

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

# 35 280

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*A61F 2/10* (2006.01)  
*A61L 27/24* (2006.01)  
*A61L 27/20* (2006.01)  
*A61L 27/40* (2006.01)  
*A61L 27/26* (2006.01)  
*A61L 27/60* (2006.01)  
*A61L 27/56* (2006.01)  
*A61L 27/58* (2006.01)  
*A61L 27/54* (2006.01)  
*A61L 27/36* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-38920**  
(22) Přihlášeno: **22.06.2021**  
(47) Zapsáno: **27.07.2021**

- (73) Majitel:  
Vysoké učení technické v Brně, Brno, Veveří, CZ  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,  
Brno, Medlánky, CZ  
Fakultní nemocnice Brno, Brno, Bohunice, CZ
- (72) Původce:  
doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D., Měnín, CZ  
Mgr. Veronika Pavlíňáková, Ph.D., Brno, Líšeň,  
CZ  
Ing. Katarína Kacvinská, 05801 Poprad, SK  
Mgr. Jan Žídek, Ph.D., Brno, Lesná, CZ  
doc. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D., MBA,  
Syrovice, CZ  
MUDr. Jakub Holoubek, Brno, Bystrc, CZ  
MUDr. Martin Knoz, Ph.D., Brno, Maloměřice, CZ  
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D., Velešovice, CZ  
MVDr. Eduard Göpfert, Ph.D., Brno, Jehnice, CZ  
Mgr. Monika Vícenová, Brno, Staré Brno, CZ
- (74) Zástupce:  
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,  
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitého vzoru:  
**Dvouvrstvá náhrada kůže**

CZ 35280 U1

## Dvouvrstvá náhrada kůže

### Oblast techniky

5

Předmětem technického řešení je dvouvrstvá, plně vstřebatelná, náhrada kůže pro léčbu kožních defektů obsahující spodní biopolymerní porézní část a horní nanovláčennou část z biodegradabilních polymerů modifikovanou bioaktivními látkami urychlujícími hojení.

10

### Dosavadní stav techniky

Hojení kožních ran je složitý proces zahrnující interakce mezi buňkami, mediátory, cytokiny, remodelací matrice a neurovaskulárním systémem. Úspěšnost hojení kůže se významně zvýšila s použitím náhrad připravených na míru z biomateriálů napodobujících extracelulární matrix kůže a její vlastnosti (např. pevnost a pružnost). Biomateriály jsou klíčovou součástí různých krytů ran a náhrad tkáňového inženýrství. Náhrady musí splňovat určité požadavky, jako je biokompatibilita, biologická rozložitelnost, dočasná mechanická podpora, propustnost a propojovací póry vhodné pro podporu buněčné integrace. Nejčastějším materiálem pro náhradu kůže je kolagen. Kolagen je nejhojnější protein v lidském těle, kde působí jako strukturní stavební blok extracelulární matrix, který se nachází ve většině nativních tkání. Kolagen je také málo zánětlivý, biologicky odbouratelný, biokompatibilní a bioresorbovatelný biopolymer. Má vysokou afinitu k vodě, dobrou buněčnou kompatibilitu, nízkou antigenicitu a schopnost podporovat regeneraci tkání. Nedokonalosti kolagenu lze eliminovat kombinací kolagenu s jinými biomateriály a/nebo bioaktivními molekulami.

30

Oxidovaná celulóza a chitosan jsou biologicky odbouratelné polysacharidy a vykazují biologickou aktivitu. Oxidovaná celulóza se široce používá jako hojivý a hemostatický materiál s vynikajícími vlastnostmi, jako je vysoká vstřebatelnost, antibakteriální a antivirové vlastnosti, a netoxické a antiadhezivní účinky. Chitosan vykazuje jedinečné vlastnosti, jako je biokompatibilita, biologická rozložitelnost, baktericidní účinek a schopnost zpracování na mikrovlákna a nanovlákna. Chitosan se používá v různých biomedicínských aplikacích, jako jsou nosiče léčiv, chirurgické nitě a materiály pro hojení ran. Kromě toho může chitosan fungovat jako můstek ke zvýšení účinnosti zesíťování v materiálech na bázi kolagenu kvůli velkému počtu aminoskupin v jeho molekulárním řetězci.

35

Nové možnosti v léčbě a zlepšení vlastností materiálů pro tkáňové inženýrství kůže mohou zajistit biologicky účinné látky na bázi růstových faktorů. Nalezení vhodné koncentrace růstových faktorů a způsob jejich dodání do místa určení je klíčovým faktorem pro jejich použití v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně. Bylo zjištěno, že např. růstové faktory obsažené v krevních derivátech mají vhodné vlastnosti pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu. Plazma bohatá na krevní destičky (PRP), která se získává od pacienta (autologně), od dárců (alogenně) nebo od zvířat (xenogenně), obsahuje endogenní růstové faktory např. transformující růstový faktor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), růstové faktory podobné inzulínu (IGF) 1 a 2, vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2) a růstový faktor hepatocytů (HGF), dále i plazmatické proteiny, jako je fibrin, fibronectin a vitronectin. PRP v kombinaci s kolagenem a biokeramikou byla již použita v inženýrství kostní tkáně in vivo (CZ 307053).

40

45

Fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2) je jedním z rodiny savčích fibroblastových růstových faktorů, která se skládá z nejméně 23 členů (22 dosud identifikovaných u lidí). FGF2 je polypeptidový mitogen stimulující životaschopnost buněk, spojený s hojením ran, a také hraje roli v mitogenezi mezenchymálních buněk.

50

55

Ideální náhrada pro náhradu kůže by měla být biokompatibilní, netoxická a biodegradovatelná. Během jejího rozpadu vzniká nová tkáň, která náhradu v konečné fázi nahradí. Kromě

odpovídajícího chemického složení by měla mít náhrada podobné mechanické vlastnosti jako původní tkáň. Posledním neméně důležitým faktorem pro ideální nosič je jeho vnitřní struktura s dostatečně velkými a propojenými póry pro migraci buněk a zejména živin, včetně prorůstání cév. Umělé kožní náhrady na bázi kolagenu řídící proces hojení ran se v současné době používají v léčbě chronických kožních defektů a akutních ran. Závažným problémem je však jejich vysoká cena a rizika pocházející z infekčních komplikací.

V ČR jsou registrovány k použití dvě dvouvrstevné náhrady dermis. První z nich je Integra® (Integra LifeScience Corporation, Plainsboro, NJ, USA) obsahující lidský kolagen I + glykosaminoglykan (GAG) a silikonovou vrstvu s tloušťkou 1,3 mm. Druhou je Nevelia® (Symatase Aesthetic, Chaponost, France), která je složena z třidimenzionální porézní matrice složené z bovinního kolagenu typu I kryté silikonovou membránou. Obě tyto náhrady dermis vyžadují dvoukrokový proces, prvním krokem je samotná aplikace a druhým krokem poté odstranění silikonové membrány a krytí tenkým dermo-epidermálním štěpem (v odstupu 3 až 4 týdnů). V ČR je registrována také jednovrstevná dermální náhrada Matriderm® (MedSkin Solution Dr. Suwelack AG, Billerbeck, Německo). Jedná se o vysoce porézní materiál (velikost pórů je mezi 35 a 70  $\mu\text{m}$ ) různé tloušťky (0,5 mm, 1,0 mm a 2,0 mm). Samotná membrána obsahuje nativní (nesít'ovaný) bovinní kolagen typu I, II a V, spolu s hydrolyzátem  $\alpha$ -elastinu, který je opět bovinního původu a je získán z *ligamentum nuchae* (GfN Herstellung von Naturextrakten GmbH, Michelbach, Německo).

#### Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je náhrada kůže obsahující první vrstvu z porézní pěny tvořené kolagenem a polysacharidem v hmotnostním poměru 9:1 až 1:9, s výhodou 1:1, s velikostí pórů v rozmezí 50 až 450 mikrometrů; a druhou vrstvu tvořenou nanovláknami biokompatibilního polymeru vybraného ze skupiny chitosanu, polykaprolaktonu, kyseliny polymléčné, kyseliny polyglykolové, kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové, kopolymeru kyseliny mléčné, glykolové a polyethylenglykolu, polydioxanonu, polyanhydridů, polyhydroxybutyrátu, polyvinylalkoholu, kyseliny hyaluronové, želatiny, kolagenu, elastinu, oxidované celulózy, karboxymethylcelulózy a jejich směsí.

Polysacharidem je s výhodou chitosan, oxidovaná celulóza nebo karboxymethylcelulóza. Tyto polysacharidy jsou biokompatibilní, bioresorbovatelné a mají antibakteriální vlastnosti.

Nanovláknenná vrstva z biokompatibilních polymerů je z alespoň jednoho polymeru vybraného ze skupiny bioresorbovatelných polymerů chitosanu, polykaprolaktonu, kyseliny polymléčné, kyseliny polyglykolové, kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové, kopolymeru kyseliny mléčné, glykolové a polyethylenglykolu, polydioxanonu, polyanhydridů, polyhydroxybutyrátu, polyvinylalkoholu, kyseliny hyaluronové, želatiny, kolagenu, elastinu, oxidované celulózy, karboxymethylcelulózy a jejich směsí. Tyto polymery jsou biokompatibilní, dobře zvláknitelné, a mají dobré mechanické vlastnosti.

Nanovláknenná vrstva tvoří mukoadhezivní membránu, která zajišťuje dobrou přilnavost k epidermálnímu autoštěpu, kterým se celá náhrada při použití nakonec překryje.

Nanovláknny se standardně rozumí vlákna, jejichž průměr je v rozmezí 10 až 1000 nm. Taková nanovláknna lze připravit např. metodami elektrostatického zvláknňování.

Nanovláknenná vrstva biokompatibilního polymeru je s výhodou elastická.

S výhodou má nanovláknenná vrstva velikost pórů v rozmezí 0,5 až 10 mikrometrů.

Nanovláknenná vrstva tvoří s výhodou 0,1 až 20 hmotn. % z hmotnosti celé náhrady kůže.

5 Nanovlákná vrstva je s výhodou s porézní pěnou spojena zesítením, zejména zesítením s použitím činidel vybraných ze skupiny N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimidu hydrochloridu (EDC), N-hydroxysukcinimidu (NHS), aldehydů (glutaraldehydů, formaldehydů), kyselin (citrónové, tříselné nebo alginové), enzymů (transglutaminázy, lisyloxidázy), přírodních síťovadel (genipinu, riboflavinů), epoxidových sloučenin (glycerol diglycidyl éterů, glycerol triglycidyl éterů a ethylenglykol glycidyl éterů), tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátu a jodistanu, nebo zesítením fyzikálními vlivy (jako je teplo, záření gamma, UV nebo E-beam).

10 V porézní pěně a/nebo v nanovlákné vrstvě mohou být adsorbovány bioaktivní látky, zejména polymery/kopolymery odvozené od katecholaminů a/nebo růstový faktor. Růstový faktor může být vybrán ze skupiny zahrnující transformující růstový faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 1, 2 a 3, růstové faktory podobné inzulinu (IGF) 1 a 2, vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), fibroblastový růstový faktor (FGF) 2, 7 a 10, růstový faktor hepatocytů (HGF), růstové faktory podobné inzulinu (IGF) 1 a 2, vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) A, B, C, D a E, fibroblastový růstový faktor (FGF) 2, 7 a 10, epidermální růstový faktor (EGF), růstový faktor krevních destiček (PDGF) AA, BB, AB a CC a růstový faktor hepatocytů (HGF). Katecholaminem může být například p-3,4-dihydroxyfenylalanin nebo dopamin.

20 S výhodou je v porézní pěně a/nebo v nanovlákné vrstvě adsorbován fibroblastový růstový faktor FGF2. Tak lze využít jeho účinky pro urychlení prorůstání nativních fibroblastů a cév.

25 S výhodou je v porézní pěně a/nebo v nanovlákné vrstvě adsorbován polydopamin vzniklý polymerací dopaminu, který zajišťuje lepší mechanické vlastnosti a prokrvení novotvořené kůže.

Celková tloušťka náhrady kůže je s výhodou v rozmezí 0,5 až 4 mm.

30 Na animálním modelu Velkého bílého prasete byla potvrzena účinná funkce kožní náhrady podle předkládaného technického řešení, která urychlila hojení a regeneraci poraněné tkáně pokožky v celé tloušťce defektu kůže v jednom kroku postupu léčby. Hodnocení bylo prováděno pomocí kutometrie (elasticita kůže), imunohistochemickým barvením histologických řezů (kapilarita) a pomocí genové exprese mRNA různých prozánětlivých, protizánětlivých a pro-léčivých proteinů.

### 35 Příklady uskutečnění technického řešení

#### Příklad A – srovnávací příklad

#### 40 Polymerní pěna tvořená kolagenem a zesítená

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I. Studená (4 °C) vodná kolagenová suspenze s koncentrací 0,5 hmotn. % byla homogenizována a bubliny vzduchu byly odstředěny centrifugou. Kašovitá polymerní směs byla vylita do formy (5x5 cm), zmrazena v lyofilizátoru a postupně lyofilizována při -35 °C a tlaku pod 1 mBar (100 Pa) po dobu 15 hodin (Martin Christ Epsilon 2-10D) s následovaným sekundárním sušicím procesem při 25 °C a tlakem pod 0,01 mBar (1 Pa) až do poklesu  $\Delta p$  (aby změna tlaku byla pod 10 %). Lyofilizované porézní vzorky byly následně stabilizovány chemickým síťováním použitím činidel N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimidu hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) v poměru 2:1 a následně 2x promyty 0,1M roztokem Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> po dobu 30 minut a 1x ultračistou vodou, také po dobu 30 minut. Po síťování byly vzorky opět zmrazeny a znovu zlyofilizovány (dle výše uvedených parametrů).

## Příklad B – srovnávací příklad

## Polymerní pěna tvořená kolagenem a chitosanem a zesítěná

5 Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I za přídavku resorbovatelného polysacharidu s antibakteriálními vlastnostmi - chitosanu. Vypočítané množství chitosanu ve hmotnostním poměru 1:1 bylo pomalu přidáno ke studené (4 °C) vodné kolagenové suspenzi s koncentrací 0,5 hmotn. %. Biopolymerní směs byla homogenizována a bubliny vzduchu byly odstředěny centrifugou. Dále byl postup stejný jako v Příkladu A.

10

Připraveny byly stejným postupem i další polymerní pěny, kde byl poměr chitosanu ke kolagenu variován v rozmezí 1:9 až 9:1.

## Příklad C – srovnávací příklad

15

## Polymerní pěna tvořená kolagenem a oxidovanou celulórou a zesítěná

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I za přídavku resorbovatelného polysacharidu s antibakteriálními vlastnostmi – vápenaté soli oxidované celulózy. Příprava materiálu byla stejná jako v Příkladu B.

20

## Příklad D – srovnávací příklad

25

## Polymerní pěna tvořená kolagenem a karboxymethylcelulórou a zesítěná

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I za přídavku resorbovatelného polysacharidu – sodné soli karboxymethylcelulózy. Příprava materiálu byla stejná jako v Příkladu B.

30

## Příklad 1

## Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a nanovláčennou vrstvu

Kompozitní náhrada pro řešení kožních defektů je složená ze zesíťované lyofilizované pěny z bovinního kolagenu typu I připravené dle Příkladu A. Pěna je dále umístěna na nosnou textilií přístroje na elektrostatické zvláčňování (Nanospider, Elmarco, ČR) a je potažena amfifilními nanovláčny ze směsi želatiny, polykaprolaktonu a oxidované celulózy v hmotnostním poměru 70/30/10 (při vzdálenosti elektrody 15 mm, napětí 54 kV, proudu 3  $\mu$ A a rychlosti nosné textilie 50 mm/min) z 99% kyseliny octové jako rozpoušćedla.

40

## Příklad 2

## Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a chitosanem a nanovláčennou vrstvu

45

Kompozitní náhrada pro řešení kožních defektů je složená ze zesíťované lyofilizované pěny bovinního kolagenu typu I a chitosanu připravené dle Příkladu B. Amfifilní nanovláčna byla nanosená na připravenou pěnu postupem podle Příkladu 1.

50

## Příklad 3

## Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a oxidovanou celulórou a nanovláčennou vrstvu

Kompozitní náhrada pro řešení kožních defektů je složená ze zesíťované lyofilizované pěny bovinního kolagenu typu I a oxidované celulózy připravené dle Příkladu C. Amfifilní nanovlákná byla nanášena na připravenou pěnu postupem podle Příkladu 1.

5   Příklad 4

Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a chitosanem a nanovláknennou vrstvu

10   Kompozitní náhrada pro řešení kožních defektů je složená ze zesíťované lyofilizované pěny bovinního kolagenu typu I a chitosanu připravené dle Příkladu C. Amfifilní nanovlákná byla nanášena na připravenou pěnu postupem podle Příkladu 1.

15   Příklad 5

Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a nanovláknennou vrstvu, zesíťená

20   Kompozitní náhrada pro řešení kožních defektů je složená z lyofilizované pěny z bovinního kolagenu typu I, na kterou jsou nanášena nanovlákná a celá dvouvrstva je nakonec zesíťována pro zvýšení stability in vivo. Studená (4 °C) vodná kolagenová suspenze s koncentrací 0,5 hmotn. % byla homogenizována a bubliny vzduchu byly odstředěny centrifugou. Kašovitá polymerní směs byla vylita do formy, zmrazena v lyofilizátoru a postupně lyofilizována při -35 °C a tlaku pod 1 mBar (100 Pa) po dobu 15 hodin (Martin Christ Epsilon 2-10D) s následovaným sekundárním sušicím procesem při 25 °C a tlakem pod 0,01 mBar (1 Pa) až do poklesu  $\Delta p$  (aby změna tlaku byla pod 10 %). Na lyofilizované porézní vzorky byla nanášena amfifilní nanovlákná postupem podle Příkladu 1. Následně byla dvouvrstva stabilizována chemickým síťováním použitím činidel N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimidu hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) v poměru 2:1. Vzorky byly dále 2x promyty 0,1M roztokem Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> po dobu 30 minut a 1x ultračistou vodou, také po dobu 30 minut. Po síťování byly vzorky opět zmrazeny a znovu lyofilizovány (dle výše).

35   Příklad 6

Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a chitosanem a vrstvu nanovláken, zesíťená

40   Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I za přídavku chitosanu. Vypočítané množství chitosanu ve hmotnostním poměru 1:1 bylo pomalu přidáno ke studené (4 °C) vodné kolagenové suspenzi s koncentrací 0,5 hmotn. %. Biopolymerní směs byla homogenizována a bubliny vzduchu byly odstředěny centrifugou. Dále byly vzorky potaženy vrstvou nanovláken a zesíťeny stejně jako v Příkladu 5.

45   Připraveny byly i další náhrady obsahující polymerní pěny, kde byl poměr chitosanu ke kolagenu variován v rozmezí 1:9 až 9:1.

50   Příklad 7

Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a oxidovanou celulózu a vrstvu nanovláken, zesíťená

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I za přídavku oxidované celulózy. Vypočítané množství oxidované celulózy ve hmotnostním poměru 1:1 bylo pomalu přidáno ke studené (4 °C) vodné kolagenové suspenzi s koncentrací 0,5 hmotn. %.

Biopolymerní směs byla homogenizována a bubliny vzduchu byly odstředěny centrifugou. Dále byly vzorky potaženy vrstvou nanovláken a zesítěny stejně jako v Příkladu 5.

5 Přípraveny byly i další náhrady obsahující polymerní pěny, kde byl poměr oxidované celulózy ke kolagenu variován v rozmezí 1:9 až 9:1.

#### Příklad 8

10 Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a karboxymethylcelulózou a vrstvu nanovláken, zesítěná

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I za přídavku karboxymethylcelulózy. Vypočítané množství oxidované celulózy ve hmotnostním poměru 1:1 bylo pomalu přidáno ke studené (4 °C) vodné kolagenové suspenzi s koncentrací 0,5 hmotn. %.  
15 Biopolymerní směs byla homogenizována a bubliny vzduchu byly odstředěny centrifugou. Dále byly vzorky potaženy vrstvou nanovláken a zesítěny stejně jako v Příkladu 5.

Přípraveny byly i další náhrady obsahující polymerní pěny, kde byl poměr karboxymethylcelulózy ke kolagenu variován v rozmezí 1:9 až 9:1.

20

#### Příklad 9

25 Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a vrstvu nanovláken, zesítěná a s adsorbovaným polydopaminem

25

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I a potažena vrstvou nanovláken a následně zesítěná. Dvouvrstva byla připravena podle Příkladu 5. Následně byla dvouvrstva modifikována polydopaminem, kdy po chemickém síťování náhrady směsí EDC/NHS a posledním promytí náhrady v čisté vodě je dvouvrstva zalita roztokem hydrochloridu dopaminu (2 mg/ml) připraveným v 0,01M Tris HCl. Vzorek byl udržován v dopaminu po dobu 24 hodin. Polymerace dopamin hydrochloridu probíhala při pokojové teplotě za aerobních podmínek a vedla k černě zbarvenému polydopaminu (PDA). Následně byl vzorek 4krát vymyt destilovanou vodou, dokud nezmizel veškerý nevázaný polydopamin, který se jako černý roztok uvolňoval do promývací vody. Následně byl vzorek podruhé lyofilizován postupem dle Příkladu A.

35

#### Příklad 10

40 Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a chitosanem a vrstvu nanovláken, zesítěná a s adsorbovaným polydopaminem

40

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I a chitosanu, potažena vrstvou nanovláken a následně zesítěná stejně jako v Příkladu 6. Následně byla dvouvrstva modifikována polydopaminem postupem dle Příkladu 9.

45

#### Příklad 11

Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a oxidovanou celulózou a vrstvu nanovláken, zesítěná a s adsorbovaným polydopaminem

50

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I a oxidované celulózy, potažena vrstvou nanovláken a následně zesítěná stejně jako v Příkladu 7. Následně byla dvouvrstva modifikována polydopaminem postupem dle Příkladu 9.

## Příklad 12

Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a karboxymethylcelulózou a vrstvu nanovláken, zesítená a s adsorbovaným polydopaminem

5

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I a karboxymethylcelulózy, potažená vrstvou nanovláken a následně zesítená stejně jako v Příkladu 8. Následně byla dvouvrstva modifikována polydopaminem postupem dle Příkladu 9.

## 10 Příklad 13

Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a chitosanem a vrstvu nanovláken, zesítená a s adsorbovaným FGF2

15 Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I a chitosanu, potažená vrstvou nanovláken a následně zesítená stejně jako v Příkladu 6 s tím rozdílem, že před lyofilizací po zesítní EDC/NHS byla dvouvrstva zalita roztokem fibroblastového růstového faktoru 2 - FGF2, tak aby výsledná koncentrace FGF2 byla 0,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Následně byly vzorky opět zmrazeny a lyofilizovány.

20

## Příklad 14

Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a chitosanem a vrstvu nanovláken, zesítená a s adsorbovaným FGF2

25

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I a chitosanu, potažená vrstvou nanovláken a následně zesítená stejně jako v Příkladu 13 s tím rozdílem, že koncentrace roztoku fibroblastového růstového faktoru 2 - FGF2 byla 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Následně byly vzorky opět zmrazeny a lyofilizovány.

30

## Příklad 15

Dvouvrstvá náhrada obsahující vrstvu polymerní pěny tvořené kolagenem a chitosanem a vrstvu nanovláken, zesítená a s adsorbovaným FGF2

35

Polymerní pěna je založena na lyofilizované suspenzi bovinního kolagenu typu I a chitosanu, potažená vrstvou nanovláken a následně zesítená stejně jako v Příkladu 13 s tím rozdílem, že koncentrace roztoku fibroblastového růstového faktoru 2 - FGF2 byla 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Následně byly vzorky opět zmrazeny a lyofilizovány.

40

## Příklad 16

Jednovrstvé náhrady připravené ve srovnávacích příkladech A až D, a dvouvrstvé náhrady připravené v příkladech 1 až 8, 10 byly podrobeny dynamické mechanické analýze pro testování maximální pevnosti a prodloužení v suchém i hydratovaném stavu.

45

Měření bylo provedeno v jednoosém deformačním testu. Vzorky byly nařezány na proužky o délce 40 mm a šířce 10 mm. Tloušťka byla různá podle typu vzorku (0,5 až 1,5 mm). Vzorky byly upevněny do držáku ve střední poloze. Vzdálenost mezi dvěma konci držáků byla nastavena na 10 mm. První mechanické testování bylo provedeno při teplotě místnosti 23 °C a druhé testování v hydratovaném stavu v ultračisté vodě při teplotě 37 °C ve vestavěné komoře obklopující držáky. Vztah mezi napětím a tlakem byl znázorněn tahovými křivkami, ve kterých byla zaznamenána maximální prodloužení při mezní pevnosti v tahu. Měření byla provedena na dynamickém mechanickém analyzátoru RSA-G2 (TA Instruments Inc., USA).

55



Tab. 1: Provnání výsledků mechanických vlastností: vliv nanovláken - jednovrstva vs. dvojevrstva.

Označení příkladu	Maximální pevnost	Maximální pevnost	Prodloužení	Prodloužení
	suchý stav (kPa)	mokrý stav (kPa)	suchý stav (%)	mokrý stav (%)
Příklad A	88	27	3,2	7,7
Příklad B	46	8	7,8	12,4
Příklad C	187	9	4,2	9,9
Příklad D	33	2	9,4	17,9
Příklad 1	100	20	3,1	12,5
Příklad 2	56	15	8,1	21,9
Příklad 3	220	7	2,1	17,9
Příklad 4	40	3	10,9	29,9
Příklad 5	120	30	5,1	9,9
Příklad 6	61	14	6,4	37,8
Příklad 7	260	9	3,3	9,1
Příklad 8	340	15	8,4	22,4
Příklad 10	160	36		

Z Tab. 1 je patrné, že nanosení vrstvy nanovláken zvyšuje maximální pevnost náhrady především v suchém stavu a tím zlepšuje manipulovatelnost náhrady. Nanovlákná také zvyšují prodloužení (elasticitu) náhrady především v mokřém stavu, která je takto použitelná právě pro náhradu kůže.

#### Příklad 17

- 10 Jednovrstvé náhrady připravené ve srovnávacích příkladech A až D, a dvojevrstvé náhrady připravené v příkladech 1 až 8 byly podrobeny měření velikosti pórů (vrstvy pěny i vrstvy nanovláken) pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM).

15 Morfologie náhrad byla zkoumána pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM, Tescan MIRA3, Česká republika). Všechna pozorování byla prováděna v režimu emise sekundárních elektronů s vysokým napětím 10 kV. Pro lepší rozlišení byly vzorky potaženy 20nm vrstvou zlata. Velikost pórů připravených materiálů byla vypočítána ze snímků SEM pomocí softwaru ImageJ. Póry byly hodnoceny z 5-ti různých SEM obrázků každého vzorku se zorným polem 1,5 mm. Průměrná velikost pórů byla vypočítána pomocí 150 naměřených hodnot ze snímků SEM.

20 Tloušťka dvojevrstvy byla měřena mikrometrem.

Tab. 2: Provnání výsledků velikosti pórů a tloušťky náhrad: vliv nanovláken - jednovrstva vs. dvojevrstva.

25

Označení příkladu	SEM (pěny)	SEM (nanovlákná)	Tloušťka dvojevrstvy
	velikost pórů ( $\mu\text{m}$ )	velikost pórů ( $\mu\text{m}$ )	(mm)
Příklad A	258		1,2
Příklad B	200		2,0
Příklad C	150		0,5
Příklad D	379		2,4

Příklad 1	243	2,32	1,4
Příklad 2	297	4,11	2,2
Příklad 3	224	5,23	0,7
Příklad 4	361	2,96	2,5
Příklad 5	227	3,05	1
Příklad 6	215	0,95	1,4
Příklad 7	182	2,68	0,4
Příklad 8	292	3,87	2,4
Příklad 10	265	0,98	0,7

Z Tab. 2 je patrné, že nanovlákněné dvouvrstvy mají na povrchu velmi malou velikost pórů v řádu jednotek mikrometrů. Tímto je zajištěna neprůchodnost jak pro bakterie, tak i pro fibroblasty, aby se nedostaly z dermis do horní vrstvy epidermis. Všechny vzorky mají propojené póry ve spodní pěnové vrstvě, jejichž velikost je v rozmezí od 150 až 400 mikrometrů, což zajišťuje správný přísun živin skrz dvouvrstvu a také vhodnou velikost pórů pro adhezi a proliferaci fibroblastů. Celková tloušťka dvouvrstvy byla v rozmezí 0,4 až 2,5 mm. Nanovlákněná v příkladech 1 až 4 zvyšují průměrně tloušťku náhrady o cca 0,2 mm (pouze o nanosená nanovlákněná), kdežto u materiálů podle příkladů 5 až 8 se oproti jednovrstevnému materiálu celková tloušťka o cca 0,2 až 0,3 mm snížila po celkovém zesílení obou vrstev dohromady, kdy dochází ke smrštění vrstev.

#### Příklad 18

Pro některé vzorky byla na animálním modelu sledována kapilarita, tj. plošná hustota cévek (%), po implantaci do místa defektu kůže.

Kožní náhrada byla sterilizována ethylenoxidem a skladována v exikátoru do doby, než byla chirurgicky implantována do místa defektu kůže na animálním modelu Velkého bílého prasete. Po třech měsících hojení byla v narkóze z místa kožních defektů prasete odebrána tkáň pro histologické zpracování a analýzy. Tkáň byla fixovaná v 4% roztoku formaldehydu a byla standardně zpracována na formol-parafinové bloky. Z bloků byly zhotoveny 4 mikrometry silné tkáňové řezy, které byly barveny hematoxylinem-eosinem a imunohistochemicky na průkaz hladkosvalového aktinu (SMA – smooth muscle actin), který je exprimován ve stěně kapilár. Řezy byly následně morfologicky vyhodnocovány na úrovni optické mikroskopie. Byla posuzována přítomnost defektu, granulační tkáň, vaziva, zánětlivé celulizace, cizorodých těles a přítomnost obrovských mnohojaderných makrofágů. Imunohistochemické barvení na hladkosvalový aktin umožnilo vyhodnocení přítomnosti a počtu novotvořených krevních kapilár pomocí analýzy obrazu. Výsledkem je plošná hustota cévek vyjádřená v % z povrchu v histologickém snímku barveného SMA.

Z výsledků je patrné, že nanovlákněná vrstva zajišťuje lepší kapilaritu (vyšší plošnou hustotu kapilár) novotvořené kůže o zhruba 1,5 až 3 x.

Tab. 3: Kapilarita (počet cévek) v histologickém vzorku po 3 měsících hojení.

Označení příkladu	Kapilarita
	plošná hustota cévek (%)
Příklad A	1,8
Příklad B	3,5
Příklad C	3,7
Příklad 1	5,5

Příklad 2	6,5
Příklad 3	5,5
Příklad 6	6,5
Příklad 10	6,9
Příklad 13	9,6
Příklad 14	11,5
Příklad 15	14,7

## Příklad 19

5 Pro některé vzorky byla na animálním modelu sledována genová exprese mRNA a bylo provedeno hodnocení jizvy podle Yeonga.

Vzorky kůže (každý přibližně 10 mg) odebrané v narkóze prasete v 6. měsíci hojení z ošetřených defektů byly nakrájené na plátky o tloušťce menší než 0,5 cm a po operaci umístěny přímo do stabilizačního roztoku RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Německo) a skladovány při -70 °C až do izolace RNA. Před izolací RNA byly kožní tkáně homogenizovány v 1 ml TRI Reagent RT (Molecular Research Center, Inc., USA) s 10 kuličkami Zirconia/Silica o průměru 2,3 mm (BioSpec Products, Inc., USA) pomocí přístroje MagNA Lyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Fáze RNA byla získána po oddělení s použitím 4-bromanisolu, po kterém následoval purifikační postup s použitím sady RNeasy Kit (Qiagen, Tübingen, Německo). V posledním kroku byla získána celková RNA do 15 ul vody prosté RNáz. RNA byla reverzně transkribována reverzní transkriptázou M-MLV (200 U/μl, Invitrogen) a primerem oligo (dT) RT (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika) při teplotě 37 °C po dobu 1,5 hodiny. cDNA byla až do použití skladována při -20 °C. qPCR byla provedena v triplicátech na přístroji LightCycler 480 (Roche Applied Science, Penzberg, Německo). V qPCR byly použity primery specifické pro 9 sledovaných genů (GOI) chemokínů a cytokínů a 3 house-keepingové geny jako kandidátní referenční geny (REF) (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika, tabulka 2). Ze tří house-keepingových genů byl pomocí programu NormFinder vybrán jako referenční gen hydroxymethylbilan syntáza (HMBS) s minimální variabilitou genové exprese mezi všemi testovanými vzorky. HMBS také sloužil jako pozitivní interní kontrola qPCR. Na základě hodnot kvantifikačního cyklu C<sub>q</sub> stanoveného v qPCR pro geny GOI a REF (k normalizaci dat) byl s pomocí vzorce  $[1/(2^{C_{qGOI}})]/[1/(2^{C_{qREF}})]$  proveden výpočet genové exprese. Specifita amplikonů byla potvrzena pomocí testu teploty tání (program LightCycler 480 1.5.1.62, Roche Life Science).

30 V Tab. 4 jsou uvedeny hodnoty genové exprese mRNA proteinu VEGF (Vascular endothelial growth factor), jehož přítomnost zajišťuje lepší prokrvení a vaskularizaci novotvořené kůže (stimuluje tvorbu krevních cév). Čím je tato hodnota vyšší, tím vyšší je prokrvení novotvořené kůže. Superioritní jsou hodnoty nad 1, které byly zaznamenány u obou testovaných vzorků dvouvrstev s nanovláknem oproti velmi nízkým hodnotám pro-hojivého faktoru VEGF získaného u jednovrstevných materiálů.

35

## Hodnocení jizvy dle Yeonga

Yeongova škála je stupnice vyvinutá k hodnocení jizev, respektive obrazové dokumentace jizev. Zahrnuje hodnocení jednotlivých vlastností jizvy a vzhledu jizvy. Hodnoceny jsou čtyři vlastnosti jizvy, tj. soulad barvy jizvy, vzhled povrchu jizvy, výška (prominence jizvy), tloušťka jizvy u každé fotografie jizvy. Každá vlastnost je hodnocena známkami -1 až 4, přičemž -1 znamená nejlepší výsledek, 4 znamená nejhorší výsledek. Rozmezí celkových hodnot je tedy -4 až 16, čím je výsledná hodnota nižší (blíže 0), tím je kvalita jizvy lepší. Z výsledků je patrné, že nanovláknem především u materiálu kol/chit zlepšila kvalitu jizvy oproti jednovrstevnému materiálu.

45

Tab. 4: Výsledky genové exprese mRNA (faktoru VEGF) a hodnocení hojení jizvy dle Yeonga po 6 měsících hojení.

Označení příkladu	mRNA	Hojení/Yeong
Příklad A	0,23	2,7
Příklad B	0,69	4,8
Příklad 1	1,07	2,8
Příklad 2	1,11	4,2
Příklad 6	1,11	4,8
Příklad 13	1,66	5,3
Příklad 14	1,34	4,0
Příklad 15	1,77	4,6

5 Příklad 20

Pro dvouvrstvé náhrady podle příkladů 6 a 10 bylo provedeno hodnocení elasticity jizvy kutometrií a hodnocení hojení jizvy dle VAS.

10 Hodnocení elasticity jizvy kutometrií

Pro účely objektivizace visko-elastických vlastností vzniklých jizevnatých formací se celosvětově používá zejména kutometrie. Pro tyto účely jsme použili přístroj Cutometer® MPA 580 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Cologne, Německo). Během měření dochází k periodickému nasávání (sukční část neboli on-time fáze) trvání a relaxaci (off-time fáze) sledované oblasti do otvoru o velikosti 2 mm ve speciální sondě. Obě fáze byly konstantní z pohledu času (trvaly 2,0 vteřiny) a pravidelně se opakovaly ve třech měřeních. Velikost podtlaku vyvíjeného přístrojem byla nastavena na 450 mbar (45 000 Pa).

20 Hodnotí se několik důležitých parametrů (faktoriálů), které reprezentují jednotlivé vlastnosti kůže (konečná deformace, redeformace, viskózní deformace, biologická elasticita, tuhost apod.). Pro naše účely jsme vybraly jeden z nejdůležitějších parametrů – R0. Tento parametr reprezentuje tzv. konečnou deformaci, tedy první maximální amplitudu v rámci sukční části kutometrického cyklu (čím je vyšší hodnota, tím je kůže poddajnější, elastičtější, tedy se lépe deformuje).

25

Pro kožní náhradu podle Příkladu 6 byla zjištěna hodnota 0,012;

pro náhradu podle Příkladu 10 (modifikovanou dopaminem) byla zjištěna hodnota 0,020.

30 Pro náhrady modifikované různými koncentracemi FGF2 byly zjištěny následující hodnoty:

náhrada podle Příkladu 13: 0,017;

náhrada podle Příkladu 14: 0,015;

35

náhrada podle Příkladu 15: 0,019.

Hodnocení hojení jizvy dle VAS

40 VAS škála slouží k obrazovému hodnocení jizvy. Hodnoceny jsou vaskularita jizvy, pigmentace jizvy, kontura jizvy a individuální pocit pozorovatele (hodnotitele). Celkový počet bodů je od 0 bodů do 100 bodů za každou vlastnost. Hodnocen je i celkový součet individuálních skóre. Čím nižší je celkový počet bodů (čím se blíží více 0), tím je kvalita jizvy lepší.

Pro kožní náhradu podle Příkladu 6 byla zjištěna hodnota 104,71;

pro náhradu podle Příkladu 10 byla zjištěna hodnota 98,6.

5

Pro náhrady modifikované různými koncentracemi FGF2 byly zjištěny následující hodnoty: náhrada podle Příkladu 13: 75,5;

náhrada podle Příkladu 14: 91,82;

10

náhrada podle Příkladu 15: 95,3.

Z výsledků všech testů je patrné, že modifikace polydopaminem (náhrada podle Příkladu 10 ve srovnání s náhradou podle Příkladu 6) zlepší celkovou pevnost náhrady v suchém i mokřém stavu a částečně zvýší velikost pórů pěny (u nanovláken je hodnota srovnatelná). Polydopamin zřejmě také síťuje celkovou dvouvrstvu, proto je její tloušťka téměř poloviční oproti původní jednovrstvě. Mírně zvýšená je kapilarita a výrazně pak kutometrie – elasticita kůže. Celková hodnota hodnocení kvality jizvy dle VAS je lepší u vzorku s polydopaminem.

15

Dále je z výsledků všech testů viditelné, že přídavek FGF2 výrazně podpořil kapilaritu (prokrvení) novotvořené kůže, jejíž hodnota stoupala s koncentrací FGF2. Výrazně lepší byly naměřeny i hodnoty kutometrie (elasticity jizvy) s nejlepší hodnotou pro použití FGF2 o koncentraci 10 µg/ml. Výrazně lepší byly i hodnoty pro-hojivého proteinu VEGF pro vzorky s FGF2 včetně hodnocení kvality hojení jizvy dle VAS v 6. měsíci hojení.

20

25

#### Průmyslová využitelnost

Technické řešení se týká porézní, plně vstřebatelné náhrady pro akcelerovanou regeneraci kůže. Náhrada kůže podle technického řešení je určena pro klinické použití v popáleninové a plastické chirurgii pro vyplnění defektu kůže např. po popálení, úrazu nebo extrakci nádoru.

30

## NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Náhrada kůže obsahující první vrstvu z porézní pěny tvořené kolagenem a polysacharidem v hmotnostním poměru 9:1 až 1:9, s velikostí pórů v rozmezí 50 až 450 mikrometrů, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje druhou vrstvu tvořenou nanovláknny polymeru vybraného ze skupiny polymerů chitosanu, polykaprolaktonu, kyseliny polymléčné, kyseliny polyglykolové, kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové, kopolymeru kyseliny mléčné, glykolové a polyethylenglykolu, polydioxanonu, polyanhydridů, polyhydroxybutyrátu, kyseliny 10 hyaluronové, želatiny, kolagenu, elastinu, oxidované celulózy, karboxymethylcelulózy a jejich směsí.
- 15 2. Náhrada kůže podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že polysacharidem je chitosan, oxidovaná celulóza a/nebo karboxymethylcelulóza.
3. Náhrada kůže podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že druhá vrstva tvořená nanovláknny má velikost pórů v rozmezí 0,5 až 10 mikrometrů.
- 20 4. Náhrada kůže podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že druhá vrstva tvořená nanovláknny tvoří 0,1 až 20 hmotn. % z hmotnosti celé náhrady kůže.
5. Náhrada kůže podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že druhá vrstva tvořená nanovláknny je s porézní pěnou spojena chemickým zesítním.
- 25 6. Náhrada kůže podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že v první a/nebo druhé vrstvě je adsorbována alespoň jedna bioaktivní látka vybraná ze skupiny zahrnující polymery/kopolymery katecholaminů a růstové faktory.
- 30 7. Náhrada kůže podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že růstový faktor je vybrán ze skupiny zahrnující transformující růstový faktor- $\beta$  1, 2 a 3, růstové faktory podobné inzulinu 1 a 2, vaskulární endoteliální růstový faktor A, B, C, D a E, fibroblastový růstový faktor 2, 7 a 10, epidermální růstový faktor, růstový faktor krevních destiček AA, BB, AB a CC a růstový faktor hepatocytů.
- 35 8. Náhrada kůže podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že katecholaminem je 3,4-dihydroxyfenylalanin a/nebo dopamin.
9. Náhrada kůže podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že bioaktivní látkou je fibroblastový 40 růstový faktor 2 a/nebo polydopamin.
10. Náhrada kůže podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že celková tloušťka náhrady kůže je v rozmezí 0,5 až 4 mm.