol 1991; 124: 513-8.

17. Teepe RG, Koebrugge EJ, Zeeman RJ, van der Rhee HJ, Vermeer BJ. The treatment of chronic skin ulcers with cryo-preserved cultured allogeneic epidermis. Ned Tijdschr Geneeskd 1990; 134: 750-4.

18. Navrátilová Z, Slonková V, Semrádová V, Adler J. Cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of leg ulcers: a pilot study. J Eur Acad Dermatol Venereol 2004; 18: 173-9.

19. Somers T, Duinslaeger L, Delaey B, Verbeken G, Van Halle S, Boedts D, Govaerts P, Offeciers E. Stimulation of epithelial healing in chronic postoperative otorrhea using lyophilized cultured keratinocyte lysates. Am J Otology 1997; 18: 702-6.

20. Adler J, Komárková J, Brychta P. Transplantation von Keratinocyten und Wundheilung. Wundheilung und Wundauflagen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1996.

21. Límová M, Grekin RC. Synthetic membranes and cultured keratinocyte grafts. J Am Acad Dermatol 1990; 23: 713-9.

22. Hunziker T, Limat A. Cultured keratinocyte grafts. Curr Probl Dermatol 1999; 27: 57-64.

AUTHORS' ADDRESSES

Slonková Veronika MD, Department of Dermatovenereology, St. Anna Faculty Hospital, Pekarská 53, Brno, Czech Republic
Navratilová Zuzana MD, same address
Vera Semrádova MD, PhD, Professor and Chairman, corresponding author, same address, E-mail: sekr.dvk@fnusa.cz
Adler Jiri MD, Tissue Bank, Faculty Hospital Brno, Jihlavská 20, Brno, Czech Republic

JEADV (2004) **18**, 173–179

ORIGINAL ARTICLE

Cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of leg ulcers: a pilot study

Z Navrátilová,† V Slonková,† V Semrádová,†* J Adler‡

*†Department of Dermatovenereology, St Anna Faculty Hospital, Pekaøská 53, Brno, Czech Republic, ‡Tissue Bank, Faculty Hospital Brno, Jihlavská 20, Brno, Czech Republic. *Corresponding author, tel. +420 543 182 794; fax +420 543 182 793; E-mail: sekr.dvk@fnusa.cz*

ABSTRACT

Background In the conservative therapy of venous leg ulcers modern types of dressings are used most frequently. In the past 20 years 'active wound dressings' – cultured epidermal keratinocytes as autografts and allografts – were also introduced in the management of leg ulcers.

Methods The aim of our study was to compare the effect of cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of venous leg ulcers. Evaluation of the therapy was documented as photodocumentation, planimetry, healing time and evaluation of pain relief over a 3-month period after application. Fifty patients with venous leg ulcers were selected. Twenty-five patients (group I) were treated with cryopreserved keratinocytes and 25 (group II) with lyophilized keratinocytes.

Results The final evaluation 3 months after the application of allografts showed 84% of healed ulcers in group I and 80% in group II. The number of healed ulcers and the healing rate both showed no statistically significant differences. The size of the ulcer was reduced by half during the first week in both groups. The size differences during the first week are statistically significant in both groups and they are comparable ($P < 0.001$). The intensity of the pain was statistically significantly reduced during the first week after application in both groups ($P < 0.001$).

Conclusions The cryopreserved and lyophilized cultured allografts are comparable in healing rate, course of healing and relief of pain, and also in planimetric changes during the healing of venous leg ulcers. Lyophilized allografts are more convenient for routine use than cryopreserved allografts as they can be stored at room temperature. These results could give rise to the more frequent use of lyophilized allografts in slow-healing venous leg ulcers.

Key words: keratinocytes, cryopreservation, lyophilization, leg ulcers

Received: 19 September 2002, accepted 26 April 2003

Introduction

In industrialized countries, 0.5–1.5% of the population suffer from leg ulcers. Chronic ulcers of the lower limbs represent a major health problem in terms of both morbidity and economic cost for society. The management of chronic leg ulcers involves both conservative and surgical treatment and often requires stay in hospital. In the conservative therapy modern types of dressings are used most frequently. These dressings permit wound healing in a moist setting, leading to reduction in pain and stimulation of granulation, angiogenesis and epithelization of wounds.

In the past 20 years 'active wound dressings' – cultured epidermal keratinocytes as autografts or allografts – were also introduced in the therapy of leg ulcers.[1] The pivotal work of Rheinwald and Green[2] overcame the limitation of propagating mammalian cells by culturing human epidermal cells in serial culture, enabling the culture of these cells in large quantity. The method was later modified[3] and the first successful application of cultured autologous keratinocytes was reported in 1981 in the USA in a young patient with severe burns.[4] In 1983 the results of the first application of cultured epidermal allografts in a burn patient were published.[5] Cultured epidermal allografts were used increasingly in burn medicine, where they play an

© 2004 European Academy of Dermatology and Venereology

important role in burns of IIb degree.[6–8] Cultured epidermal keratinocytes were used in the treatment of chronic leg ulcers for the first time in 1986 as autografts[9,10] and in 1987 as allografts.[11] This method was also used in the treatment of giant congenital nevi, tattoos and some types of epidermolysis bullosa with success.[12–14]

In cultured epidermal autografts, a small biopsy sample of the patient's skin is subjected to trypsin disaggregation to separate the dermis from the epidermis. Isolated keratinocytes are serially subcultured and then expanded by *in vitro* procedures into sheets of epidermis over a period of 2–3 weeks. Lethally irradiated 3T3 cells may be used as a feeder layer.[3,15] The advantages of this method are that it is autologous; it is possible to cover large areas with sheets from one small skin biopsy, resulting in permanent wound coverage with acceptable cosmetic results and allowing cryopreservation of cells for future use.[16] However, the use of autologous keratinocytes causes several difficulties: a biopsy has to be taken (it can be painful), autografts are available with 3–4 weeks delay imposed by the culture procedure, and keratinocytes of older individuals have less growth potential *in vitro*.[17–19]

For these reasons the investigators focused their interest on cultured epidermal allografts. Keratinocytes for culturing are obtained from the donor's skin. The donor can be a patient undergoing an elective plastic surgery intervention (operation for apostasis, phimosis, ptosis of eyelids, etc.), a cadaveric adult or a cadaveric foetus. The basic condition is careful screening and hence the exclusion of donors with infectious diseases and malignancies. Serological tests for transmissible diseases must be negative. The main advantage of cultured allografts is that they offer immediate availability, the technique is noninvasive, obviating a skin biopsy, and produces prompt relief of pain after being applied.[1,18,20,21] In addition, neonatal keratinocytes have large growth potential *in vitro*.[18,20] The disadvantage is a possible transmission of infectious diseases.

The mechanism of action of cultured epidermal allografts is not known exactly. Initially some authors[5,22] claimed that cultured allografts were not rejected and thus served as a permanent skin substitute. The authors postulated that the absence of Langerhans' cells in the allografts promoted graft tolerance across major histocompatibility barriers. However, allografts are rapidly colonized by Langerhans' cells[23] and are rejected both in animals[24] and in humans.[23] DNA fingerprint analysis showed that allogeneic keratinocytes are rapidly replaced by host keratinocytes.[25–27] The importance of allografts for wound healing lies in the fact that they release many cytokines that able to stimulate migration and proliferation of residual recipient keratinocytes from the wound edges and from the epidermal appendages and also to modulate fibroblast replication and collagen synthesis.[17,28–31] The most important cytokines produced by keratinocytes are epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF)-alpha and -beta, platelet-derived growth factor (PDGF), fibronectin, interleukin-1 and others. At present the precise structure of all cytokines and their relationships are not known so that the results of application of cytokines alone are poor compared to application of donor's living keratinocytes.[29]

The epithelization usually begins from the wound edges (the so-called 'edge effect'), which is connected with the described mechanism of action (the stimulation of the recipient keratinocytes' migration). The occasional formation of islands of epithelization inside the wound can probably be attributed to the presence of appendageal remnants.[11,17,28,32–34]

Cultured epidermal keratinocytes can be used fresh, cryopreserved or lyophilized. Fresh keratinocytes are obtained by *in vitro* expansion of keratinocytes and applied immediately in the fresh state. In cryopreservation, cultured keratinocytes are frozen in a medium containing a cryoprotective agent (usually 20% glycerol) up to −80 °C and stored at this temperature. The main advantage of this process is that cryopreserved allografts can be produced on a large scale by the same laboratory and stocked in a skin bank, making them readily available for use. Cryopreservation reduces problems connected with the availability and transport of cultured epidermal keratinocytes. These allografts can be transported readily and their application is a simple procedure involving no discomfort to the patients.[1,28,35] Comparable results have been reported in treating skin ulcers with either fresh or cryopreserved allografts.[1,28] In lyophilization, cultured keratinocytes are frozen up to −80 °C and dried in high vacuum (10^{-5} Pa). Freeze-dried sheets are stored and transported at room temperature. This is a great advantage compared to the storage and transportation of cryopreserved sheets.

Compared to cryopreserved grafts with active keratinocytes, the process of lyophilization leads to keratinocyte lysis, that is cells lose their activity. However, cell lysates contain the same cytokines as active keratinocytes. As mentioned earlier, the mechanism of action of cultured allografts consists of the release of cytokines and the stimulation of resident keratinocytes from the wound edges and epidermal appendages.[17,28–30] Therefore, the effect of lyophilized keratinocytes should be very similar to that of fresh or cryopreserved keratinocytes. Several investigators have studied the application of lyophilized keratinocytes. Duinslaeger *et al.* showed that lyophilized keratinocyte cell lysates stimulated wound healing in burn patients with efficiency very similar to that of fresh allogeneic cultures.[29] Lyophilized keratinocytes have also been used with very good results in the stimulation of epithelial healing in chronic postoperative otorrhoea after tympanoplasty.[36]

Materials and methods

The aim of our study was to compare the effect of cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of venous leg ulcers.

Donor screening

Skin biopsies were obtained from patients undergoing plastic surgery. All donors were screened according to European Association of Tissue Banks (EATB) general standards for tissue banking, including informed consent. The suitability of donors was based on their medical and social history, a physical examination and blood tests. Minimum serological tests include testing for human immunodeficiency virus (HIV) l/2, hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitic C virus (HCV) and syphilis.

Preparation and storage of cultured keratinocytes

Skin samples were harvested under strongly sterile conditions during the plastic surgery operations with subsequent washing out of the disinfection agent/Betadine/and placing the samples in the transport medium.

Processing consisted of: removal of subcutaneous fat; incubation in 0.2% trypsin solution for 12 h at 4 °C; dividing the dermis and the epidermis and separation of keratinocytes mechanically using forceps; centrifugation and resuspension of keratinocytes in culture medium; 3T3 fibroblast feeder-layer preparation; establishing keratinocyte primocultures according to a slightly modified Rheinwald–Green procedure; and controlled rate freezing of keratinocyte suspension and storage at −150 °C.

Preparation of cultured epidermal allograft

The keratinocyte suspension was quarantined for 180 days and then released for the laboratory procedure after retesting of the donor for HIV l/2, HBsAg, HCV and syphilis.

The laboratory procedure consisted of: *in vitro* expansion via coculture of keratinocytes and 3T3 fibroblasts; and the preparation of cultured epidermal grafts.

Storage of cultured epidermal allografts

Cryopreservation consisted of controlled rate freezing of cultured epidermal allografts and storage at −150 °C.

The freeze drying technique is similar to ordinary vacuum distillation except that the material to be dried must be frozen solid before being subjected to a high vacuum. Under these conditions the water content (in the form of an ice matrix) is selectively removed via sublimation, that is ice transforming directly into the vapour phase without going through a liquid phase. The end result of lyophilization is a product that has been preserved with a water content < 5%.

Patients

Fifty patients with chronic venous leg ulcers were selected for treatment at the Department of Dermatovenereology of St Anna's Hospital in Brno. The study was performed from September 2000 to September 2002.

Table 1 The group distribution based on sex and age

	Number of patients			Mean age (years)		
Type of allograft	**Male**	**Female**	**Total**	**Male**	**Female**	**Total**
Cryopreserved	10	15	25	58.3	67.6	63.9
Lyophilized	8	17	25	58.4	64.9	62.8
Total	18	32	50	58.3	66.2	63.3

Table 2 Body mass index (kg/m^2)

Type of allograft	Male	Female	Total
Cryopreserved	29.7	28.7	29.1
Lyophilized	30.1	30.1	30.1
Total	29.9	30.2	30.1

The patients were examined thoroughly: a history, a physical examination, Doppler ultrasonography including ankle index, and routine laboratory tests – blood count, blood sugar, serum total proteins, albumin, bacteriological testing. The type of ulcer was diagnosed according to the examination. Exclusion criteria were: 1) arterial ulcer; 2) the size of the ulcer < 2 cm^2 or the ulcer duration < 3 months; 3) uncompensated diabetes mellitus; 4) pronounced anaemia (haemoglobin < 100 g/L); 5) uncompensated heart insufficiency; 6) pronounced hypoproteinaemia (albumin < 35 g/L); 7) ankle index < 0.8; 8) metastatic malignant tumour; and 9) systemic immunosuppressive therapy.

Informed consent was obtained from all patients.

Patients were randomized into two groups. Twenty-five patients were treated with cryopreserved cultured epidermal keratinocytes (group I) and the other 25 patients with lyophilized cultured epidermal keratinocytes (group II). The study was randomized (the patients were numbered in the order they entered the study).

In group I there were 10 males and 15 females with mean age 63 years, range 36–80 years. In group II there were eight males and 17 females with mean age 62.8 years, range 30–82 years. The distribution of the patients based on sex and age is comparable in both groups (Table 1). The levels of body mass index (BMI) are similar in groups I and II (Table 2).

The mean duration of the ulcers, according to anamnestic data, was 30.7 months (range 3–204 months) in group I and 16.7 months (range 3–111 months) in group II (Table 3).

Patient management and grafting procedure

The ulcers were treated with mechanical and enzymatic debridement and with various types of dressings (alginates, dressings

Table 3 Duration of ulcer (anamnestic data)

Type of allograft	Duration of ulcer (months)	Mean time of ulcer's duration (months)
Cryopreserved	3–204	30.7
Lyophilized	3–111	16.7
Total	3–204	23.7

with active charcoal and silver, hydrocolloids, hydrogels) until a clean wound with a granulating ulcer base was obtained. Immediately before application of keratinocytes the ulcers were treated with wet saline dressings for 1–3 days. In the case of signs of infection, systemic antibiotics were given 1 day before application of allografts. Prior to grafting, the area of the ulcer was traced using transparent foil and then measured using Ulcoplan, a special computer program for planimetry. A photograph of the ulcer was also taken. Then the sheets of keratinocytes (either cryopreserved or lyophilized) were applied on the wound bed with the basal cells down on sterile conditions. The sheets were covered with a layer of nonadherent silicone dressing, several layers of dry gauze pads, a gauze bandage and a low-strength elastic bandage. Patients were advised to rest in bed and elevate the limb for 48 h after grafting. The grafting procedure was carried out in hospitalized patients to provide optimal patient and wound care and to reduce the chance of graft dislodgement.

Evaluation after grafting

Dressings were first removed after 5 days; the wound was soaked in normal saline solution and then the vaseline gauze carrier was removed. The ulcer was photographed and then a nonadherent type of dressing and low-strength bandages were applied to the wound. Subsequent dressings were changed at 3-day intervals using a nonadherent type of dressing and low-strength bandages. Patients were examined weekly and healing was documented as follows: photodocumentation, planimetry, healing time and evaluation of pain relief over the 3-month period after application.

Table 4 Results of healing during 3 months

	Healed		Not healed	
Type of allograft	*n*	%	*n*	%
Cryopreserved	21	84	4	16
Lyophilized	20	80	5	20
Total	41	82	9	18

n, number of ulcers.

Table 5 Healing rate of ulcers

Type of allograft	Time required for healing (days)	Mean time required for healing (days)
Cryopreserved	12–90	32.2
Lyophilized	10–84	26.9
Total	10–90	29.5

Results

The results are summarized in Table 4. Fifty patients were treated with cultured epidermal allografts, either cryopreserved (group I) or lyophilized (group II). By 3 months, complete healing was obtained in 21 patients from group I and in 20 patients from group II, that is a total of 41 patients (82%) healed completely. Only nine (18%) ulcers did not heal completely but there was a reduction in size and significant improvement and prompt pain relief.

The mean healing time was 32.2 days (range 12–90 days) for group I and 26.9 days (range 10–84 days) for group II (Table 5). Both the number of healed ulcers and the healing rate showed no statistically significant differences.

The mean initial ulcer size was 12.41 cm^2 in group I and 9.04 cm^2 in group II before grafting. The size of the ulcers was evaluated on the 7th, 28th and 90th day after grafting by planimetry as described earlier (Table 6). A rapid reduction in ulcer size was seen particularly within the first week after allografting: the mean ulcer area was 6.5 cm^2 for group I and 5.06 cm^2 for

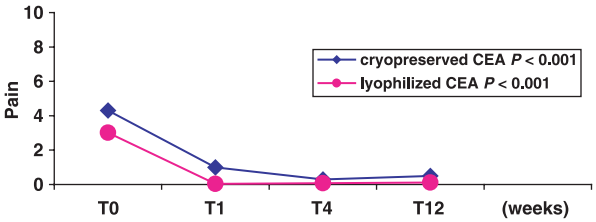
Table 6 Planimetric evaluation of ulcers during the therapy

	Size of ulcer (cm^2)			
		After application of allograft		
Type of allograft	Before application of allograft	T_7	T_{28}	T_{90}
Cryopreserved (*n* = 25)	12.41	6.50	2.04	1.99
Lyophilized (*n* = 25)	9.04	5.06	1.45	1.50
Total	10.73	5.78	1.74	1.74

T, number of days.

fig. 1 Leg ulcers before application of allografts.

Table 7 The course of the pain during the therapy



group II on the 7th day. After a month (28th day), the mean ulcer area was 2.04 cm^2 for group I and 1.45 cm^2 for group II. After 3 months (90th day), the mean ulcer area was 1.99 cm^2 for group I and 1.05 cm^2 for group II. The size differences during the first week were statistically significant in both groups and they are comparable ($P < 0.001$).

Relief of the pain after application of the allografts was another point of interest of our study. The visual analogue scale (10 points) was applied to assess the pain. The intensity of pain was statistically significantly reduced during the first week after application in both groups ($P < 0.001$) (Table 7).

Discussion

The aim of this study was to compare the efficacy of the cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of chronic venous leg ulcers. Our results indicate that lyophilized cultured epidermal allografts are comparable to cryopreserved ones in healing rate, course of healing, relief from pain and also in planimetric changes during the healing of venous leg ulcers. Lyophilized cultured epidermal allografts are more convenient for routine use than cryopreserved allografts because they are more readily available; they can be transported and stored at room temperature and they are ready for use at any time. These factors reduce the costs of the treatment considerably. According to our knowledge, no study on the treatment of leg ulcers with lyophilized keratinocytes has been reported previously although several investigators have studied their application. Duinslaeger *et al.* showed that lyophilized keratinocyte cell lysates stimulated wound healing in burn patients with efficiency very similar to that of fresh allogeneic cultures.[29] Lyophilized keratinocytes were also used with very good results in stimulation of epithelial healing in chronic postoperative otorrhoea after tympanoplasty.[36] There is the possibility of using single synthetic cytokines obtained by recombinant DNA technology. However, these synthetic growth factors are extremely expensive, they are not widely available, and the exact nature of all cytokines and their synergistic or antagonistic interactions are still unknown.[29] Moreover, some of these growth factors are produced as precursor forms. Keratinocyte lysates contain cytokines in physiological amounts, in a highly stabilized form, so they may be much more clinically efficient than the application of a single growth factor.[29,36]

Our results are comparable to the results of other studies on healing of leg ulcers using cryopreserved cultured epidermal allografts. Using these allografts, Teepe *et al.*[1] reported 83% healing of various types of skin ulcers with a mean healing time 26 days in leg ulcers of venous origin. De Luca *et al.*[28] reported 66.6% completely healed leg ulcers of various aetiology during 12 weeks with a mean healing time of 5.7 weeks in venous leg ulcers (the allografts were applied repeatedly).

The size of the ulcer was reduced rapidly within the first week of allografting, as shown in Table 6. This fast healing is undoubtedly due to the effect of the cultured allografts because standard conditions were provided by the hospital stay and the wound was redressed once only (on the fifth day after application of the allograft), hence other local therapy did not play an important role. Leigh *et al.* found that hospitalized patients had much better healing rates than outpatients.[17] The fast healing of ulcers during the first week of allografting is also described in several studies[1,17,18,28] and is connected with mechanism of action of cultured epidermal allografts – their releasing of many cytokines.[20] Some authors have suggested that continued accelerated re-epithelization is unlikely to be the result of soluble factors only, such as growth factors and cytokines, but it probably also depends on the deposition of insoluble products such as extracellular matrix and basement membrane components. In addition, allografts may exert some antimicrobial action, as cultured human keratinocytes have an inhibitory effect against several microorganisms.[37] Healing of the wounds was certainly influenced by many other factors concerning the patient (age, venous stasis, related diseases), other local treatment and, above all, proper compressive therapy, which is the most important part of conservative therapy of venous leg ulcers.[1] Repeated application of allografts would benefit patients as described in other studies,[1,17,28,34,38,39] but costs could be a problem.

Treatment with cultured epidermal allografts is recommended in nonhealing, chronic leg ulcers that are resistant to conventional therapy, but not as the treatment of first choice.

fig. 2 Seven days after application – the 'edge effect'.

fig. 3 Three months after application – healed ulcer.

The best results are seen in venous leg ulcers (figs 1–3) while leg ulcers of other origin (ischaemic, rheumatoid, diabetic) heal more slowly.[1,17,28,34]

The fast epithelization is usually begun from the wound edges (the so-called 'edge effect'), and is connected with the described mechanism of action (the stimulation of the recipient keratinocytes' migration by releasing many cytokines). The occasional formation of islands of epithelization inside the wound was seen in several patients with large ulcers and can probably be attributed to the presence of appendageal remnants.[11,17,28,33,34,40]

All the patients reported prompt pain relief within 24 h of the application of cultured allografts, either cryopreserved or lyophilized. Thus, there was a significant improvement in their quality of life before the leg ulcers healed . Prompt pain relief is described in all studies dealing with the application of cultured epidermal allografts and is pointed out as a great advance of the method.[17,18,20,41] Other wound coverings, such as cadaver skin, meshed split-thickness skin grafts and occlusive dressings, diminish but do not always completely relieve pain.[18]

Conclusion

The results of our study indicate that lyophilized cultured epidermal allografts are comparable to cryopreserved allografts in healing rate, course of healing and relief from the pain, and also in planimetric changes during the healing of venous leg ulcers.

Lyophilized cultured epidermal allografts are more convenient for routine use than cryopreserved ones because they are more readily available; they can be transported and stored at room temperature and they are ready for use at any time. These facts, mentioned above, reduce costs for the treatment considerably. The treatment can be recommended in long-lasting, nonhealing leg ulcers that are resistant to conventional therapy. Certainly, compressive therapy must be applied as the most important part of the conservative treatment of venous leg ulcers. The great advantage of cultured epidermal allografts is also the fact that they produce prompt relief from pain after being applied and thus improve the patients' quality of life.

Acknowledgements

This work was supported by IGA MZ CR 5876-2.

References

1 Teepe RGC, Koebrugge EJ, Ponec M, Vermeer BJ. Fresh versus cryopreserved cultured allografts for the treatment of chronic skin ulcers. *Br J Dermatol* 1990; **122**: 81–89.

2 Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of colonies from single cells. *Cell* 1975; **6**: 331–344.

3 Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 5665–5668.

4 O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S *et al.* Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981; **1**: 75–78.

5 Hefton JM, Madden MR, Finkelstein JL, Shires TG. Grafting of burn patients with allografts of cultured epidermal cells. *Lancet* 1983; **2**: 428–430.

6 Donati L, Magliacani G, Bormioli M *et al.* Clinical experience with keratinocyte grafts. *Burns* 1992; **18S**: 19–26.

7 Brychta P, Suchánek I, Rihová H *et al.* Cultured epidermal allografts for the treatment of deep dermal burns. *Acta Chir Plast* 1995; **37**: 20–24.

8 Teepe RG, Kreis RW, Koebrugge EJ *et al.* The use of cultured autologous epidermis in the treatment of extensive burn wounds. *J Trauma* 1990; **30**: 269–275.

9 Hefton JM, Caldwell D, Biozes DG *et al.* Grafting of skin ulcers with cultured autologous epidermal cells. *J Am Acad Dermatol* 1986; **14**: 399–405.

10 Leigh IM, Purkis PE. Culture grafted leg ulcers. *Clin Exp Dermatol* 1986; **11**: 650–652.
11 Leigh IM, Purkis PE, Navsaria HA, Phillips TJ. Treatment of chronic venous leg ulcers with sheets of cultured allogenic keratinocytes. *Br J Dermatol* 1987; **117**: 591–597.
12 Carter DM, Lin AN, Varghese MC *et al.* Treatment of junctional epidermolysis bullosa with epidermal autografts. *J Am Acad Dermatol* 1987; **17**: 246–250.
13 Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC *et al.* Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. *Plast Reconstr Surg* 1989; **84**: 1–9.
14 Phillips TJ, Gilchrest BA. Cultured allogeneic keratinocyte grafts in the management of wound healing: prognostic factors. *J Dermatol Surg Oncol* 1989; **15**: 1169–1176.
15 Slonková V, Kino-oka M, Mazza S *et al.* Cultured epithelial autografts for the management of a chronic pretibial leg ulcer due to congenital valvular aplasia. *Dermatology* 1999; **198**: 101–103.
16 Eaglstein WH, Falanga V. Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Clin Ther* 1997; **19**: 894–905.
17 Beele H, Naeyaert JM, Goeteyn M *et al.* Repeated cultured epidermal allografts in the treatment of chronic leg ulcers of various origin. *Dermatologica* 1991; **183**: 31–35.
18 Phillips TJ, Kehinde O, Green H, Gilchrest BA. Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. *J Am Acad Dermatol* 1989; **21**: 191–199.
19 Jones JE, Nelson EA. Skin grafting for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; **2**: CD001737.
20 Phillips TJ, Gilchrest BA. Cultured epidermal grafts in the treatment of leg ulcers. *Adv Dermatol* 1990; **5**: 33–50.
21 Terskikh VV, Vasiliev AV. Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. *Int Rev Cytol* 1999; **188**: 41–72.
22 Thivolet J, Faure M, Demidem A. Long term survival and immunological tolerance of human epidermal allografts produced in culture. *Transplantation* 1986; **4**: 274–280.
23 Phillips TJ, Leigh IM, Purkis PE. Expression of keratin polypeptides and histocompatibility antigens in wounds treated with allografts of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1986; **87**: 101.
24 Eisenger M. Regeneration of epidermis by cells grown in tissue culture. *J Am Acad Dermatol* 1985; **12**: 402–408.
25 Aubock J, Irschick E, Romani A. Rejection, after slightly prolonged survival time, of Langerhans cell-free allogeneic cultured epidermis used for wound coverage in humans. *Transplantation* 1988; **45**: 730–737.
26 Brain A, Purkis P, Coates P *et al.* Survival of cultured allogeneic keratinocytes transplanted to dermal bed assessed with probe specific for Y chromosome. *Br Med J* 1989; **298**: 917–919.
27 Burt AM, Pallett CD, Sloane JP. Survival of cultured allografts in patients with burns assessed with probe specific for Y chromosome. *Br Med J* 1989; **298**: 915–917.
28 De Luca M, Albanese E, Cancedda R *et al.* Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogeneic cultured epithelium. *Arch Dermatol* 1992; **128**: 633–638.
29 Duinslaeger L, Verbeken G, Reper P *et al.* Lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft-covered burn wounds with efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures. *Plast Reconstr Surg* 1996; **98**: 110.
30 McKay IA, Leigh IM. Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br J Dermatol* 1991; **124**: 513–518.
31 Resl V. *Hojení chronických ran*. Grada Publishing, 1997; **201**: 177–179, 326–328.
32 Adler J, Komárková J, Brychta P. Transplantation von Keratinocyten und Wundheilung. *Wundheilung und Wundauflagen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1996.
33 Límová M, Grekin RC. Synthetic membranes and cultured keratinocyte grafts. *J Am Acad Dermatol* 1990; **23**: 713–719.
34 Marcusson JA, Lindgren C, Berghard A, Toftgard R. Allogeneic cultured keratinocytes in the treatment of leg ulcers (a pilot study). *Acta Derm Venereol* 1992; **72**: 61–64.
35 Teepe RG, Koebrugge EJ, Zeeman RJ *et al.* The treatment of chronic skin ulcers with cryo-preserved cultured allogeneic epidermis. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1990; **134**: 750–754.
36 Somers T, Duinslaeger L, Delaey B *et al.* Stimulation of epithelial healing in chronic postoperative otorrhea using lyophilized cultured keratinocyte lysates. *Am J Otol* 1997; **18**: 702–706.
37 Bolivar-Flores YJ, Kuri-Harcuch W. Frozen allogeneic human epidermal cultured sheets for the cure of complicated leg ulcers. *Dermatol Surg* 1999; **25**: 610–617.
38 Lindgren C, Marcusson JA, Toftgard R. Treatment of venous leg ulcers with cryopreserved cultured allogeneic keratinocytes: a prospective open controlled study. *Br J Dermatol* 1998; **139**: 271–275.
39 Harvima IT, Virnes S, Kauppinen L *et al.* Cultured allogeneic skin cells are effective in the treatment of chronic diabetic leg and foot ulcers. *Acta Derm Venereol* 1999; **79**: 217–220.
40 Pospíšilová A. Lécba ulcerací dolních koncetin kultivovanými epidermálními štepy. *Prakt Flebol* 1995; **1**: 8–11.
41 Hunziker T, Limat A. Cultured keratinocyte grafts. *Curr Probl Dermatol* 1999; **27**: 57–64.

Čes-slov Derm, 2009, 84, No. 2, p. 92–98

Využití oxidované celulózy v terapii chronických ulcerací cévního původu – výsledky klinické studie

Slonková, V., Vašků, V.

I. dermatovenerologická klinika FN U sv. Anny v Brně a LF MU
přednosta doc. MUDr. Vladimír Vašků, CSc.

Souhrn

Využití oxidované celulózy v terapii chronických ulcerací cévního původu – výsledky klinické studie

Na I. dermatovenerologické klinice FN U sv. Anny v Brně probíhala v letech 2006–2007 klinická studie, jejímž cílem bylo ověření bezpečnosti a účinnosti oxidované celulózy (OC) při terapii chronických bércových ulcerací.

Materiál a metody: **Do studie bylo zařazeno celkem 30 pacientů s chronickými bércovými ulceracemi venózní nebo smíšené etiologie, které trvaly déle než 3 měsíce a nejevily známky hojení při standardní terapii. Polovina pacientů byla léčena hydrogenvápenatou solí OC (skupina 1), druhá polovina pacientů byla léčena čistou OC (skupina 2). Obě skupiny byly statisticky srovnatelné (průměrný věk pacientů, doba trvání ulcerací, plocha ulcerací). OC byla aplikována po dobu 2 měsíců s převazy po 1–3 dnech. Průběh hojení byl hodnocen v týdenních intervalech.**

Výsledky: **Pro hodnocení účinnosti léčby v závislosti na použité formě OC a době léčení byla použita dvoucestná metoda ANOVA. Již po 2 týdnech léčby došlo ke statisticky významnému zmenšení plochy vředů u obou skupin pacientů, přičemž u skupiny 1 byl navíc patrný stálý klesající trend – hodnoty plochy vředů se statisticky signifikantně lišily od počátečního stavu i po 3 týdnech léčby. Podobně došlo po aplikaci obou forem OC i ke statisticky signifikantnímu snížení relativních hodnot bolesti, a to více u skupiny 1, u které se statisticky významně liší bolest jednak již při první kontrole po týdnu léčby, a dále i po 4 týdnech léčby.**

Závěr: **Obě formy oxidované celulózy urychlují hojení chronických bércových ulcerací, jedná se zejména o urychlení granulace a epitelizace. Již po týdnu aplikace dochází rovněž k rychlé úlevě od bolesti, což vede ke zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením bércového vředu. Podle statistického zhodnocení byly zjištěny lepší výsledky u skupiny pacientů léčených hydrogenvápenatou solí oxidované celulózy.**

Klíčová slova: **oxidovaná celulóza – bércové ulcerace – hojení ran – kvalita života**

Summary

Oxidated Cellulose in the Therapy of Chronic Leg Ulcers – Results of Clinical Study

Objective: **Safety and effectivity of oxidated cellulose (OC) in the therapy of chronic leg ulcers were evaluated at the First Department of Dermatovenereology of the St. Anna University Hospital in Brno during years 2006–2007.**

Material and methods: **30 patients with chronic leg ulcers of venous or mixed aetiology lasting for longer than 3 months and without response to standard therapy were involved in the study. Half of patients was treated with the hydrogencalcium salt of oxidized cellulose (group 1), the second half was treated with the pure oxidized cellulose (group 2). Both groups were statistically comparable (mean age, size and duration of ulcers). OC were applied once in 1–3 days for the period of 2 months. Healing was evaluated weekly.**

Results: **Double-way ANOVA method was used to evaluate the length of therapy and the effect of therapy depending on the used OC type. After 2 weeks the statistically significant decrease of ulceration size was observed in both patient groups, while in the group 1 the continuous decrease was seen – the reduction of initial size of ulcerations were statistically significant after 3 weeks as well. Similarly, the statistically significant decrease of relative pain value in both groups was observed mostly in the group 1. In this group the pain was significantly lower after the first and the fourth week of therapy.**

Conclusion: **Both types of OC accelerate chronic leg ulcers healing especially influencing granulation and epithelisation. After 1 week the pain relief is already evident thus improving the quality of life even before wound closure. Statistical evaluation showed better results in patients treated with the hydrogencalcium salt of OC.**

Key words: **oxidized cellulose – leg ulcers – wound healing – quality of life**

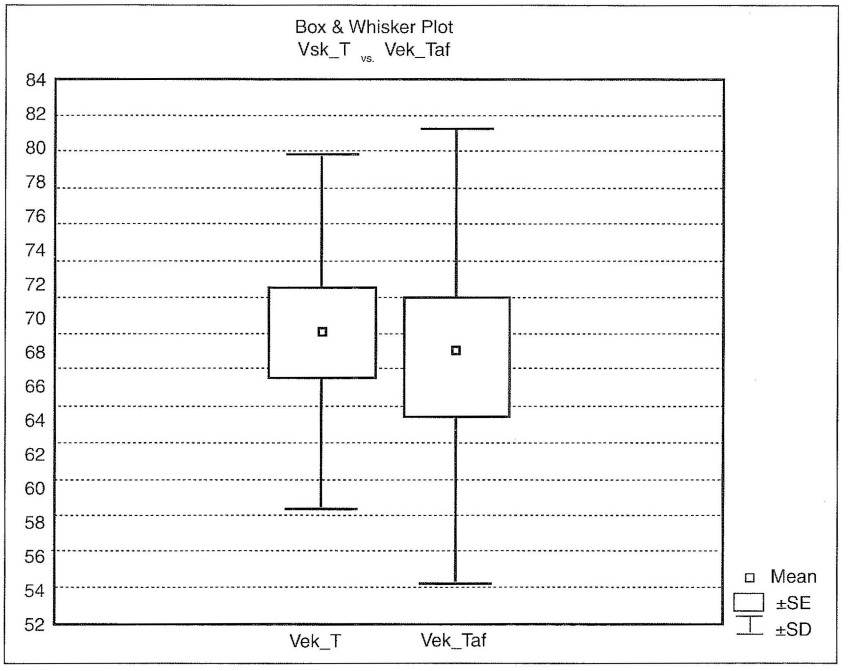
ÚVOD

Bércové ulcerace představují závažný zdravotní problém pro společnost. Udává se, že ve vyspělých zemích je prevalence bércových vředů 0,6–3,6 na 1000 obyvatel (8). Jedná se o chronické onemocnění – 60 % ulcerací trvá déle než 6 měsíců, 33 % se hojí déle než 1 rok (2). Závažný je i fakt, že u 2/3 pacientů dojde nejméně 1krát k recidivě ulcerace (8). Bércové ulcerace výrazně negativně ovlivňují kvalitu života, a to zejména kvůli bolesti, kterou pacienti pociťují. Je proto třeba ověřit všechny léčebné postupy, které mohou přispět k urychlení hojení ulcerací.

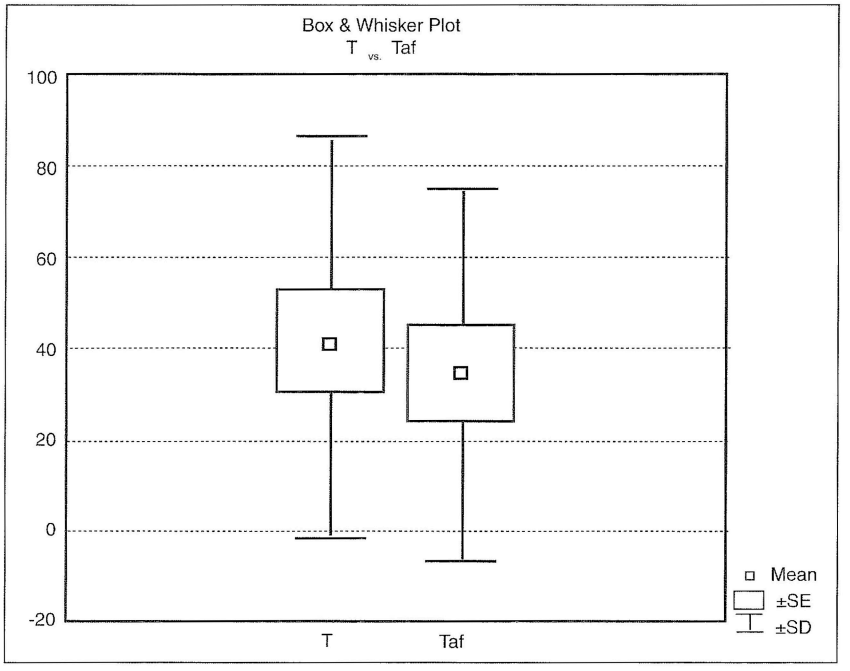
Na I. dermatovenerologické klinice v Brně probíhala od listopadu 2006 do listopadu 2007 klinická studie, jejímž cílem bylo ověřit bezpečnost a účinnost oxidované celulózy (OC) v léčbě bércových ulcerací a porovnat účinnost obou forem oxidované celulózy, tj. čisté OC (v grafech označená jako Taf) a hydrogenvápenaté soli OC (v grafech označená jako T). Jednalo se o preparáty firmy Bioster – Traumacel biodress (hydrogenvápenatá sůl OC) a Traumacel TAF light (čistá OC).

Oxidovaná celulóza je produkt selektivní oxidace celulózy rostlinného původu (bavlny). Je plně biodegradabilní, je resorbována do 48–72 hodin v závislosti na množství exsudátu. Byla zkoumána účinnost dvou forem OC – čisté oxidované celulózy (polyglukuronová kyselina) a částečně neutralizované OC (hydrogenvápenatá sůl polyglukuronové kyseliny – parciálně neutralizovaná OC zachovávající kyselý charakter látky). Čistá OC i hydrogenvápenatá sůl OC jsou využívány v chirurgii již řadu let především pro své hemostatické účinky. Ionty kalcia přítomné v hydrogenvápenaté soli OC se při hojení ran navíc vážou na receptory bolesti, čímž je blokují (3). Výsledkem je snížení bolesti v ráně a tím zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením bércové ulcerace. Ionty kalcia rovněž podporují hojení tím, že zvyšují osmotický tlak v ráně, což podporuje migraci makrofágů a růstových faktorů do rány. Výsledkem je aktivace fibroblastů. Studie *in vitro*, které se zabývaly účinkem oxidované celulózy na dermální fibroblasty, prokázaly, že oxidovaná celulóza vede k přímé stimulaci proliferace fibroblastů a signifikantně zvyšuje jejich metabolickou aktivitu (3, 4). Přesný mechanismus účinku však dosud není znám.

Lze předpokládat i příznivý vliv OC v obou formách na snížení pH v ráně, čímž dochází ke snížení aktivity proteáz. Proteázy jsou proteolytické enzymy, které jsou součás-



Obr. 1. Porovnání střední hodnoty a směrodatné odchylky věku pacientů ve skupinách léčených odlišným přípravkem.
Pozn.: T: hydrogenvápenatá sůl OC, Taf: čistá OC



Obr. 2. Porovnání střední hodnoty a směrodatné odchylky plochy vředů ve skupinách léčených odlišným přípravkem.
Pozn.: T: hydrogenvápenatá sůl OC, Taf: čistá OC

tí exsudátu chronických ran. Proteázy zpomalují hojení ran tím, že poškozují granulační tkáň a podporují zánětlivou fázi hojení ran. Aktivita proteáz významně závisí na pH v ráně. Chronické rány mají průměrné pH 7,4 – při tomto pH vykazují proteázy maximální aktivitu. Tato aktivita klesá při nižším, tj. lehce kyselém pH. Snížením pH v ráně tedy dochází ke snížení aktivity proteáz a tím k urychlení hojení.

MATERIÁL A POPIS METODIKY

a) Charakteristika souboru

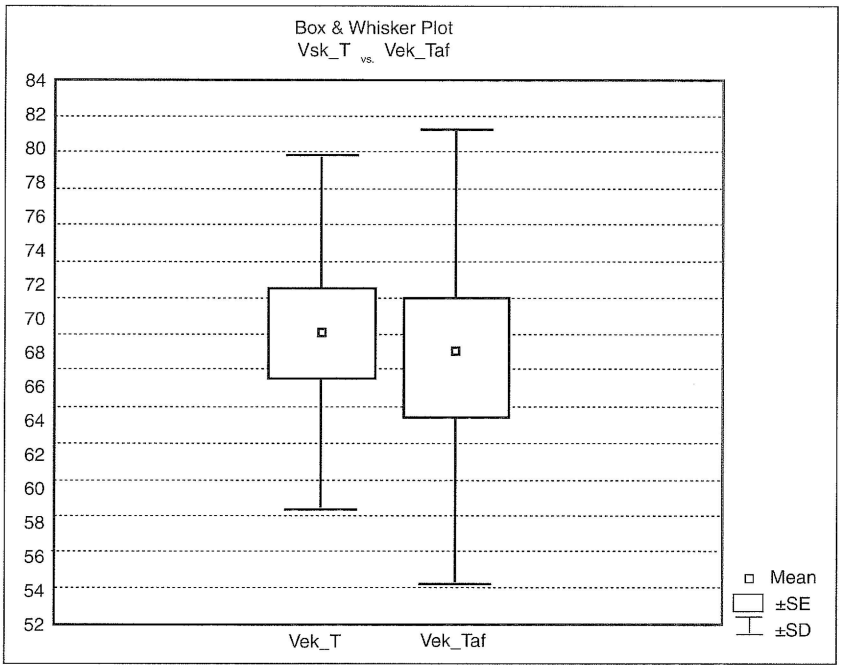
Do studie bylo zařazeno celkem 30 pacientů s chronickými bércovými ulceracemi venózní nebo smíšené etiologie, které trvají déle než 3 měsíce a nejeví známky hojení při standardní terapii (lokální terapie a adekvátní kompresivní terapie).

Výběr konkrétní formy OC závisel na pořadí pacienta ve studii – pacienti č. 1–5, dále 11–15 a dále 21–25 byli léčeni hydrogenvápenatou solí OC (skupina 1), pacienti č. 6–10, dále 16–20 a dále 26–30 byli léčeni čistou OC (skupina 2).

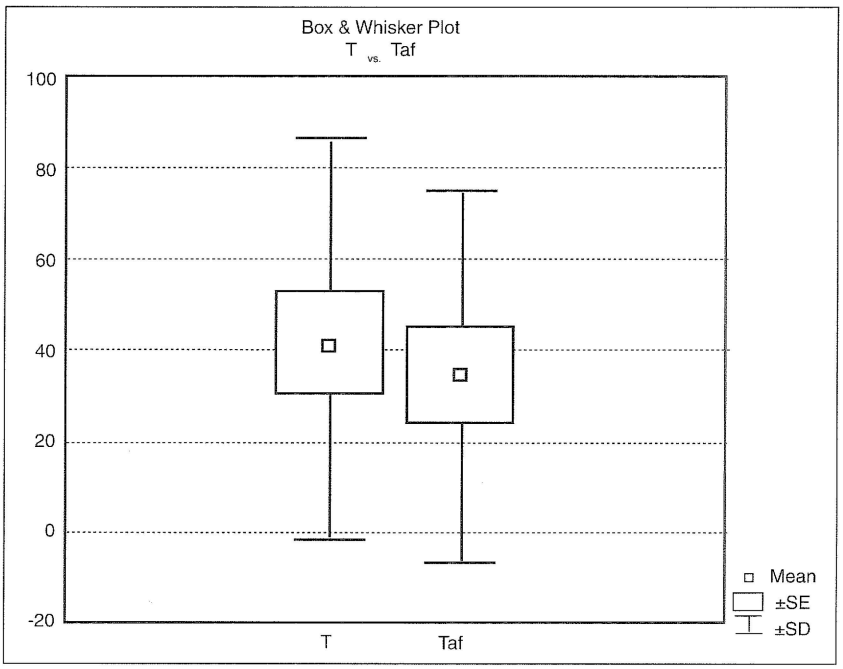
Z celkového počtu 30 pacientů bylo celkem 9 mužů a 21 žen. Průměrný věk pacientů ve skupině 1 byl 70,07 let (v rozpětí 51–84 let), ve skupině 2 byl 68,73 let (v rozpětí 48–84 let).

Průměrná doba trvání ulcerací byla u 1. skupiny 64,27 měsíců (s časovým rozpětím 5 měsíců – 38 let), u 2. skupiny byla 22,20 měsíců (s časovým rozpětím 3 měsíce – 7 let). Protože doba trvání má značný rozptyl a nemá normální rozdělení, byla pro srovnání data zlogaritmována. Potom mají již normální rozdělení a je možné použít t-test. Jednotlivé skupiny se neliší (i kdyby byly pro srovnání použity nelogaritmované hodnoty).

Ve skupině 1 se jednalo u 7 pacientů o venózní ulcerace a u 8 pacientů o ulcerace smíšené etiologie, ve skupině 2 byly u 5 pacientů zjištěny venózní ulcerace a u 10 pacientů ulcerace smíšené.



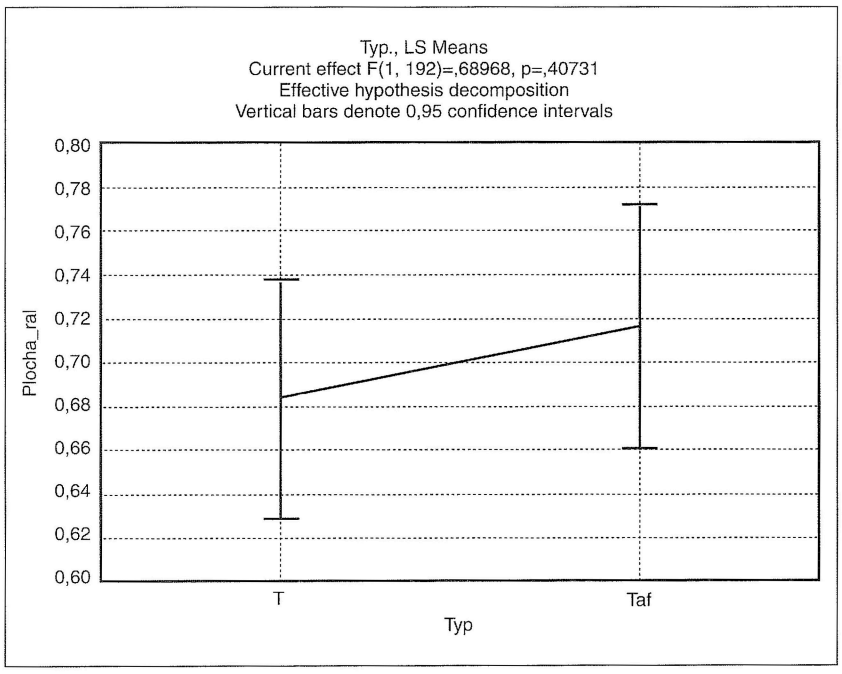
Obr. 3. Porovnání střední hodnoty a směrodatné odchylky doby trvání onemocnění pacientů ve skupinách léčených odlišným přípravkem.
Pozn.: T: hydrogenvápenatá sůl OC, Taf: čistá OC



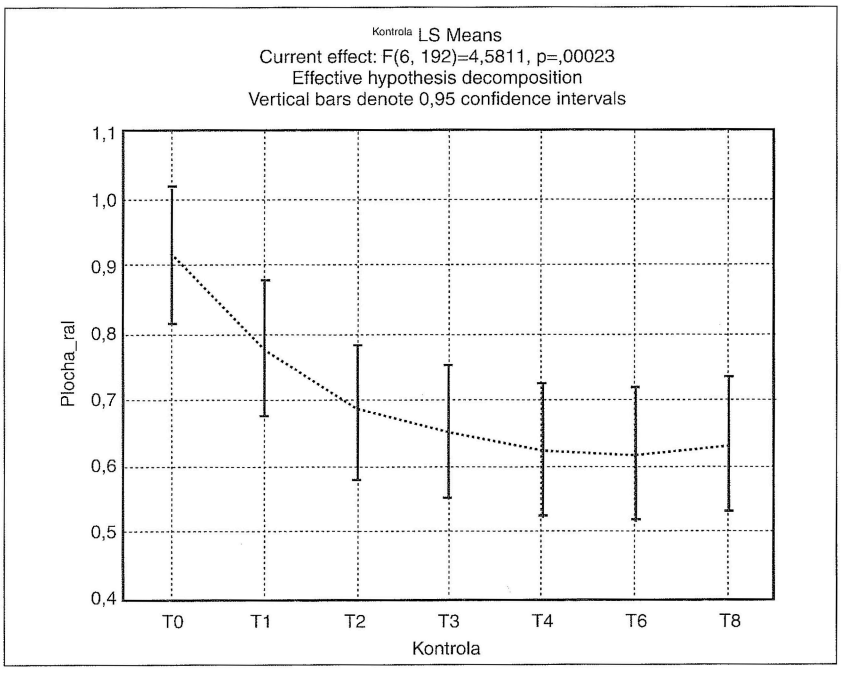
Obr. 4. Porovnání střední hodnoty a směrodatné odchylky bolesti pacientů ve skupinách léčených odlišným přípravkem.
Pozn.: T: hydrogenvápenatá sůl OC, Taf: čistá OC

b) Vyšetření pacientů

Všichni pacienti byli podrobně vyšetřeni anamnestickými, klinicky, dopplerovskou ultrasonografií včetně stanovení indexu tlaku kotník/paže (ABI – ankle/brachial index) a digitální fotopletysmografií. Dále byly provedeny laboratorní odběry – KO+diff a biochemické vyšetření – glykémie, urea, kreatinin, cholesterol, AST, ALT, GMT, bilirubin, CB, albumin, CRP, glykovaný Hb.



Obr. 5. Srovnání střední hodnoty plochy vředů všech pacientů léčených odlišnými přípravky.
Pozn.: T: hydrogenvápenatá sůl OC, Taf: čistá OC



Obr. 6. Srovnání střední hodnoty plochy vředů všech pacientů během jednotlivých kontrol, léčených odlišnými přípravky.
Pozn.: T: hydrogenvápenatá sůl OC, Taf: čistá OC

Rovněž bylo provedeno bakteriologické vyšetření ze spodiny ulcerace.

Na základě vyšetření byl stanoven charakter ulcerace.

Vylučovací kritéria byla následující:

- čistě arteriální ulcerace
- ulcerace menší než 2 cm^2 či trvající méně než 3 měsíce
- špatně kompenzovaný diabetes mellitus (glykovaný hemoglobin více než 8,5 %)
- výrazná anémie (hemoglobin méně než 100 g/l)
- dekompenzovaná srdeční insuficience
- výrazná hypoproteinemie (albumin méně než 35 g/l)
- ABI méně než 0,7
- maligní tumor s generalizací
- celková imunosupresivní terapie
- alergie na oxidovanou celulózu

Pacienti splňující kritéria byli na základě informovaného souhlasu zařazeni do studie.

c) Standardizace léčebného postupu

Před první aplikací porovnávaných forem OC byl zdokumentován charakter ulcerace (digitální fotografie, nákres na fólii a planimetrické zpracování), byl zaznamenán stav spodiny ulcerace i jejího okolí, stupeň exsudace. Dále byla číselně zaznamenána bolest, kterou pacient cítí, a to pomocí numerické škály bolesti (NRS). Numerická škála bolesti představuje jednu z možností, jak kvantitativně hodnotit intenzitu bolesti.

Před aplikací OC byla ulcerace obkladována Dermacynem, poté bylo ošetřeno okolí ulcerace zinkovým olejem a do ulcerace byla aplikována OC, která byla kryta mastným tylem, vrstvou gázy, fixována hydrofilním obinadlem a následně 2–3 krátkotažnými obinadly.

Celková doba aplikace oxidované celulózy byla 8 týdnů.

Převazy probíhaly po 1–3 dnech v závislosti na stupni exsudace, zpočátku většinou denně, ve 2. měsíci od zařazení do studie většinou po 2–3 dnech.

Klinické kontroly probíhaly 1. měsíc v týdenních intervalech, 2. měsíc po 2 týdnech. Při každé klinické kontrole byla hodnocena velikost ulcerace (digitální fotografie, nákres na fólii a planimetrické zpracování), charakter spodiny ulcerace, stupeň exsudace, charakter okolí ulcerace. Pacienti číselně zaznamenali bolest, kterou cítí, a to pomocí numerické škály bolesti. Pomocí speciálního dotazníku byla hodnocena i kvalita života pacientů, a to před zahájením studie a poté při ukončení studie. Rovněž byla hodnocena spokojenost pacientů s terapií oxidovanou celulózou.

VÝSLEDKY

V první fázi bylo ověřeno, zda obě skupiny pacientů pochází z jednoho základního souboru. Obě skupiny pacientů byly porovnány pomocí t-testu pro nezávislé hodnoty. Ve všech sledovaných parametrech (tj. věk pacientů, plocha vředů, doba trvání onemocnění, bolest) bylo zjištěno, že skupiny pacientů se neliší – hodnoty p jsou vyšší než 0,05 (obr. 1–4).

Průměrná plocha vředu před zahájením studie byla u 1. skupiny 42,37 cm^2 a u 2. skupiny 34,55 cm^2.

Průměrná bolest byla před zahájením studie u 1. skupiny 6,07 a u 2. skupiny 6,87 (hodnoceno numerickou škálou bolesti).

Pro **typ onemocnění** (venózní a smíšený) byl proveden Fisher exact p test, na základě kterého bylo zjištěno, že rozdělení ve skupinách se také neliší (p=0,35).

Hodnoty plochy měly u pacientů velký rozptyl a navíc neměly v průběhu léčení normální rozdělení. Z tohoto důvodu byly pro další analýzu použity hodnoty relativní (naměřené hodnoty byly vyděleny hodnotou maximální), které navíc vykazovaly normální rozdělení.

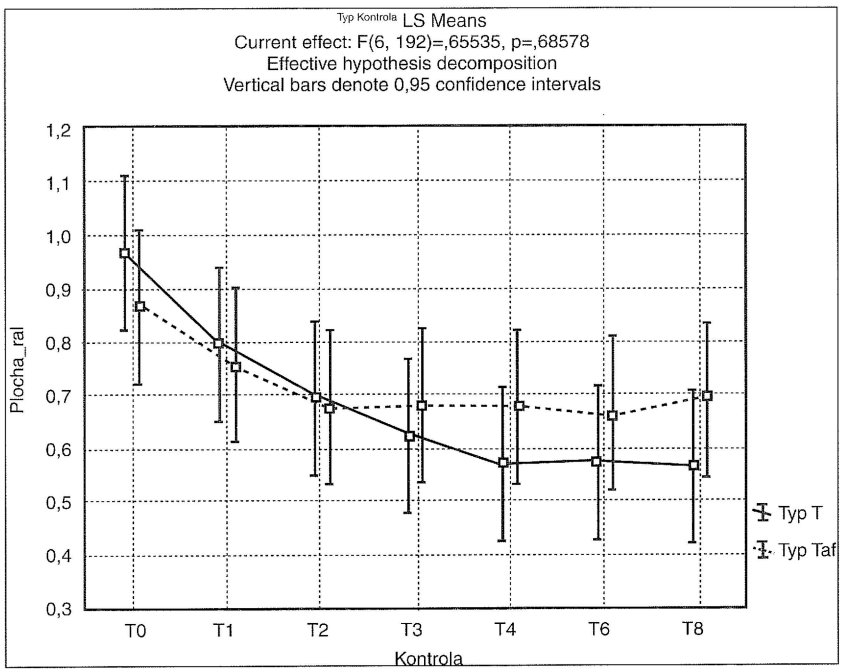
Pro **hodnocení účinnosti léčby** v závislosti na použité formě OC a době léčení byla použita **dvoucestná metoda ANOVA.**

Ukázalo se, že hodnoty relativní **plochy ulcerací** se u skupiny 1 a u skupiny 2 vzájemně v průběhu léčby statisticky neliší (obr. 5).

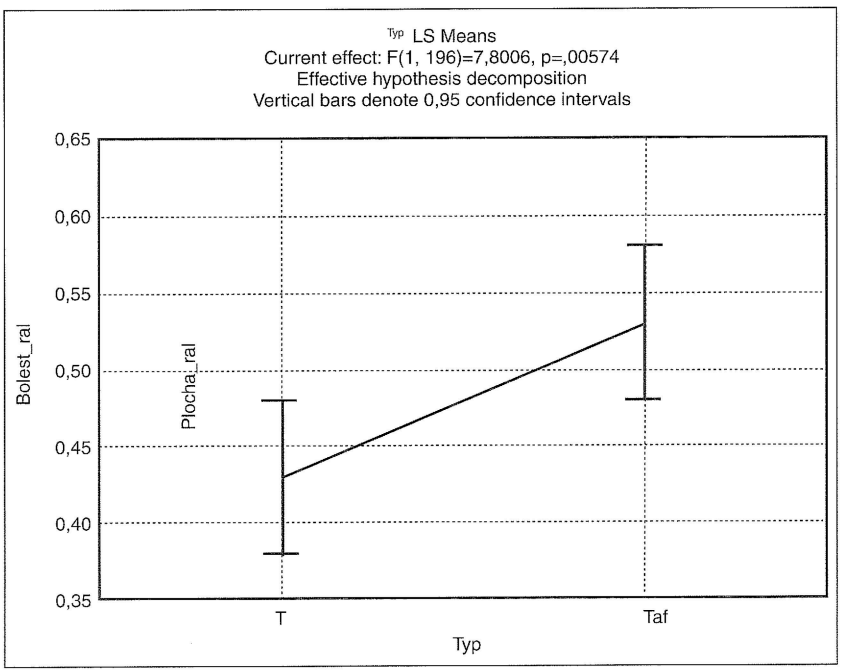
Statisticky významně však došlo ke zmenšení plochy vředů (p=0,00027) (obr. 6) – na základě následného post-hoc Tukey testu se již po 2 týdnech léčby hodnoty plochy ulcerací (stav T2) statisticky liší od plochy ulcerací na počátku léčení (stav T0).

V grafu na obr. 7 jsou vyneseny střední hodnoty relativní plochy obou forem OC během léčení včetně 95 % konfidencích intervalů. Z tohoto grafu je zřejmé, že lepších výsledků bylo dosaženo u skupiny 1 (tj. u pacientů léčených hydrogenvápenatou solí OC) – z grafu je zřejmý stálý klesající trend relativní plochy vředů. Naopak u pacientů léčených čistou formou OC jsou hodnoty relativní plochy vředů vyšší než u skupiny 1 a od kontroly v čase T2 (tj. po 2 týdnech léčby) se již prakticky nemění. Tato skutečnost je potvrzena také výsledky post-hoc Tukey testu, na základě kterého bylo prokázáno, že u skupiny 1 došlo navíc ke statisticky signifikantnímu zmenšení relativní plochy vředů i po 3 týdnech léčby (T3) v porovnání s počátečním stavem, kdežto u skupiny 2 se hodnoty od času T2 v celém dalším průběhu již neliší.

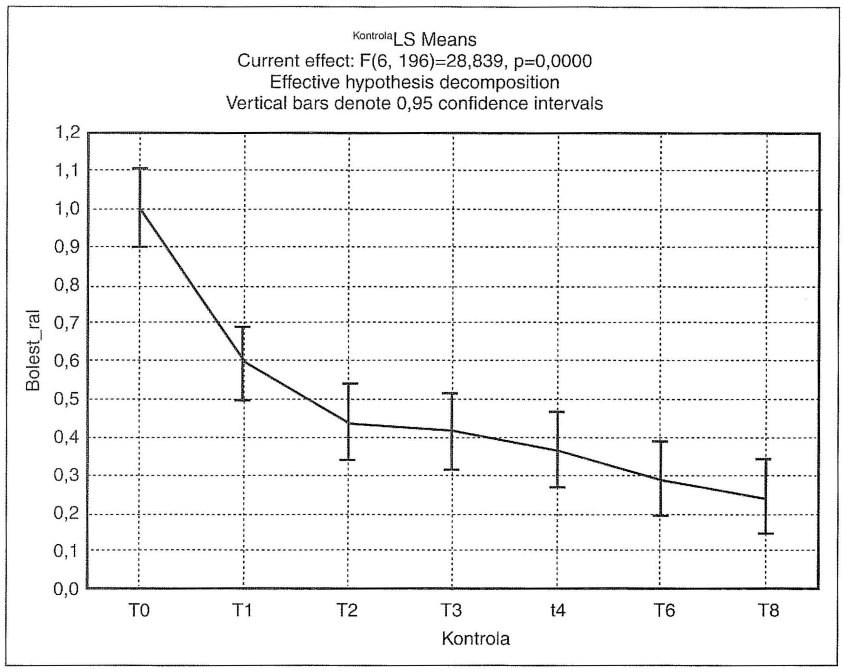
Hodnoty bolesti během léčení byly hodnoceny



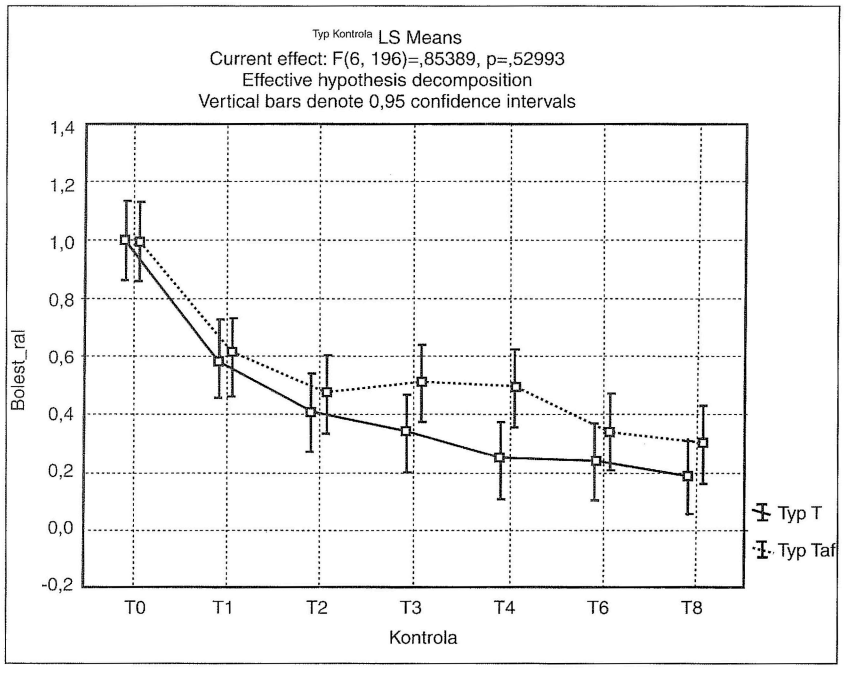
Obr. 7. Graf závislosti střední hodnoty relativní plochy vředů u obou typů preparátu během léčení včetně 95% konfidencích intervalů.
Pozn.: T: hydrogenvápenatá sůl OC, Taf: čistá OC



Obr. 8. Srovnání střední hodnoty bolesti všech pacientů léčených odlišnými přípravky.
Pozn.: T: hydrogenvápenatá sůl OC, Taf: čistá OC



Obr. 9. Srovnání střední hodnoty bolesti všech pacientů během jednotlivých kontrol, léčených odlišnými přípravky.
Pozn.: T: hydrogenvápenatá sůl OC, Taf: čistá OC



Obr. 10. Graf závislosti střední hodnoty relativní bolesti u obou typů preparátu během léčení včetně 95% konfidencích intervalů.
Pozn.: T: hydrogenvápenatá sůl OC, Taf: čistá OC

obdobným způsobem. Pro hodnocení byly opět použity relativní hodnoty bolesti, čímž se omezí subjektivní hodnocení pacienta a zdůrazní se změna během léčení. Po provedení ANOVA testu se signifikantně liší jak úroveň bolesti mezi skupinou 1 a skupinou 2 (p=0,0057) (obr. 8), tak i úroveň bolesti při jednotlivých kontrolách (p< 0,000001) (obr. 9). Z grafu na obr. 10, kde jsou vyneseny průběhy bolesti během léčení u obou skupin pacientů, je vidět, že u skupiny 2 jsou hodnoty bolesti vyšší než u skupiny 1. Tato skutečnost byla potvrzena i post-hoc Tukey testem – u skupiny 1 se statisticky významně liší bolest nejen při první kontrole po týdnu léčby (T1), ale navíc i relativní hodnoty bolesti po 4 týdnech léčby (T4) jsou statisticky významně nižší než v čase T1. V případě skupiny 2 se bolest statisticky významně sníží také při první kontrole, ale dále se již do konce sledování statisticky významně nemění.

Korelace mezi průběhem léčení a věkem nebo dobou onemocnění nebyly zjištěny.

DISKUSE

Oxidovaná celulóza použitá v této studii je získávána z dlouhovlákenné bavlny nejvyšší kvality s vysokým obsahem α-celulózy. Od ostatních forem celulózy se liší zejména způsobem zpracování. Vlákna totiž nejsou klasicky lisována, ale jsou předena kroucením základních šroubovic, čímž nevznikají plná, ale dutá vlákna s větším specifickým povrchem. Toto speciální zpracování zajišťuje vyšší účinnost této formy OC.

V průběhu studie byl pozorován velmi příznivý efekt OC i na ulcerace s povleklou spodinou, postupně došlo k jejímu vyčištění a navození granulační fáze hojení. Tyto klinické zkušenosti byly potvrzeny i laboratorně – bylo prokázáno, že OC působí na některé mikroorganismy baktericidně (*Staphylococcus aureus* včetně methicilin-rezistentních kmenů, dále *Streptococcus pyogenes, Streptococcus β-haemolyticus* non A non B), na jiné patogeny působí bakteriostaticky (gramnegativní bakterie – *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris*).

Antibakteriální účinek vůči širokému spektru patogenních mikroorganismů byl potvrzen jak *in vitro*, tak *in vivo*, a je pravděpodobně dán snížením pH v ráně. To vede kromě jiného k aktivaci přirozených obranných mechanismů hostitele (6).

Přesný mechanismus účinku OC není dosud zcela objasněn. Předpokládá se, že snížením pH v ráně dochází

ke **snížení aktivity proteáz**, zejména matrix metaloproteináz.

Matrix metaloproteinázy (MMP) jsou endopeptidázy závislé na zinku, produkované granulocyty, keratinocyty a fibroblasty. MMP se objevují v extracelulární matrix (ECM) ihned po tkáňovém poškození. Bylo zjištěno, že na rozdíl od akutních ran je jejich koncentrace u chronických ran mnohonásobně vyšší, protože je výrazně snížená hladina jejich tkáňových inhibitorů (10). Např. v exsudátu chronických venózních ulcerací byla zjištěna 116krát vyšší koncentrace MMP-1 (kolagenáza štěpící především fibrilární kolagen). MMP inaktivují růstové faktory a proteiny ECM (kolagen). MMP inaktivují i růstové faktory přidané exogenně (např. rekombinantní PDGF); proto v řadě klinických studií zjišťujících efekt růstových faktorů měla tato terapie jen omezený úspěch. Proto je potřeba prostředí chronických ran změnit na prostředí podobné ranám akutním, které se za normálních okolností hojí rychle.

V posledních letech se věnuje více pozornosti i tomu, jak bércové vředy ovlivňují život pacientů, tj. jaký je dopad na jejich **kvalitu života**. Řada studií totiž prokázala, že bércové vředy výrazně snižují kvalitu života pacientů (9). Proto je velmi důležitý fakt, že hydrogenvápenatá sůl OC vede k výraznému **snížení bolesti v ráně**. Bolest je jedním z hlavních faktorů, které snižují kvalitu života pacientů s bércovými vředy. Podle literárních údajů je bolestivých 60–80 % ulcerací venózní etiologie, z toho ve 20 % se jedná o bolest extrémní (5). Bolest a s ní související snížení kvality života má za následek pomalejší hojení rány. Chronická bolest totiž může vést k chronickému stresu, který negativně ovlivňuje hojení (7). Bolest tedy působí na hojení rány stejně negativně jako např. infekce v ráně (1). Po aplikaci hydrogenvápenaté soli OC byl zjištěn statisticky signifikantní ústup bolesti, čímž došlo ke zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením ulcerace.

ZÁVĚR

Na základě provedené studie lze shrnout, že obě formy oxidované celulózy urychlují hojení chronických bércových vředů, podle statistického zhodnocení byly zjištěny lepší výsledky u skupiny pacientů léčených hydrogenvápenatou solí oxidované celulózy. Podle klinických zkušeností se jedná zejména o urychlení granulace a epitelizace ulcerací. Již po týdnu aplikace obou forem oxidované celulózy dochází k výrazné úlevě od bolesti, což vede ke zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením bércového vředu. Vzhledem k tomu, že se jedná o plně resorbovatelný materiál, probíhá výměna krytí bez traumatizace pacienta, což je jeden ze základních požadavků, který by mělo moderní krytí splňovat. Oxidovaná celulóza se velmi snadno aplikuje na ránu, což je další nespornou výhodou tohoto krytí. V průběhu celé studie nebyly zaznamenány nežádoucí účinky související s aplikací obou forem oxidované celulózy.

LITERATURA

1. BRIGGS, M., TORRA, J.E. Pain at wound dressing changes: a guide to management. *EWMA Position Document: Pain at wound dressing changes*, 2002, p. 12-17.
2. HARRISON, M.B., GRAHAM, I.D., FRIEDBERG, E., LORIMER, K., VANDEVELDE, C.S. Assessing the population with leg and foot ulcers. *Canadian Nurse*, 2001, 97, p. 18-23.
3. HOFMAN, D., WILSON, J., POORE, S., et al. A pilot study using a new dressing material: Traumacel. *J Wound Care*, 2000, 9, p. 393-396.
4. HUGHES, M.A., YANG, Y., CHERRY, G.W. Effect of Traumacel P on the growth of human dermal fibroblasts in vitro. *J Wound Care*, 2002, 11, p. 149-154.
5. HYLAND, M.E., LEY, A., THOMSON, B. Quality of life of leg ulcer patients: questionnaire and preliminary findings. *J Wound Care*, 1994, 3, p. 294-298.
6. KOLLÁR, P., SUCHÝ, P., MUSELÍK, J., BAJEROVÁ, M., HAVELKA, P., SOPUCH, T. Hemostatické účinky oxidované celulosy. *Česká a slovenská farmacie*, 2008, 57, (1), p. 11-16.
7. MOFFATT, C.J., FRANKS, P.J., HOLLINWORTH, H. Understanding wound pain and trauma: an international perspective. *EWMA Position Document: Pain at wound dressing changes*, 2002, p. 2-7.
8. NEMETH, K.A., HARRISON, M.B., GRAHAM, I.D., BURKE, S. Understanding venous leg ulcer pain: results of a longitudinal study. *Ostomy/Wound Manage*, 2004, 50 (1), p. 34-46.
9. PERSOON, A., HEINEN, M.M., VLEUTEN, C. J.M., ROOIJ, M.J., KERKHOF, P.C.M., ACHTERBERG, T. Leg ulcers: a review of their impact on daily life. *J Clin Nurs*, 2004, 13, p. 341-354.
10. SCHULTZ, G.S., MAST, B.A. Molecular analysis of the environment of healing and chronic wounds: cytokines, proteases and growth factors. *Wounds*, 1998, 10 (Suppl. F), p. 1F-9F.

Došlo do redakce: 9. 2. 2009

MUDr. Veronika Slonková
I. dermatovenerologická klinika FN U sv. Anny
v Brně a LF MU
Pekařská 53
656 91 Brno
E-mail: veronika.slonkova@fnusa.cz

ÚSPĚŠNÁ TERAPIE BÉRCOVÝCH ULCERACÍ POMOCÍ HYDROGENVÁPENATÉ SOLI OXIDOVANÉ CELULÓZY

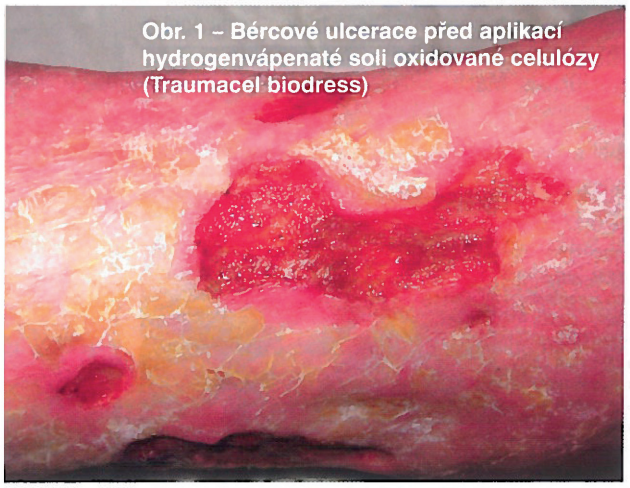
KAZUISTICKÉ SDĚLENÍ

Slonková, V., Vašků, V. I. dermatovenerologická klinika LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Úvod

Bércové ulcerace představují závažný zdravotnický problém, zejména pro svou chronicitu a sklon k recidivám. Bércové ulcerace mají negativní dopad i na kvalitu života pacientů, což bylo prokázáno řadou studií. Je proto třeba stále hledat nové léčebné možnosti, které pomohou urychlit hojení.

Oxidovaná celulóza (OC) je 100 % polymer glukózy, získaný z rostlinného materiálu. Hydrogenvápenatá sůl oxidované celulózy je pro své hemostatické účinky využívána v chirurgii již řadu let. Kromě toho, že ionty kalcia hrají důležitou roli v procesu hemostázy, vážou se také na receptory bolesti, které blokují. Dochází tak ke snížení bolesti v ráně, a tím ke zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením bércové ulcerace. Ionty kalcia rovněž podporují hojení tím, že zvyšují osmotický tlak v ráně, což vede ke zvýšené koncentraci růstových faktorů v ráně. Výsledkem je aktivace fibroblastů. Hydrogenvápenatá sůl OC má rovněž výrazné antimikrobiální účinky, působí jak na Gram-pozitivní bakterie (Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes aj.), tak i na Gram-negativní mikroorganismy (Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Escherichia coli aj.). Velmi významnou vlastností hydrogenvápenaté soli OC je fakt, že snižuje produkci matrix metaloproteináz (MMP), konkrétně MMP-2 a MMP-9; kromě toho zvyšuje tvorbu TGF-beta (transforming growth factor -beta), který patří do skupiny tkáňových inhibitorů MMP. Oxidovaná celulóza dále vede k přímé stimulaci proliferace fibroblastů a signifikantně zvyšuje jejich metabolickou aktivitu, což bylo prokázáno studiemi in vitro na dermálních fibroblastech. Velkou výhodou OC je i skutečnost, že je plně biodegradabilní – je resorbována do 48–72 hodin v závislosti na množství exsudátu.



Obr. 1 – Bércové ulcerace před aplikací hydrogenvápenaté soli oxidované celulózy (Traumacel biodress)

FOTO: SLONKOVÁ, V.

V následující kazuistice je popsán případ pacientky, která byla úspěšně léčena hydrogenvápenatou solí OC. Jednalo se o přípravek společnosti Bioster – Traumacel biodress.

Kazuistika

Pacientkou je 67letá žena, která se léčí s recidivujícími ulceracemi levého bérce již 22 let. Před 23 lety prodělala hlubokou flebotrombózu, povrchové záněty žil ani erysipel neudává. Kompresi krátkotažnými obinadly nosí pravidelně. Léčí se s poruchou glukózové tolerance, jinak je zdráva.

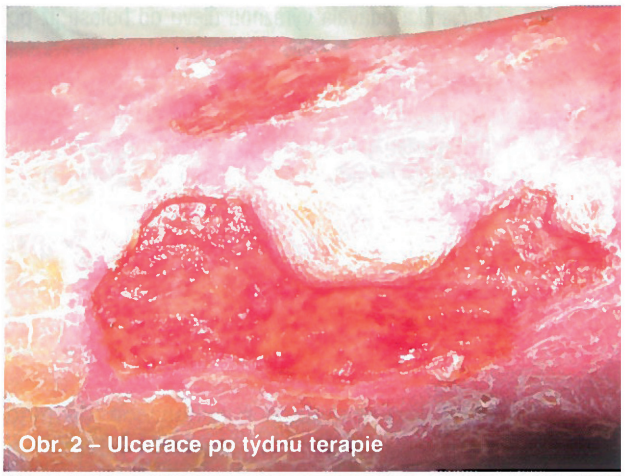
Epikutánními testy byla prokázána kontaktní přecitlivělost na alkoholy lanolínu, formaldehyd, kalafunu a heřmánek.

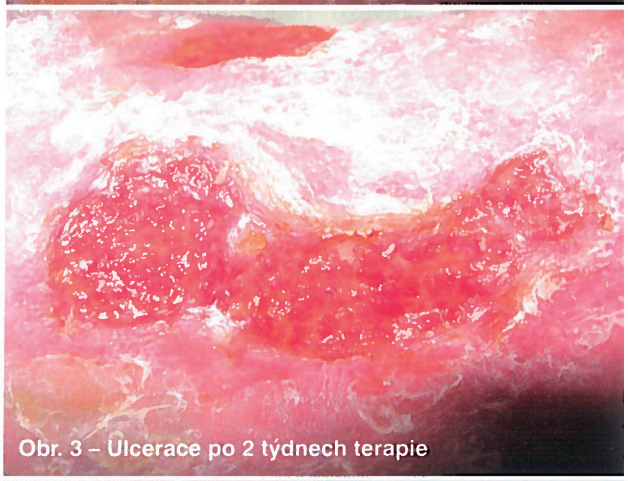
Pacientka byla vyšetřena na I. dermatovenerologické klinice pro recidivu ulcerací na levém bérci trvající 11 měsíců. Bylo provedeno cévní vyšetření, podle kterého se jednalo o ulcerace venózní etiologie na podkladě posttrombotického syndromu.

Objektivně se na levém bérci distálně nacházelo několik ulcerací nepravidelného tvaru s částečně granulující, částečně povleklou spodinou (obr. 1). Okolí ulcerací bylo klidné, jen s výraznější desquamací. Celková plocha ulcerací byla 27,5 cm^2. Pacientka udávala velmi silné bolesti v oblasti ulcerací – č. 9 dle numerické škály bolesti (numerical rating scale – NRS).

Pacientka byla léčena hydrogenvápenatou solí OC. Převazy ulcerací probíhaly zpočátku denně, poté po 2 dnech. Před aplikací OC byla ulcerace obkladována Dermacynem, poté bylo ošetřeno okolí ulcerace zinkovým olejem a do ulcerace byla aplikována OC, která byla kryta mastným tylem, vrstvou gázy, fixována hydrofilním obinadlem a následně 2–3 krátkotažnými obinadly.

V týdenních intervalech byla hodnocena jednak velikost ulcerace (fotodokumentace, nákres na folii k pozdějšímu planimetrickému zpracování), jednak byl zaznamenán i charakter spodiny ulcerace a jejího okolí. K hodnocení bolesti byl použita numerická škála bolesti. Po aplikaci hydrogenvápenaté soli OC došlo postupně k vyčištění spodiny ulcerací, k navození granulace a především velmi rychlé epitelizace z okrajů (obr. 2–4). Po 3 týdnech byla plocha všech ulcerací méně než poloviční (12,5 cm^2). Velmi rychlá epitelizace pokračovala i během druhého měsíce terapie hydrogenvápenatou solí oxidované celulózy (obr. 5, 6), po 8 týdnech byla ulcerace ventrálně na bérci zcela zhojena (obr. 7), ostatní ulcerace velmi rychle epitelizovaly z okrajů. Celková plocha ulcerací byla po 2 měsících léčby 2,9 cm^2.


Obr. 2 – Ulcerace po týdnu terapie


Obr. 3 – Ulcerace po 2 týdnech terapie

Obr. 4 – Ulcerace po 3 týdnech terapie

FOTO: SLONKOVÁ, V.

Pacientka udávala výraznou úlevu od bolesti již po týdnu terapie – č. 6 dle NRS, po 2 týdnech pak došlo ke snížení bolesti na č. 4 dle NRS a po 6 týdnech léčby se bolest velmi zmírnila (č. 2 dle NRS). Výrazným snížením bolesti došlo ke zlepšení kvality života pacientky ještě před zhojením bércových ulcerací.

ZÁVĚR

Hydrogenvápenatá sůl oxidované celulózy představuje novou možnost v hojení chronických bércových ulcerací. Výrazně urychluje hojení bércových vředů, zejména fázi granulace a epitelizace. Je plně biodegradabilní, její aplikace je snadná, při převazu nedochází k traumatizaci pacienta. Vede k výraznému snížení bolesti v oblasti ulcerací, čímž dochází ke zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením vředu.

MUDr. Veronika Slonková
Doc. MUDr. Vladimír Vašků, CSc.
I. dermatovenerologická klinika LF MU u sv. Anny v Brně
Pekařská 53, 656 91 Brno
veronika.slonkova@fnusa.cz

LITERATURA

1. Briggs, M., Torra, J.E.: Pain at wound dressing changes: a guide to management. EWMA Position Document: Pain at wound dressing changes, 2002, s.12–17.
2. Hofman,D., Wilson, J., Poore,S. et al.: A pilot study using a new dressing material: Traumacel. J Wound Care, 2000, 9, s.393–396.
3. Hughes, M.A., Yang, Y., Cherry, G.W.: Effect of Traumacel P on the growth of human dermal fibroblasts in vitro. J Wound Care, 2002, 11, s149–154.
4. Kollár, P., Suchý, P., Muselík, J., Bajerová, M., Havelka, P., Sopuch, T.: Hemostatické účinky oxidované celulosy. Česká a slovenská farmacie, 2008, 57, č.1, s.11–16.
5. Nemeth, K.A., Harrison, M.B., Graham, I.D., Burke, S.: Understanding venous leg ulcer pain: results of a longitudinal study. Ostomy/ Wound Manage, 2004, 50(1), s. 34–46.
6. Persoon, A., Heinen, M.M., Vleuten, C.J.M., Rooij, M.J, Kerkhof, P.C.M., Achterberg, T.: Leg ulcers: a review of their impact on daily life. J Clin Nurs, 2004, 13,s.341–354.
7. Schultz, G.S., Mast, B.A.: Molecular analysis of the environment of healing and chronic wounds: cytokines, proteases and growth factors. Wounds, 1998, 10(Suppl.F), s.1F-9F.

Obr. 5 – Ulcerace po 4 týdnech terapie

Obr. 6 – Ulcerace po 6 týdnech terapie

Obr. 7 – Ulcerace po 8 týdnech terapie

FOTO: SLONKOVÁ, V.

Využití hydrogenvápenaté soli oxidované celulózy

(Traumacelu biodress) v terapii chronických ulcerací: shrnutí výsledků klinické studie a kazuistika

MUDr. Veronika Slonková, doc. MUDr. Vladimír Vašků, CSc.
1. dermatovenerologická klinika LF MU a FN u sv. Anny, Brno

Hydrogenvápenatá sůl oxidované celulózy z bavlny (Traumacel biodress) přispívá k lepšímu hojení chronických ran. Výsledky roční klinické studie prokázaly, že toto vstřebatelné krytí urychluje hojení chronických ulcerací, ulevuje pacientům od bolesti a umožňuje atraumatické převazy. Kazuistika popisuje terapii chronických ulcerací tímto krytím u geriatrické pacientky.

Úvod

Bércové ulcerace představují závažný medicínský problém pro společnost. Udává se, že ve vyspělých zemích je prevalence bércových vředů 0,6–3,6 na 1000 obyvatel (Nemeth 2004). Jedná se o chronické, recidivující onemocnění, které výrazně zhoršuje kvalitu života, zejména v důsledku bolesti, kterou pacienti pociťují.

Výsledky klinické studie

Na 1. dermatovenerologické klinice v Brně probíhala v roce 2007 klinická studie, jejímž cílem bylo ověřit bezpečnost a účinnost oxidované celulózy (OC) v léčbě bércových ulcerací a porovnat účinnost obou jejích forem, tj. hydrogenvápenaté soli a čisté formy. Do studie bylo zařazeno celkem 30 pacientů s chronickými bércovými ulceracemi venózní nebo smíšené etiologie, které trvají déle než 3 měsíce a nejeví známky hojení při standardní terapii (lokální terapie a adekvátní kompresivní terapie). Polovina pacientů byla léčena hydrogenvápenatou solí OC (skupina 1), druhá polovina byla léčena kyselou formou OC (skupina 2).

Na základě provedené studie lze shrnout, že obě formy oxidované celulózy urychlují hojení chronických bércových vředů, ovšem pacienti léčeni hydrogenvápenatou solí OC (Traumacelem biodress) vykazovali rychlejší tendenci k hojení ulcerací, zejména došlo k urychlení granulace a epitelizace ulcerací (statisticky byla porovnána relativní plocha ulcerací u obou skupin pacientů). Rovněž u těchto pacientů došlo k rychlejšímu a výraznějšímu ústupu bolesti, což vedlo ke zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením bércového vředu (opět byla statisticky zhodnocena relativní hodnota bolesti v obou skupinách pacientů).

Věkový průměr pacientů ve skupině léčené Traumacelem biodress byl 70,07 let (v rozpětí 51–84 let). Jednalo se tedy především o pacienty vyšších věkových skupin, u kterých je obecně pozorována pomalejší tendence k hojení ran. I přes tuto skutečnost byl pozorován velmi dobrý efekt Traumacelu biodress. Vzhledem k tomu, že jde o plně resorbovatelný materiál, probíhá výměna krytí bez traumatizace pacienta, což je jeden ze základních požadavků, který by mělo moderní krytí splňovat. Traumacel biodress se velmi snadno aplikuje na ránu, což je další nespornou výhodou tohoto krytí. V průběhu celé studie nebyly zaznamenány nežádoucí účinky související s aplikací obou forem oxidované celulózy.

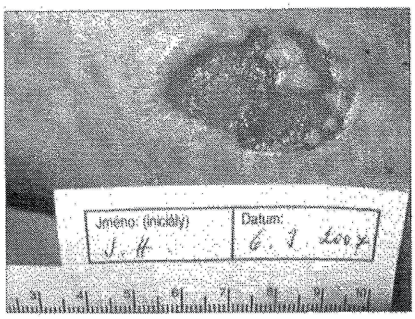
Hydrogenvápenatá sůl oxidované celulózy a hojení ran

Oxidovaná celulóza je 100% polymer glukózy, získaný z rostlinného materiálu. Je plně biodegradabilní, resorbována je do 48–72 hodin v závislosti na množství exsudátu. Hydrogenvápenatá sůl oxidované celulózy se využívá v chirurgii již řadu let především pro své hemostatické účinky. Kromě toho, že ionty kalcia hrají důležitou roli v procesu hemostázy, vážou se pravděpodobně na receptory bolesti, čímž je blokují. To vede ke snížení bolesti v ráně a tím zlepšení kvality života pacientů ještě před zhojením bércové ulcerace. Ionty kalcia rovněž podporují hojení tím, že zvyšují osmotický tlak v ráně, což podporuje migraci makrofágů a růstových faktorů do rány. Výsledkem je aktivace fibroblastů. Studie in vitro, které se zabývaly účinkem oxidované celulózy na dermální fibroblasty, prokázaly, že oxidovaná celulóza vede k přímé stimulaci proliferace fibroblastů a signifikantně zvyšuje jejich metabolickou aktivitu.[1,2]

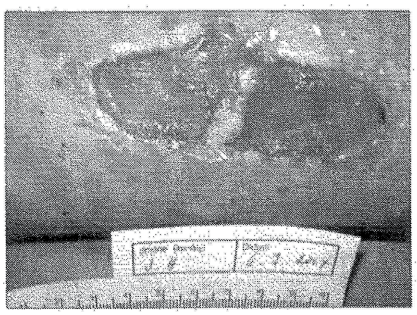
V následující kazuistice bude popsán velmi rychlý průběh hojení chronických ulcerací při využití

Tab. 1 – Velikost plochy vředů a hodnoty bolesti v průběhu hojení

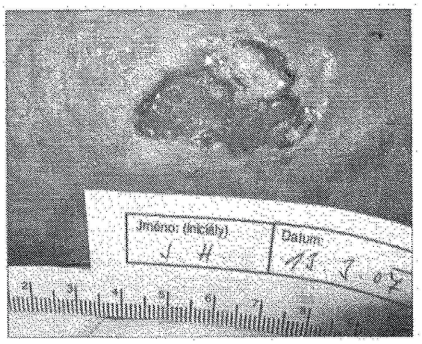
Týdny	T0	T1	T2	T3	T4	T6	T8
Plocha vředů (cm²)	15,3	13,5	7,9	5,7	4,5	2,5	0,8
Bolest (NRS)	2	1	1	0	0	0	0



Obr. 1 – Pravá ulcerace před zahájením léčby. | Foto: autorka



Obr. 1a – Levá ulcerace před zahájením léčby. | Foto: autorka



Obr. 2 – Epitelizace pravé ulcerace po týdnu léčby. | Foto: autorka

Obr. 2a – Epitelizace levé ulcerace po týdnu léčby. | Foto: autorka

hydrogenvápenaté soli oxidované celulózy (Traumacel biodress).

KAZUISTIKA GERIATRICKÉ PACIENTKY

Anamnéza

Pacientkou je 83letá žena s recidivujícími ulcerace mi na obou bércích.

Pacientka se léčí s ischemickou chorobou srdeční, hypertenzí, diabetem 2. typu kompenzovaným dietou a s hypotyreózou. Byla operována pro artrózu obou kyčelních kloubů s implantací totální endoprotézy a dále byla roku 2005 provedena totální excize maligního melanomu v oblasti pravé tváře.

Ulcerace u pacientky recidivují i při pravidelné kompresivní terapii na levém bérci 7 let, na pravém bérci 5 let. Záněty žil pacientka neprodělala.

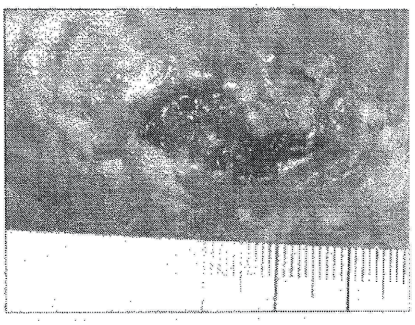
V březnu 2007 byla pacientka vyšetřena na 1. dermatovenerologické klinice v Brně pro recidivu ulcerací na obou bércích od léta 2006, tj. 9 měsíců. Pacientka byla komplexně vyšetřena, podle cévního vyšetření se jednalo o bércové vředy smíšené etiologie – na terénu chronické žilní insuficience (třída C6 podle CEAP) a periferní angiopatie při diabetu, s převahou žilní složky. Pacientka splňovala vstupní kritéria pro zařazení do klinické studie s oxidovanou celulózou včetně informovaného souhlasu.

Objektivně se v distální třetině pravého bérce nacházela okrouhlá ulcerace velikosti 4,4 cm^2. Spodina ulcerace byla zčásti živé granulující, zčásti s fibrinovými nálety, byla patrná epitelizace z okrajů, okolí bylo klidné (obr. 1). Vlevo na bérci se nacházela podélná ulcerace velikosti 10,1 cm^2, s granulující spodinou, zčásti s fibrinovými nálety, v centru byla ulcerace téměř přemostěna. Okolí ulcerace bylo klidné (obr. 1a). Pacientka udávala mírnou bolest v oblasti obou ulcerací – č. 2 podle NRS.

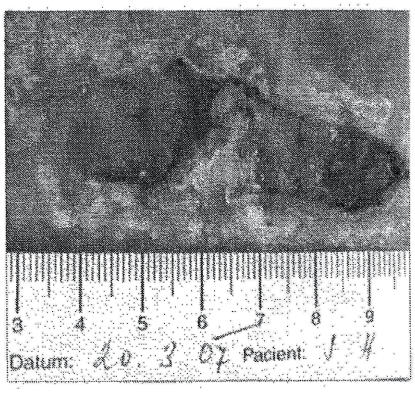
Aplikace krytí

Pacientka byla léčena hydrogenvápenatou solí oxidované celulózy (Traumacelem biodress). Před první aplikací OC byla hodnocena velikost ulcerace (digitální fotografie, nákres na fólii a planimetrické zpracování), byl zaznamenán stav spodiny ulcerace i jejího okolí, stupeň exsudace. Dále byla číselně zaznamenána bolest, kterou pacientka cítí, a to pomocí numerické škály bolesti (NRS). Numerická škála bolesti představuje jednu z možností, jak kvantitativně hodnotit intenzitu bolesti.

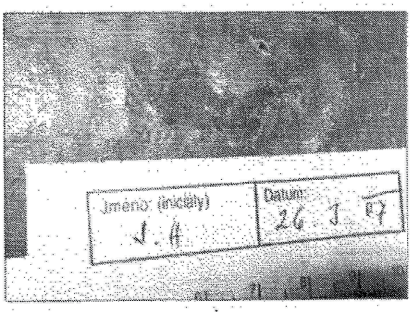
Před aplikací Traumacelu biodress byla ulcerace obkladována Dermacynem po dobu 15 minut, poté bylo ošetřeno okolí ulcerace zinkovým olejem a do ulcerace byl aplikován Trauma-



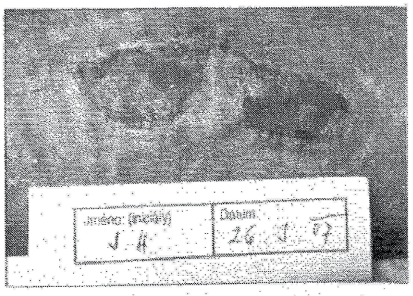
Obr. 3 – Pravá ulcerace po dvou týdnech léčby. | Foto: autorka



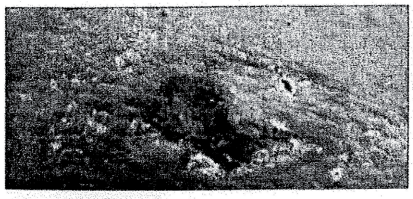
Obr. 3a – Levá ulcerace po dvou týdnech léčby; plocha zmenšená na polovinu. | Foto: autorka



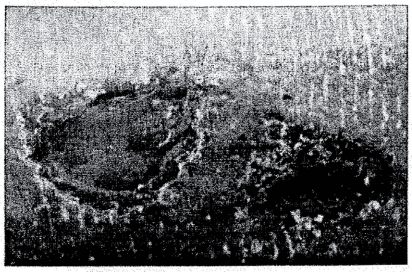
Obr. 4 – Velmi rychlé hojení pokračovalo i nadále; pravá ulcerace. | Foto: autorka



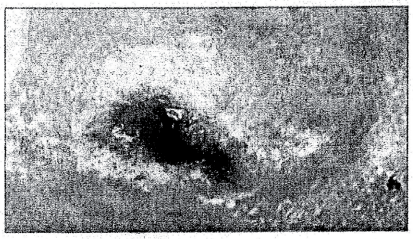
Obr. 4a – Velmi rychlé hojení pokračovalo i nadále; levá ulcerace. | Foto: autorka



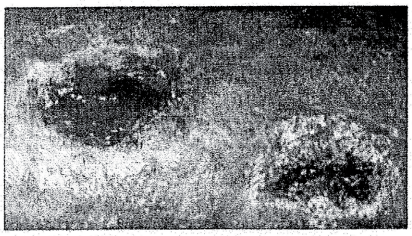
Obr. 5 – Pravá ulcerace po 4 týdnech léčby. | Foto: autorka



Obr. 5a – Levá ulcerace po 4 týdnech léčby. | Foto: autorka



Obr. 6 – Pravá ulcerace po 6 týdnech léčby. | Foto: autorka



Obr. 6a – Levá ulcerace po 6 týdnech léčby. | Foto: autorka

cel biodress, který byl krytý mastným tylem, vrstvou gázy, fixována hydrofilním obinadlem a následně 2–3 krátkotažnými obinadly. Klinické kontroly probíhaly 1. měsíc v týdenních intervalech, 2. měsíc po 2 týdnech. Při každé klinické kontrole byla hodnocena velikost ulcerace (digitální fotografie, nákres na fólii a planimetrické zpracování), charakter spodiny ulcerace, stupeň exsudace, charakter okolí ulcerace.

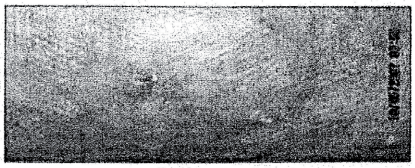
Průběh terapie

Převazy ulcerací probíhaly zpočátku denně, poté po 2–3 dnech. Frekvence převazů byla dána stupněm exsudace. Zpočátku byl Traumacel biodress resorbován rychleji, takže převazy probíhaly denně. Později s přechodem ulcerací do epitelizační fáze hojení se snížilo množství exsudátu, proto bylo možné ponechat Traumacel biodress v ráně 2–3 dny, než došlo k jeho úplné resorpci.

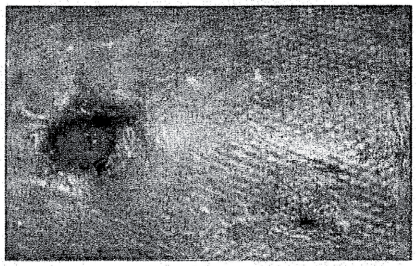
Již po týdnu došlo k velmi rychlé epitelizaci obou ulcerací, a to jak vpravo (obr. 2), tak i vlevo, kde byla ulcerace pruhem epitelu téměř přemostěna (obr. 2a).

Po 2 týdnech došlo k dalšímu zmenšení ulcerace vpravo (obr. 3), vlevo patrné již 2 drobné defekty se zcela čistou, granulující spodinou a s rychlou epitelizací z okrajů (obr. 3a). Celková plocha ulcerací se zmenšila na polovinu (7,9 cm^2).

Velmi rychlé hojení ulcerací pokračovalo i nadále (obr. 4, 4a), po 4 týdnech byla celková plocha ulcerací 4,5 cm^2 (obr. 5, 5a). Po 6 týdnech došlo k dalšímu zmenšení plochy defektů na polovinu (obr. 6, 6a). Po 8 týdnech byla ulcerace vpravo téměř zhojena, přetrvávala jen pevně lpící krustoskvama (obr. 7), vlevo byla proximální ulcerace zhojena, distálně přetrvávala krusta, po jejímž odstranění se na bérci nacházela ulcerace velikosti 0,8 cm^2 (obr. 7a). Pacientka udávala výrazný ústup bolestí, v průběhu 2. měsíce terapie necítila žádnou bolest v oblasti ulcerací (tab. 1). Tím došlo ke zlepšení kvality jejího života ještě před zhojením ulcerací.



Obr. 7 – Pravá ulcerace po 8 týdnech téměř zhojena. | Foto: autorka



Obr. 7a – Levá ulcerace po 8 týdnech léčby. | Foto: autorka

Závěr

Popsaná kazuistika demonstruje velmi příznivý efekt hydrogenvápenaté soli oxidované celulózy (Traumacelu biodress) na hojení ran. U naší pacientky došlo velmi rychle k navození nejprve granulační, poté i epitelizační fáze hojení ran. Současně pacientka udávala i výrazné snížení bolesti v oblasti ulcerací, čímž se zlepšila kvalita jejího života. ■

Literatura:

1. Hughes, M.A., Yang, Y., Cherry, G.W.: Effect of Traumacel P on the growth of human dermal fibroblasts in vitro. J Wound Care 2002;11:149–154.
2. Hofman, D., Wilson, J., Poore, S. Et al: A pilot study using a new dressing material: Traumacel. J Wound Care 2000;9:393–396.
3. Nemeth, KA., Harrison, M.B., Graham, I.D. and Burke, S.: Understanding venous leg ulcer pain: results of a longitudinal study. Ostomy/Wound Management 2004;50, (1), 34–46.

Inzerce 800007835