

Vývoj dvouvrstvého vláknenného tkáňového nosiče pro zpevnění střevních anastomóz

Markéta Klíčová <marketa.klicova@tul.cz>, RNDr. Jana Horáková, PhD.

Netěsnost střevních anastomóz vede k seriózním pooperačním komplikacím. Překrytí chirurgické anastomózy dvouvrstvým vláknenným materiálem představuje zcela inovativní způsob, jak zabránit prosakování střevního obsahu skrz anastomózu a usnadnit hojení. Předpokládá se, že hydrofilní strana přilne k anastomóze, a naopak hydrofóbní strana materiálu vytvoří kontakt s okolním prostředím a zabrání srůstům hladkých tkání v dutině břišní. Tato práce představuje kompozitní materiál, který by potencionálně mohl sloužit pro tento účel. Dvouvrstvý materiál obsahuje hydrofilní ultrajemná nanovláknna kyseliny hyaluronové (HA) a hydrofóbní vlákna poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL). Vlákna HA byla rovněž ošetřena methanovým plazmatem, což vedlo ke zvýšení hydrofobicity vláken HA při zachování cytokompatibility.

Klíčová slova: nanovláknna, tkáňové inženýrství, elektrostatické zvláknňování, střevní anastomóza, plazmatická modifikace

Úvod

Kolorektální karcinom je jedno z nejčastěji se vyskytujících nádorových onemocnění na světě. Česká republika se navíc řadí mezi země s nejvyšší incidencí. Toto maligní nádorové onemocnění vyžaduje komplexní léčbu. Chirurgická část léčby spočívá v odstranění postižené části střeva s nádorem. Po resekční fázi následuje fáze rekonstrukční, při které dojde k umělému spojení konců ponechané trávicí trubice – tedy k vytvoření tzv. gastrointestinální anastomózy (GI). Byť je tento zákrok častou operací v dutině břišní, procento pooperačních komplikací anastomóz je stále velké. Život ohrožující komplikací je netěsnost GI, která vede k leaku (úniku) obsahu střev do dutiny břišní. Tato komplikace nastává v 3% až 19% případů. Navíc je obtížné anastomotický leak včasné detekovat a proto je stále větší tlak vyvíjen na prevenci.

Byla zveřejněna studie od autora T. Nordentoft, věnující se vláknenné kolagenové náplasti, která sloužila jako matrice pro fibrinové lepidlo. Tento produkt je známý pod obchodním názvem TachoSil®. Studie ukázala, že uzavírání GI pomocí TachoSil® je bezpečné, nicméně efekt léčení a zabránění komplikací nebyl pozorován [1]. Pro snížení krvácení a redukci anastomotického leaku po použití staplerů existuje na trhu produkt s názvem Gore® Seamguard®. Tento syntetický porézní materiál je vyroben z PGA a trimethyl-karbonátu.

V klinických testech byla testována pouze fibrinová lepidla a Gore® Seamguard®, v největších randomizovaných studiích se však neprokázal pokles v incidenci anastomotického leaku [2]. Nanovláknenné materiály se v klinické praxi zatím nevyužívají.

Dvouvrstvý vláknenný materiál, vyvíjen v rámci této diplomové práce, je zcela novou slibnou možností a v budoucnu by mohl sloužit nejen jako prevence anastomotického leaku ale i jako podpora hojení GI.

Metodika

Dvouvrstvý materiál HA/PCL byl vyroben bezjehlovým elektrostatickým zvláknňováním metodou Nanospider™, která umožňuje průmyslovou výrobu vrstev. Plazmatická modifikace byla provedena studeným methanovým plazmatem, metodou RF PACVD (Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition). Materiál byl otestován klasickými *in vitro* testy.

Výsledky a diskuze

Kyselina hyaluronová se těší rostoucí oblíbenosti v tkáňovém inženýrství [3]. Byla provedena řada *in vitro*, *in vivo*, i klinických studií v oblasti aplikace HA pro léčení ran. Poly- ϵ -kaprolakton se hojně využívá v tkáňovém inženýrství pro svou dostupnost a možnosti úprav jeho vlastností.

Navíc byly vydány studie, které využívají PCL pro tkáňové inženýrství gastrointestinálního traktu [4].

V této práci byly nalezeny podmínky, při kterých lze zvláknit vodné roztoky vysokomolekulární (1,4 MDa) HA bez chemických aditiv a při relativně vysokých okolních vlhkostech (41%). Ukázalo se ale, že zvláknění roztoků HA není tak produktivní, jako zvláknění PCL roztoků, a proto nebyla vytvořena homogenní dvouvrstvá. Vrstva ultrajemných HA nanovláken plně nepřekrývala PCL vrstvu a tím bylo ovlivněno i měření kontaktního úhlu, který dosahuje hodnoty $(46,59 \pm 15,19)^\circ$.

V budoucí aplikaci je zamýšleno dvouvrstvou přiložit hydrofilní stranou na čerstvě vytvořenou gastrointestinální anastomózu. Avšak hydrofilní vlákna HA se okamžitě po kontaktu s tkání rozpustí. Běžné techniky síťování nejsou zcela vhodné pro biomedicínské aplikace a všeobecně síťování při zachování biokompatibility je velice obtížné. V této práci proto bylo přistoupeno k ošetření hydrofilní strany dvouvrstevných materiálů studeným methanovým plazmatem. Předpokládalo se, že dojde k navázání uhlíkových funkčních skupin na povrch vláken a tím se sníží rozpustnost.

V dostupných zdrojích nebyly nalezeny žádné publikace, které by se věnovaly zvýšení hydrofobicity vláken HA pomocí plazmatických procesů. V této práci byla úspěšně navýšena hydrofobicita HA vrstvy. Dle snímků z elektronové mikroskopie došlo k vytvoření strukturovanějších nanovláken, což rovněž způsobilo zvýšení průměrů vláken. Stejný výsledek potvrzuje i měření kontaktního úhlu, který dosahuje nad 100° a modifikovanou vrstvu HA lze tak označit jako hydrofóbní materiál. Spektra FTIR neukázaly žádnou změnu v chemické struktuře HA. Ultrajemná síť HA vláken zůstala zachována i po týdenním *in vitro* testování s myšimi 3T3 fibroblasty a HA strana materiálu podporovala buněčnou adhezi a proliferaci. Ukázalo se tak, že plazmatická úprava HA nanovláken má dobrý potenciál pro zvýšení hydrofobicity HA vrstvy při zachování cytokompatibility.

Závěr

V rámci této práce byl vyroben dvouvrstvý vlákněný tkáňový nosič, který bude sloužit pro překrytí střevních anastomóz a tak zabránění pooperačních komplikací. V rámci práce se podařilo nalézt podmínky pro elektrostatické zvláknění čistých vodných roztoků vysokomolekulární HA (1,4 MDa) na NanospiderTM bez nutnosti klimatizační jednotky pro snížení okolní vlhkosti. Dle *in vitro* testů byl prokázán potenciál plazmatické modifikace nanovláken HA, jelikož

modifikovaná struktura podporovala buněčnou adhezi a proliferaci fibroblastů. V budoucnu bude materiál otestován biologickými *in vivo* testy. Spolupráce byla navázána s Biomedicínským centrem v Plzni, kde již byly provedeny prvotní operace s jednovrstevnými materiály pro vytvoření metodiky operací a pro budoucí porovnání s dvouvrstevnými. V rámci operací provedených na tenkém střevě prasat se ukázalo, že manipulace s vlákněnými materiály při chirurgickém zákroku je jednoduchá, není potřeba žádné další speciální vybavení a překrytí střevní anastomózy je časově nenáročné. Materiály proto mají dobrý potenciál pro tuto aplikaci a v této práci bylo provedeno několik kroků pro jejich úspěšnou výrobu.

Poděkování

Tato práce byla podpořena z projektu Studentské grantové soutěže (SGS) na Technické univerzitě v Liberci v roce 2018.

Reference

- [1] NORDENTOFT, Tyge, 2015. Sealing of gastrointestinal anastomoses with fibrin glue coated collagen patch. *Danish Medical Journal*. **62**(5). ISSN 2245-1919.
- [2] BOERSEMA, Geesien S. A., Sandra VENNIX, Zhouqiao WU, Maaïke TE LINTEL HEKKERT, Dirk-Jan G. M. DUNCKER, King H. LAM, Anand G. MENON, Gert-Jan KLEINRENSINK a Johan F. LANGE, 2017. Reinforcement of the colon anastomosis with cyanoacrylate glue: a porcine model. *The Journal of Surgical Research* [online]. 217, 84–91. ISSN 1095-8673. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2017.05.001
- [3] HUSSAIN, Zahid, Hnin Ei THU, Haliza KATAS a Syed Nasir Abbas BUKHARI, 2017. Hyaluronic Acid-Based Biomaterials: A Versatile and Smart Approach to Tissue Regeneration and Treating Traumatic, Surgical, and Chronic Wounds. *Polymer Reviews* [online]. 57(4), 594–630. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583724.2017.1315433
- [4] KNIGHT, Toyin, Joydeep BASU, Elias A. RIVERA, Thomas SPENCER, Deepak JAIN a Richard PAYNE, 2013. Fabrication of a multi-layer three-dimensional scaffold with controlled porous micro-architecture for application in small intestine tissue engineering. *Cell Adhesion & Migration* [online]. **7**(3), 267–274. ISSN 1933-6918. Dostupné z: doi:10.4161/cam.24351