

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

**Expres a aktivace metaloproteináz v extracelulární
matrix v modelu kožní experimentální rány
u potkana**

The expression and activation of matrix
metalloproteinases in a model of skin experimental
wounds in rat

Student:
Vedoucí:

Zuzana Prosková
Doc.RNDr.Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové 2008

Abstrakt

Hojení je složitý fyziologický proces, při kterém dochází k obnově porušené funkce a struktury kůže. Délka a kvalita hojení závisí jak na vnějších (nekrotická tkáň, snížené pH rány, infekce) tak na vnitřních faktorech (cytokiny, růstové faktory, MMPs). Metaloproteinázy matrix (MMPs) je skupina s podobnou strukturou (proteázy závislé na zinku), které byly objeveny ve spojitosti se schopností degradovat proteiny extracelulární matrix jako jsou kolagen a elastin. MMPs, které se podílejí na procesu hojení jsou kolagenázy (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelysiny (MMP-3, MMP-11), gelatináza A (MMP-2) a gelatináza B (MMP-9). Jejich inhibice pak vede ke zkvalitnění a zrychlení hojení. Jsou součástí tzv. Moderní terapie. V této práci je imunohistologicky prokázána exprese MMP-2 během zánětlivé fáze. Zároveň zde sledujeme vliv MDOCTM na akutní ránu. MDOCTM je Mikro Dispergovaná Oxidovaná Celulóza, která urychluje zástavu krvácení. Histologické výsledky dokázaly, že ve srovnání s kontrolním vzorkem je dozrávání nové tkáně s použitím MDOCTM rychlejší. Zánět vzniká rychleji, ale na druhé straně dříve odeznívá. Při porovnání různých lékových forem MDOCTM nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v účinku a rychlosti hojení či kvalitě nové tkáně. Stejně tomu bylo při obměně chemického složení lékové formy.

Abstract

Healing is a complicated physiological process where happen to restituion of damaged function and the structure of the skin. The length and the quality of healing depends on both external (necrotic tissue, lowered pH of wound, infection) and internal factors (cytokins, growth factors, MMPs). Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of similar structure (zinc-dependent proteases) discovered in connection to their capacity of retrace extracellular matrix proteins such as collagen and elastin. MMPs which concerned in the process of healing are collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelysins (MMP-3, MMP-11), gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9). Their inhibition leads to uprate and speed of healing up. They are the part of a „Modern therapy“. Expression of MMP-2 during inflammation period is demonstrated by imunohistochemistry in this work. Simultaneously we observe here a influence of MDOC™ to an acute wound. MDOC™ is Micro-dispersed Oxidised Cellulose who speed the stopbleeding up. The histological results demonstrated in compare with control sample that maturation of new tissue goes more quickly with using the MDOC™. The inflammation uprise more quickly but on the other side goes earlier off. In comparison of varied drug forms of MDOC™ were not observe significant differences in effect and speed of healing or in the quality of new tissue. The same results were with changes of chemical composition of drug forms.

Prohlášení studenta

Prohlašuji, že jsem celou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce Doc. RNDr. Vladimíra Semeckého, CSc. a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Hradci Králové

.....*Poskova*.....

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mi pomáhali při sepsání této práce. Panu Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za trpělivost a cenné rady, slečně Mgr. Gábině Jamborové, paní Pavlíně Jabůrkové za pomoc při laboratorním zpracování. A v neposlední řadě paní primářce MUDr. Evě Jaškové za možnou spolupráci s jejím oddělením ve Slezské nemocnici v Opavě.

OBSAH

1. Úvod diplomové práce.....	1
2. Cíl diplomové práce.....	2
3. Seznam použitých zkratk.....	3
4. Rána.....	4
4.1. Dělení ran.....	4
4.2. Struktura a funkce kůže.....	7
5. Hojení ran.....	8
5.1. Fáze hojení a její ovlivnění.....	9
5.2. Ošetřování ran.....	19
5.3. Krycí materiály.....	20
5.4. Chirurgické ošetřování ran.....	25
5.5. Oplachy a laváže.....	25
6. Etracelulární matrix.....	26
7. Metaloproteinázy matrix(MMPs).....	32
7.1. Struktura.....	33
7.2. Klasifikace.....	37
7.3. Funkce a aktivace.....	41
7.4. Inhibitory (TIMPs).....	44
7.5. Desintegrin a metaloproteinázy (ADAMs).....	45
7.6. Další matrix-asociované proteiny.....	46
8. Experimentální část.....	47
8.1. Použitý zvířecí model.....	47
8.2. Metodika práce.....	48
8.3. Aplikovaný materiál.....	50
8.4. Makroskopické a histologické hodnocení.....	52
8.5. Imunohistochemie.....	58
8.6. Aplikace Hyoidine.....	60
9. Diskuse.....	62
10. Závěr.....	64
11. Literatura.....	65

1. Úvod diplomové práce

Pokud se někoho zeptáte, co si představí pod pojmem RÁNA, často Vám odpoví BOLEST. Bolest je ovšem jen projevem toho, že se něco děje. Jako taková je bolest ve většině případů nejsnadněji ovlivnitelná, zvládnutelná a rychle pomíjívá.

Rána je plochou, která se přímo podílí na ztrátách bílkovin, tekutin a mikronutrientů. Hojení je pak chápáno jako složitý fyziologický proces, při kterém dochází k obnově porušené funkce a struktury kůže.

Zkušenosti spojené s hojením rány si lidstvo předává ústní i psanou formou již několik tisíc let. Každé lidské společenství mělo svého léčitele, šamana či lékaře. Osoby se znalostmi účinků rostlin, zvířecích tkání a minerálů na lidský organismus. Již v Ebersově papyru vytvořeném ve Starém Egyptě roku 1550 př. n. l. jsou detailně popisovány nemoci, poranění a jejich léčení. Dále jmenujme např. Auluse Cornelia Celsa (53 př. n. l. – 7 n. l.), který se zamýšlel nad klinickými známkami infekce. Z jeho sledování vycházejí klasické lokální Celsiovy znaky zánětu: rubor – zarudnutí, calor – zvýšená kožní teplota, tumor – otok, dolor – bolest a functio laesa.

Dnes je fyziologie hojení studována na molekulárně biologické úrovni. Jsou poznávány složité regulační mechanismy, vztahy mezi jednotlivými buňkami a růstovými faktory. Základem hojení je tvorba krevní sraženiny, aktivace zánětlivých buněk, epitelizace rány, tvorba granulační tkáně, fibrotizace a jizva. Všechny tyto procesy můžeme rozdělit do tří vzájemně se prolínajících fází – zánětlivé, proliferační a remodelační. V praxi je při hojení využívá léčba farmakologická v kombinaci se sekundárním krytím nebo moderními ošetrovacími materiály tzv. “vlhká terapie”.

Stejně jako my se dále vyvíjí také poznatky o ráně a hojení. Jsou a i nadále budou objevovány nové metody a celý proces hojení se bude zkracovat a následky minimalizovat.

2. Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce je sledovat funkční a dynamický stav rány se zaměřením na metaloproteinázy extracelulární matrix. Budeme se zabývat zejména experimentální ránou potkana (máme na mysli ránu akutní).

V teoretické části si podrobněji popíšeme jednotlivé fáze hojení. Zvláště si všimneme důležitosti proliferace, která vede ke kvalitativním změnám tkáně. V posledních letech se stále více studií zabývá proteiny extracelulární matrix, tzv. metaloproteinázami. Nás budou v této práci zajímat zejména metaloproteinázy zapojené do procesu hojení. Jde především o kolagenázy (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelyziny (MMP-3, MMP-11), gelatinázu A (MMP-2) a gelatinázu B (MMP-9). Kromě samotné klasifikace metaloproteináz si ukážeme i způsob, jakým se zapojují do jednotlivých fází hojení. Zmíníme se o vnějších a vnitřních faktorech, které významně ovlivňují hojivý proces. A uvedeme si i současné trendy v hojení.

V praktické části se budeme věnovat hojení na základě histologického obrazu. Pomocí fotodokumentace z průběhu experimentů a výsledků jednotlivých „měření“ provedeme porovnání hojivého procesu u potkanů bez a s aplikací MDOCTM. Dále se také budeme zabývat skutečností, zda jednotlivé lékové formy MDOCTM či jejich chemické složení nějakým způsobem ovlivní hojivý proces. Pomocí imunohistochemické metody se budeme snažit dokázat expresi MMP-2 v zánětlivé fázi akutní rány potkana.

Budou zde zařazeny také dvě kazuistiky s lokální aplikací přípravku Hyoidine (gel) na ránu chronickou. A to i přes rozdílný průběh hojení rány akutní a rány chronické. Důvodem je pouze bližší seznámení se s experimentální aplikací lokálních přípravků v ambulantní praxi. Hluběji se studiem chronických ran budeme zabývat v práci, která bude zpracována v nejbližší době.

3. Seznam použitých zkratk

AMK	aminokyseliny
DAB	diaminobenzidin
ECM	extracelulární matrix
FGF	fibroblastový růstový faktor
GAGs	glykosaminoglykany
HA	kyselina hyaluronová
HS	heparansulfát
HSPG	heparansulfát proteoglykan
H&E	hematoxylin-eozin
IL	interleukíny
MDOC™	Mikro Dispergovaná Oxidovaná Celulosa
MMPs	metaloproteinázy matrix
MT-MMPs	membránu poutající metaloptorinázy matrix
PAGA	polyanhydroglukuronová kyselina
PAI's	inhibitory plasminového aktivátoru
PBS	fosforečnanový pufr
PDGFs	destičkové růstové faktory
PEO	polyetylenoxid
PVA	polyvinylalkohol
TGF- β	transforming growth factor
TIMPs	tkáňové inhibitory metaloproteináz
TNF- α	tumor necrosis factor
tPA	plasminogenových aktivátorů tkáňového typu
uPA	plasminogenových aktivátorů urokinázového typu

4. Rána

Ránou (vulnus) chápeme porušení souvislosti kůže nebo sliznice, způsobující ztrátu anatomické struktury, funkce v důsledku fyzikálního, mechanického nebo termického poškození či v důsledku patofyziologických poruch. Organismus je ohrožen krvácením, ztrátou tkáně, infekcí, poraněním životně důležitých orgánů a bolestí.

Po vyšetření celkového zdravotního stavu pacienta následuje pečlivé zhodnocení rány. Hodnotíme přítomnost infekce, etiologii a stáří rány, spodinu a okolí rány. Zjišťujeme přítomnost exsudátu. Zvážíme současnou či minulou lokální terapii.

4. 1. Dělení ran

4. 1. 1. Dělení ran podle příčiny vzniku

- ***Akutní***

Vzniká v důsledku traumatického poškození zdravé tkáně. Jde o ne/krvácející, znečištěné, drobné řezné rány, rány s cizím tělesem, otrávené rány, uštknutí či pokousání. Obvykle se hojí primárně v krátkém čase a bez komplikací.

- ***Chronické***

Vzniká na podkladě patofyziologických změn v organismu nebo působením vnějších podnětů na patofyziologicky změněnou tkáň. Jde o sekundárně se hojící rány s výraznější granulací. Do této skupiny řadíme vředy traumatické, venózní, arteriálně-ischemické, krevní, lymfatické, trofické, metabolické, autoimunní, infekční, neoplastické a geneticky podmíněné. Hojení trvá déle než 6 týdnů. I přes kauzální a adekvátní lokální terapii se hojí hůře než rány akutní. Léčebné postupy se stále hledají. Chronické rány nejsou předmětem této práce, ale pro lepší srovnání a návaznost na svou příští práci se jim krátce budeme věnovat v kazuistikách.

4. 1. 2. Dělení ran podle fáze hojení

- *Fáze zánětlivá/ exsudativní (čištění rány)*

Tzv. čistící fáze je velmi důležitá u skupiny ran, které jsou provázeny infekcí či je přítomen jiný patologické agens. Infekce poškozují vitální tkáň. Může být spojena s tvorbou povlaků a zápachem a může vést k systémové sepsi. Cílem je odstranit známky infekce systémovým i lokálním přístupem. Patří sem **rána infikovaná**, kde přímo v ráně je přítomno velké množství mikroorganismů. **Rána komplikovaná zápachem**, který je vyvolán přítomností proteolytických bakterií. Zápach může zhoršovat kvalitu pacientova života. **Rána povleklá**, která je tvořena pevně ulpívajícími shluky mrtvých a poškozených buněk, fibrinu, bílkovin, seriózního exsudátu, bílých krvinek a bakterií, popř. hnisu. Cílem je v tomto případě odstranění povlaku a podpoření růstu granulační tkáně. Povlaky brání hojení rány, znepráhledňují spodinu rány a mohou být zdrojem infekce (ideální živná půda pro patogeny). **Nekrotická rána** tvořená devitalizovanou (mrtvou) tkání, která znepráhledňuje spodinu a může být rovněž zdrojem infekce. Nekrotickou ránu můžeme dále dělit na ránu povrchově exsudující, povrchově suchou, hlubokou exsudující a hlubokou zapáchající.

- *Fáze proliferativní (náhrada poškozené tkáně):*

Fáze proliferativní je důležitá z hlediska náhrady poškozené tkáně. Hovoříme zde o **ráně granulující**, kde vzniká dobře vaskularizovaná červená tkáň. Dochází tak k náhradě tkáně deficitní a rána se vyplní. Případná hypergranulace je nežádoucí, protože brání epitelizaci. A **ráně epitelizující**, při níž dělením a migrací epitelálních buněk vzniká růžovobílá vrstva tkáně, která přemostuje tkáň granulační. Ránu následně uzavírá a chrání.

4. 1. 3. Dělení ran podle rozsahu

Z hlediska rozsahu můžeme rány rozdělit na **rány zavřené**, kde došlo k poškození bez porušení integrity kůže. **Rány povrchové**, při níž již došlo k poškození epidermis. **Rány v částečné tloušťce kůže**, kde je zasažena kromě epidermis také dermis. **Rány v celé tloušťce kůže**, kde je poškozena celá šíře až po subcutis. A **rány komplikované**, což je komplexní rozsáhlé poranění s možným poškozením cév, nervů, svalů, kostí či orgánů.

4. 1. 4. Další dělení ran

- *S rovnými okraji*

U těchto poranění hrozí silné krvácení. Při hlubších ranách hrozí nebezpečí poranění i hlouběji uložených tkání nebo orgánů. Hojí se však lépe než rány s nerovnými okraji. Řadíme sem **rány řezné** (vulnus scissum), **bodné** (vulnus punctum) či **sečné** (vulnus sectum).

- *S nerovnými okraji*

Tyto rány jsou velice náchylné ke vzniku infekce, méně krvácejí a mají delší dobu hojení. Mohou být **způsobené kousnutím** (vulnus morsum). Řadíme sem také **rány střelné** (vulnus sclopetarium), **tržné** (vulnus lacrum), **tržně-zhmožděné** (vulnus contusolacerum) či **odřenin** (exkoriace). U odřenin je bolest vnímána po několik prvních hodin, poté ustává a tvoří se strup.

- *Rány vzniklé v důsledku traumatického poškození zdravé tkáně*

Poškození tkáně může nastat různými vlivy a z tohoto hlediska dělíme rány na **rány termické** (popáleniny, omrzliny), **mechanické a traumatické** (řezné, střelné, operační ...), **chemické** (poleptání), **aktinické** (radiace).

- *Rány vzniklé v důsledku patofyziologických změn v organismu nebo působením vnějších podnětů na patofyziologicky změněnou tkáň*

Klasickými zástupci jsou vředy (ulcerace). Jde o plošné defekty kůže, které mohou zasahovat epidermis, dermis i subcutis (dekubity, bérkové vředy, diabetické nohy, exulcerované tumory...).

4. 2. Struktura a funkce kůže

4. 2. 1. Kůže se skládá ze tří základních vrstev

Epidermis (pokožka) je zevní vrstva kůže, která neobsahuje cévy a je zásobována difúzí živin z kapilárního lůžka dermis.

Dermis/corium (škára) je střední vazivová vrstva kůže, která obsahuje bohatou cévní síť a nervová zakončení.

Subcutis/tella subcutanea (podkoží) je nejhlubší vrstva kůže, která je složena z řídké vazivové tkáně a vůči dermis není ostře ohraničena. Ukládá se zde tuk, který má izolující, depotní a modelační funkci.

4. 2. 2. Funkce kůže

- Ochranná - proti mechanickým, chemickým vlivům, proti vysychání
- Imunitní - schopnost samočištění kožního povrchu, autodezinfekční schopnost
- Termoregulační - výměna tepla mezi organismem, tepelná izolace těla
- Zásobní – metabolismus tuků, vody, minerálů a vitamínů
- Percepční - vnímání bolesti, tepla, chladu a hmatová funkce
- Exkreční - výdej CO₂ a dusíkatých látek, lipidů, výměna vody a solí
- Resorpční - vstřebávání látek rozpustných v tucích

5. Hojení ran

Tkáňová regenerace a hojení ran patří mezi základní děje, které zajišťují přežití mnohobuněčných organismů (Sobotka, 2006).

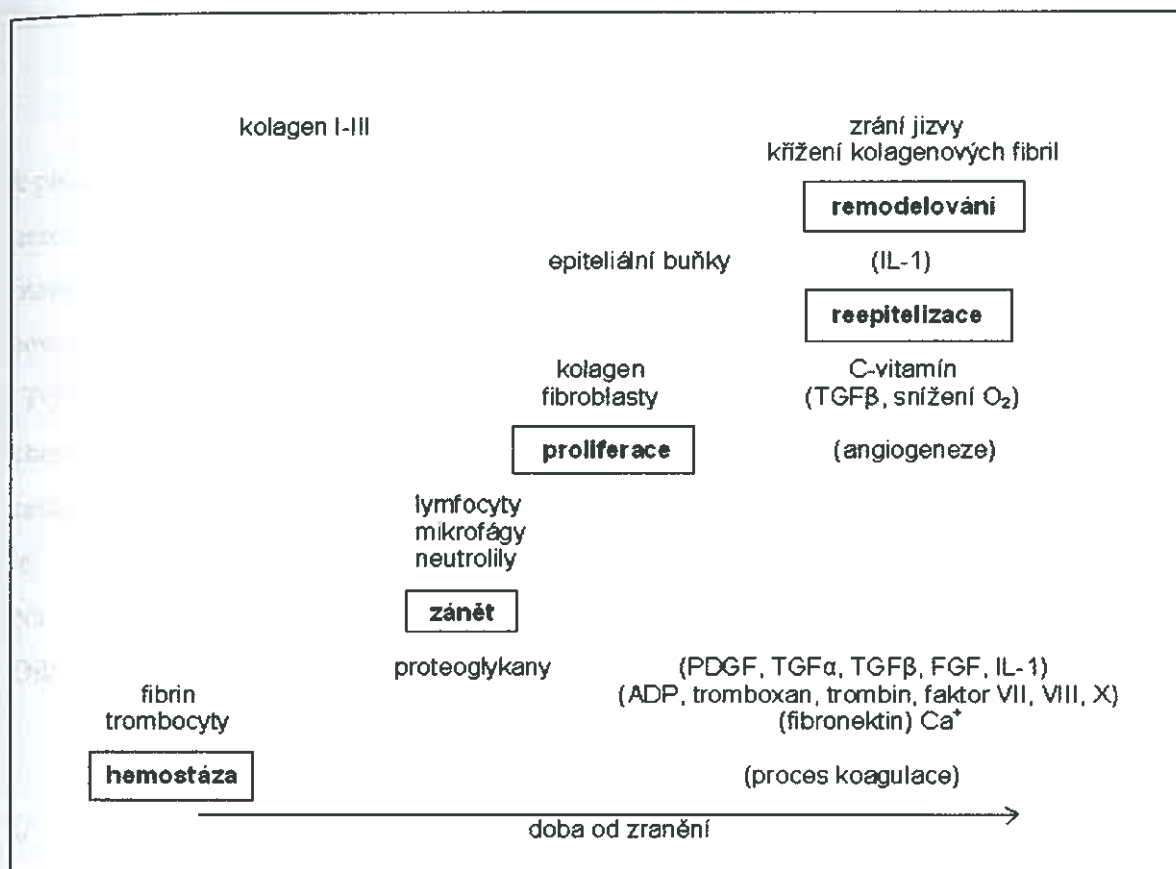
Hojení poškozené tkáně je fyziologický proces, jehož smyslem je minimalizovat změny, které v organismu nastaly v důsledku poranění a které narušují homeostatické prostředí organismu. Jde o komplexní proces, na němž se podílejí jak systémové, tak lokální vlivy. Nezbytnou podmínkou je dostatečná zásoba substrátů pro regenerační procesy, a to buď ve formě dostatečných zásob, nebo nutriční výživy. Mezi speciální nutriční substráty patří arginin, glutamin, antioxidační vitamíny a zinek. Regenerační procesy jsou potlačovány během systémové zánětlivé reakce. Zhoršené hojení je však způsobeno i psychickým stresem. Lokální podmínky vhodné k hojení znamenají především vlhké prostředí.

U člověka je proces regenerace do značné míry záhadný a ne zcela probádaný. Během regenerace nejde pouze o to, jak zajistit ztrátu části tkáně, ale rovněž o to, jak zabránit nežádoucímu buněčnému dělení, které může vést ke vzniku nádorového bujení. Hojení ran probíhá s poměrně malými následky na funkci orgánů.

- **per primam**
 - hojí se rány čisté s hladkými okraji
 - výsledkem je jemná jizva (chirurgické řezy)
- **per secundam**
 - hojí se rozsáhlejší rány, hnisající nebo naplněné sraženou krví
 - hnis, krev a ostatní hmoty jsou nahrazeny zánětlivou granulační tkání - výsledkem je velká jizva

5. 1. Fáze hojení a její ovlivnění

Hojení ran má několik základních fází, které se navzájem prolínají, ovlivňují a nelze je od sebe oddělit:



Ranný proces hojení podle Nemetha

5. 1. 1. Zánětlivá fáze (0. - 5. den)

Poranění vede k aktivaci hemostatických mechanismů za účasti krevních destiček a koagulačních faktorů, jejichž cílem je minimalizovat krevní ztráty z poškozených cév. Hemostáza spočívá ve vzájemné souhře tří mechanismů – reakci cév v místě poranění, činnosti trombocytů a hemokoagulaci.

Dochází k agregaci cirkulujících trombocytů. Stimulace kaskády vede později k proteolytickému štěpení fibrinogenu pomocí enzymu trombinu. Výsledkem je tvorba nerozpustné fibrinové sraženiny, která drží poničenou tkáň pospolu a poskytuje tak provizorní matrix. Z trombocytů se uvolňují látky, které působí vasokonstrikčně, zvyšují permeabilitu cévní stěny a chemotakticitu neutrofilů a monocytů. Jde o histamin, cytokiny, růstové faktory (TGF- β , PDGF), serotonin. Také z poškozených endotelových buněk se uvolňují chemotaktické působky (IL-1, IL-8, FGF, PDGF aj.). Působení těchto látek vede k zánětlivé reakci provázené prvotní krátkodobou vazokonstrikcí (nezbytná k zástavě krvácení). Následně je vlivem vznikající tkáňové hypoxie vystřídána vazodilatací s extravazací krevní plazmy. Na aktivovaný cévní endotel adherují leukocyty, které dále zvyšují metabolické nároky tkáně. Díky nedostatečné místní mikrocirkulaci klesá pO_2 , stoupá pCO_2 a hromadí se laktát.

Do tkáně vstupují neutrofilů a monocytů, které se aktivují na tkáňové makrofágy. V první fázi vykazují vyšší aktivitu neutrofilní granulocyty, které představují „první linii“ obrany proti infekci pomocí fagocytů. Neutrofilů jsou obvykle v ráně vyčerpané po 2 nebo 3 dnech a jsou odstraněny pomocí tkáňových makrofágů. Během 48-96 hodin po vzniku zranění se zvyšuje množství makrofágů v reparované tkáni. Činností makrofágů jsou uvolňovány rozpustné mediátory jako např. růstové faktory a cytokiny obsahující TNF- α , TGF- β , PDGFs, IL-1, IL-6. Makrofágy jsou schopny regulovat proteolytický rozklad tkáně v ráně. Některé z těchto rozpustných mediátorů posilují a aktivují fibroblasty, které budou syntetizovat, zakládat a organizovat novou tkáňovou matrix, zatímco ostatní podporují angiogenezi. Zprostředkovávají přechod zánětlivé fáze hojení do fáze proliferativní.

5. 1. 2. Proliferační fáze (3 - 14. den)

Tato fáze nastupuje za ustupujících známek zánětu, tzn. že infekce nebo přítomnost cizorodých materiálů tuto fázi oddálí. Epitelizační tkáň vzniká dělením a migrací epitelálních buněk kolem zachovalých kožních adnex tzv. epitelizačních ostrůvků. Pokud byly při poranění zničeny, probíhá epitelizace pouze z okrajů rány a definitivně uzavírá ránu. Buňky mají plochý tvar dokud nedojde k přemostění rány, kdy začnou nabývat na výšce a ještě se zvýší jejich mitotická aktivita. Je prokázáno, že rychlost epitelizace závisí na vlhkosti rány, tj. i krátkodobé oschnutí má za následek zpomalení.

Fibroblasty jsou v normální kůži v klidovém stavu, jsou méně distribuovány. V kontrastu s tím, v provizorní matrix rány a v granulační tkáni jsou v početnějším množství a v aktivní formě. Asi 3 dny po poranění začnou fibroblasty vytvářet nové receptory a čtvrtý den migrují do provizorní tkáňové matrix jako odpověď na rozpustné cytokiny a růstové faktory. Fibroblasty v provizorní matrix rány proliferují, produkují fibronectin, který iniciuje tvorbu granulační tkáně. Začíná syntéza nového kolagenu, elastinu, proteoglykanu a dalších komponenti. PDGF a TGF- β jsou dva z nejdůležitějších růstových faktorů, které regulují expresi genů ECM a proteáz ve fibroblastech. Migrace fibroblastů v ECM je spojena s připojením ke komponentám matrix. Ačkoli jeden konec fibroblastů zůstává připojen ke komponentám matrix, umožní cytoplazmatickou „projekci“, aby našli další místo pro připojení. Když je toto místo nalezeno, je připojení k původnímu místu přerušeno pomocí proteáz, které jsou produkovány fibroblasty. Tyto proteázy se nazývají metaloproteinázová matrix (MMPs) a jsou specifické pro migraci buněk přes ECM. Proces je kontrolován tkáňovými inhibitory metaloproteináz (TIMPs), jako ochrana proti degradačnímu porušení.

Proces angiogeneze probíhá paralelně s fibroplazií. Buňky, které formují nové kapiláry a pocházejí z kmenových buněk kostní dřeně, jsou nazývány hemangioblasty a cirkulují v krevním řečišti. Celý proces je zahájen kolem druhého dne stimulací lokálními faktory v mikroprostředí rány jako jsou nedostatek energie, nízké pH a vysoké množství laktátu. Následuje migrace do matrix, která vyžaduje lokální sekreci proteolytických enzymů, obzvláště MMPs. Vytvoří se lumen vyvíjející se cévy a nová cévní klička. Tento proces pokračuje až do kapilárního systému a je dostatečně opravován. U primárně uzavřených ran se novotvořené cévy setkají se svými protějšky na opačné straně rány, nedojde-li k tomu, dochází ke tvorbě granulační tkáně.

5. 1. 3. Epitelizační a remodelační fáze (10. den - 1 rok)

Kolem 10. dne po poranění dochází k redukci počtu buněk, mnoha kapilár a malých cév původní provizorní granulační tkáňe a dochází k její přeměně v definitivní vazivo. Klesá také metabolická aktivita. Změny nastávají v závislosti na typu, množství a organizaci kolagenu a vedou ke zvýšení pevnosti tkáňe. Redukuje se množství fibronektinu, kyseliny hyaluronové a kolagenu typu III. Naopak se zvyšuje se tvorba více zesíťovaného kolagenu typu I a proteoglykanů a vznikají primární vystouplé jizvy.

Pevnost nově epitelizované rány je pouze okolo 25 % vzhledem ke zdravé tkáni. Po pár měsících se pomalu zvyšuje pevnost ve zhojené tkáni přestavbou primárně nahodile uspořádaných polymerizovaných kolagenních vláken ve svazky orientované. Zároveň vzrůstá množství kovalentních příčných vazeb kolagenových molekul pomocí enzymu lyzyoxidázy, která je sekretována fibroblasty v ECM. Retrakce rány bude zajištěna kontrakcí membrány fibroblastů, které se ve zrající jizvě fixují do kolagenní sítě. Na této fázi se podílí i řada metaloproteináz. Maximum obnovy je 80 % vzhledem k normální tkáni.

5. 1. 4. Faktory, které ovlivňují hojení ran

- **Faktory lokální**

Řadíme sem nekrotickou tkáň, cizí tělesa, infekci, exsudát, teplotu, prokrvení, pH, recidivující trauma, edém..

- **Endogenní faktory**

Z endogenních faktorů jmenujme např. věk, mobilitu, bolest, psychiku, motivaci, inkontinenci, obezitu, malnutrici či dehydrataci.

- **Exogenní faktory**

Exogenními faktory chápeme vlivy celkové terapie (cytostatika, radioterapie..), lokální terapie či kvalitu ošetrovatelské péče

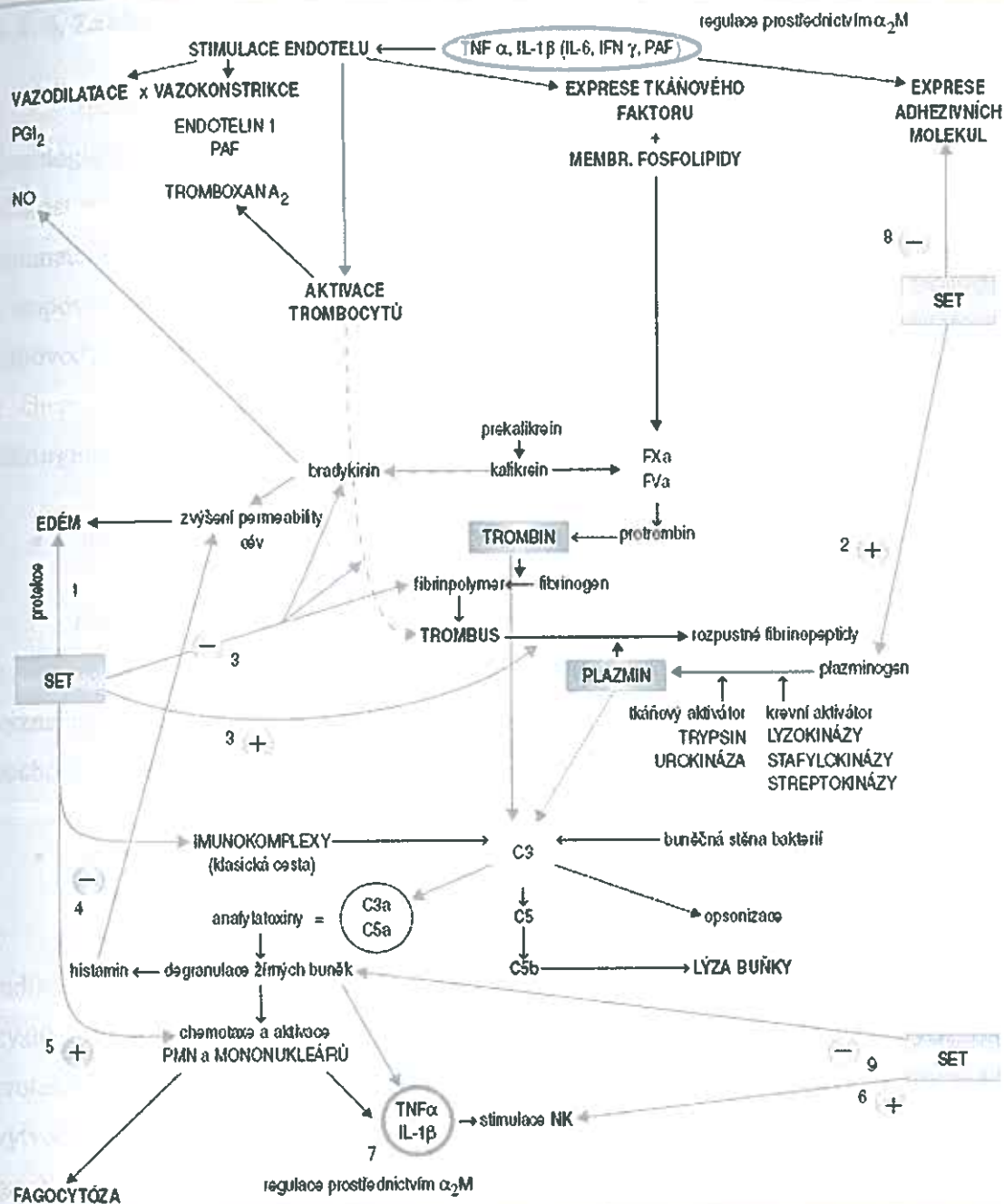


Schéma volně podle: Weiss C et Jellmann W. (1990); Chapel H. et Haeney M. (1984).

Číselná legenda ke schématu:

1. Proleďmový účinek trypsinu, chymotrypsinu a bromelainu a edém protektivní účinek papainu
2. Zvýšení plazmatické koncentrace plazminogenu
3. Snížení tvorby fibrinu a zvýšení odbourávání již vzniklých trombů
4. Zvýšení clearance IK, ztráta schopnosti IK aktivovat komplementovou kaskádu
5. Vzestup produkce cytokinů mononukleáry
6. Stimulace NK buněk
7. Snížení exprese adhezních molekul
8. Snížení plazmatické hladiny alfa-2-makroglobulinu
9. Inhibice degranulace mastocytů

SET = systémová enzymoterapie; α2M = alfa 2-makroglobulin; TNF = tumor nekrotizující faktor; IL = interleukin; PGI = prostaglandin I; PAF = faktor aktivující destičky; NO = oxid dusnatý; C = komplement; PMN = polymorfonukleár

Zánět a jeho ovlivnění proteázami (systémová enzymoterapie)¹⁰

5. 1. 5. Základní fyziologické podmínky hojení:

Spontánně dochází ke kaskádě procesů hojení pouze při splnění základních fyziologických podmínek jako je dostatečné zásobení tkáně krví a kyslíkem, optimální vlhkost a teplota rány. Je potřeba zajistit ochranu rány před infekcí či před recidivujícím traumatem. A samozřejmě je důležité dostatečné množství mikronutrientů (vitamíny, minerály a stopové prvky). Dostatečnou výživu, antioxidanty, vitamíny, tkáňovou hypoxii, zánětlivou odpověď, věk, spánek a psychický stav označujeme jako **faktory vnitřní**. Kdežto mechanický a chemický stres, neodstraněné zbytky tkání, vysychání, medikaci, teplotu, infekci a chirurgickou techniku řadíme do skupiny **faktorů vnějších**.

- *Stav výživy*

Hojení je proces extrémně náročný energeticky i látkově. K možnému deficitu v potravě je nutno připočítat i možnost rychlejšího vyčerpání zásob u celkově těžkých stavů vyznačujících se zvýšeným katabolismem. Jde zejména o infekce, rozsáhlejší reparační pochody nebo jinak zatěžující stavy.

- *Antioxidanty*

Při akutním poškození tkáně dochází k produkci nadměrného množství volných radikálů, hovoříme o oxidačním stresu. Antioxidanty mají za úkol snížit množství volných kyslíkových radikálů, čímž dochází k omezení peroxidace lipidů buněčných membrán, proteinů a kyseliny deoxyribonukleové. Není třeba zlikvidovat každý volný radikál, ale vytvořit rovnováhu mezi protikladnými ději. Volné radikály jsou vlastním baktericidním mechanismem fagocytů a cévní tonus je regulován pomocí oxidu dusnatého. Mezi antioxidanty řadíme některé enzymy metaloproteiny, např. ferritin a ceruloplazmin, vitamíny E, C, beta-karoten, enzymy opravného mechanismu DNA a některé běžné látky jako albumin, kyselinu močovou a bilirubin.

- *Vitamíny*

Vitamín C - kyselina askorbová je kofaktorem redoxních reakcí, např. v případě kolagenu při hydroxylaci lyzinu a prolinu. Vznikající aminokyseliny hydroxylyzin a hydroxyprolin jsou nutné pro schopnost kolagenu tvořit pevné vazby mezi jednotlivými vlákny, tzn. pro tvorbu kvalitního, pevného vaziva. Z dalších účinků souvisejících s hojením ran zmíníme ochranné protiinfekční vlastnosti, redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} v gastrointestinálním traktu zvyšuje biologickou dostupnost železa a zvyšuje účinnost kyseliny listové. Při jejím nedostatku se v různé míře projevují příznaky scorbut - zvýšená vnímavost k infekcím, krvácení z dásní, zhoršená kvalita vaziva při hojení ran.

Vitamín A - retinol spolupůsobí při tvorbě mukopolysacharidů.

Vitamín B1 - thiamin je kofaktorem pyruvátdekarboxylázy. Deficit se projeví sníženou utilizací glukózy, což má za následek poruchu energetického metabolismu.

Vitamín B2 - riboflavin je zodpovědný za transport H^+ a má rovněž význam na energetický metabolismus.

Kyselina listová a vitamín B12. Při jejich deficitu vzniká anemie, což může způsobovat nedostatečný pO_2 ve tkáních.

Vitamín K je kofaktorem při tvorbě některých hemokoagulačních faktorů (II, VII, IX, X, C, S).

- *Stopové prvky*

Zinek je kofaktorem více než sta různých enzymů. Jeho nedostatek zpomaluje proces hojení ran, způsobuje poškození kůže a kožních adnex.

Železo. Základní funkce je dána přítomností v molekulách hemoglobinu a myoglobinu, kde váže O_2 . Je součástí cytochromů, kde se podílí na transportu elektronů v oxidačním metabolismu.

Měď katalyzuje vstup železa do porfyrinového jádra a podílí se na extracelulární modifikaci kolagenu.

- *Tkáňová hypoxie*

Poruchy převodu kyslíku do tkání jsou způsobeny nedostatečností kardiopulmonálního systému, nedostatečným transportem O₂ krví, poruchou perfúze na podkladě chorobných změn cév, vazokonstrikcí či poruchami difúze stěnou kapilár. Rozmezí pO₂, kdy tkáňové oxygenázy mohou fungovat, je 20-200 mm Hg. Běžný pO₂ v ranné tekutině je asi 30-40 mm Hg, tzn. že tyto enzymy nepracují v plném rozsahu své funkční kapacity. Terapeuticky lze zvýšit pO₂ ve tkáních několika způsoby: dýcháním koncentrovaného O₂ či použitím hyperbarických komor (běžně používaný tlak je do 2-3 atm.)

- *Zánětlivá odpověď*

Neadekvátní zánětlivá reakce způsobuje poruchy hojení. Snížená zánětlivá odpověď způsobuje zpomalení hojení. Může být způsobená imunitním defektem (př. diabetes mellitus), změnami v sekreci hormonů (glukokortikoidy, kombinace hladin estrogenů a gestagenů jaké se objevují při těhotenství) nebo medikací. Naopak mírné zvýšení vyvolá tvorbu hypertrofické jizvy. V silnější formě může dojít ke značné nadprodukci cytokinů a proteáz, což může mít za následek nevytvoření nebo rozpuštění již vzniklé granulační tkáně. Prolongovaný zánět vede ke vzniku nadměrného jizvení. Příčiny jsou obvykle infekce nebo přítomnost cizích těles.

- *Věk*

S přibývajícím věkem roste výskyt chorob, z nichž mnohé hojení ran ovlivňují, ale také klesá kvalita vazivové tkáně. Dochází k ubývání elasticity, pevnosti v tahu, snižuje se hydratace a nutriční kvalita, což, jak již bylo řečeno, významně ovlivňuje proces hojení.

- *Spánek*

Nedostatek spánku a odpočinku nežádoucím způsobem zasahuje do buněčného dělení a reparace tkání. Určitý klidový režim vyžadující zejména rány lokalizované nad klouby, u kterých při odpočinku nepůsobí fyzikální stres daný pohybem.

- *Psychický stav*

Stresové situace způsobují zvýšenou sekreci glukokortikoidů v organismu, které mají protizánětlivý účinek a tlumí tvorbu granulační tkáně. Špatný psychický stav, úzkost, deprese, strach z opakování choroby, ze sociální izolace vyvolává mnohdy nezájem pacienta o své onemocnění.

- *Mechanický stres*

Charakterizují jej například tlakové rány u imobilních či dlouhodobě ležících pacientů. Příčinou jsou okluze cév nebo poruchy periferního přenosu (neuropatie) spojené s neschopností adekvátní reakce na algické stavy.

- *Chemický stres*

Nejnámějším představitelem jsou toxická antiseptika.

- *Neodstraněné zbytky tkání*

Devitalizované nekrotické a rozdrcené zbytky tkání musí být odstraněny chirurgickou nebo autolytickou cestou pro dosažení žádoucího hojení. Jejich přítomnost je ideálním prostředím pro množení bakterií, obzvláště u ran vzniklých suchým horkým poraněním.

- *Vysychání*

Enzymy, růstové faktory ani buňky nejsou schopny fungovat v suchém prostředí. Proto buňky na povrchu hojené tkáně bez krytí, vystavené suchu jsou destruovány a může dojít k posunu zpět do některé z předchozích fází hojení - nejčastěji je znovu vyvolán zánět.

- *Teplota*

Enzymy jsou optimálně funkční při teplotě lidského těla. Již pokles o 2°C, ke kterému může dojít až na 4 hodiny při jednoduché výměně obvazu, vede k signifikantnímu poklesu jejich aktivity.

- *Infekce*

Jsou zvláštním problémem vyskytujícím se hlavně po chirurgických operacích. V obranyschopnosti organismu má prvotní význam nespecifická imunita. Teprve druhořadá je imunita specifická. Tato vnitřní rezistence je důležitější než jakákoli antiseptická nebo antibiotická terapie. Nejčastějšími insekty jsou stafylokoky a klostridie.

- *Medikace*

Hojení významně ovlivňují léky modulující imunitní odpověď organismu. Tyto léky jsou často součástí chronické medikace pacientů. Jde např. o glukokortikoidy, nesteroidní antiflogistika, kyselina salicylová, nádorová chemoterapeutika.

- *Chirurgická technika*

Mnoho komplikací je způsobeno chybnou technikou uzávěru rány. Je potřeba tkáň co nejméně traumatizovat, čehož lze docílit používáním jemných, ostrých nástrojů, minimálním sušením, podvazováním a elektrokauterizací cév, použitím optimální síly stehů. V případech uzavírání malých ran se používají jednotlivé stehy volně zakládané přiměřeně blízko okrajům rány. U nemocných se zhoršenou hojivostí je potřeba vytvořit pevnější uzávěr. Obecné pravidlo je zakládat stehy z důvodu co nejmenšího narušení krevního oběhu tak daleko od sebe, aby ještě splňovaly základní funkci přiblížování okrajů rány.

5. 2. Ošetřování ran

Zkušenosti spojené s hojením ran si lidstvo předává ústní i psanou formou již několik tisíc let. Ještě na počátku 19. století bylo hojení rány provázené komplikací spíše pravidlem. Dramatický zlom v přístupu k ošetření a hojení ran nastal v témže století zavedením antiseptiky. Problematika hojení ran stojí trvale v popředí zájmu i v dnešní době, neboť porušení kožního krytu znamená ztrátu základní ochranné bariéry proti agresí zevního prostředí a narušení integrity organismu jako celku.

Mnoho poranění pokožky se hojí rychle a efektivně během 1 či 2 týdnů. Ačkoli se akutní rány obecně hojí, konečný výsledek není často moc estetický a funkčně dostačující. V opozici s akutní ránou se rány chronické samy dobře nehojí. Rány, které byly primárně ošetřeny suturou, nevyžadují větší ošetrovatelskou péči (hojí se per primam intentionem). Rány, které z nějakého důvodu nebyly či nesměly být ošetřeny primární suturou (například podezření na infekci v ráně) nebo byly infikovány, mají hojení prodlouženo (hojí se per secundam intentionem). Některé rány mohou být v důsledku infekční komplikace příčinou život ohrožujících stavů (sepsy, tetanus apod.). Léčba závisí na aktuálním stavu rány a fázi hojení. V praxi se využívá farmakologická léčba (využití mastí, past, krémů, tinktur...) v kombinaci se sekundárním krytím (gázové čtverce, čtverce z netkaného textilu, obinadla, náplasti...) tzv. „klasická terapie“. Nebo moderní ošetrovací materiály, tzv. "vlhká terapie": polyakrylátové polštářky, algináty vápníku, hydrokoloidy, hydrogely, masťová krytí nebo polyuretanové pěny.

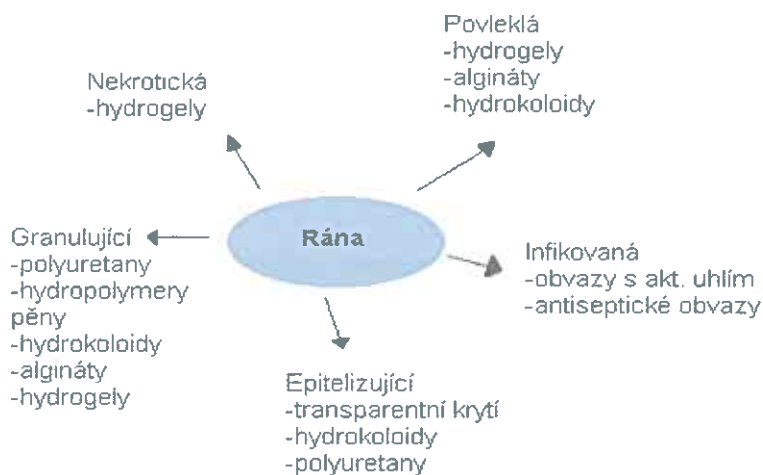
Vlhká terapie se opírá o vědecky podložený pozitivní vliv vlhkého prostředí na všechny fáze hojení ran. Tento způsob hojení využívá přirozeného, fyziologického hojení za vlhkých podmínek. Vlhké mikroklima podporuje čistící procesy v ráně bez poškození buněk, zabraňuje inaktivaci imunokompetentních buněk. Podporuje buněčnou proliferaci a novotvorbu granulační tkáně. Podporuje mitózu a migraci buněk epitelu. Kromě samotného vlhkého prostředí zde hraje důležitou úlohu i teplota – ideální je kolem 37°C. Tyto podmínky zajišťují tzv. terapeutické materiály a dodržení určitých postupů (např. převazy ran na delší časový úsek 2 – 7 dnů).

5. 3. Krycí materiály

Ideální krycí materiál by měl mít všechny fyziologické vlastnosti zdravého přirozeného tělního krytu (kůže).

Primární krycí materiál je přímo ve styku s ránou. Základním požadavkem je udržovat v ráně optimální prostředí (teplota, vlhkost, pH..). Dále by měl být selektivně propustný, aby umožňoval výměnu plynů a vodních par, aby nepropouštěl vodu a bakterie z okolí. Měl by být účinnou bariérou před infekcemi. Měl by být flexibilní, dobře aplikovatelný a adaptabilní, ale zároveň nepřisychat ke spodině. Pacienti by krycí materiál měli dobře snášet a počet převazů by měl být minimální, aby se snížilo riziko poškození spodiny a zvýšila se stabilita mikroklimatu rány. A samozřejmě náklady by měly být přímo úměrné rychlosti a účinnosti léčby.

Sekundární krytí je umístěno na krytí primárním. Již by nemělo absorbovat aktivní látky z primárního krytí. Mělo by být šetrné vůči okolí rány, zabraňovat vstupu bakterií a četnost potřeby výměny obvazu by měla být minimální. Další funkcí je komprese. Vhodným sekundárním krytím jsou neadhezivní savé materiály, polyuretanová pěna např. Allevyn či filmové krytí jako např. Opsite.



Výběr vhodného terapeutického obvazu¹¹

5. 3. 1. Pasivní krycí materiály

Tyto materiály nemají vliv na optimalizaci či aktivní podporu procesu hojení rány.

- **Tradiční krycí materiály**

Řadíme sem papyrus, listy, pavučinu, med, bláto, gázu, vatu aj. Jejich funkcí je překrýt ránu, absorbovat exsudát a chránit před traumatizací.

- **Konvenční krycí materiály**

Jde o nepřilnavé krycí materiály a kontaktní krytí. Mezi jejich vlastnosti patří překrytí rány, absorpce exsudátu, ochrana před traumatizací, nepřisychání ke spodině rány. Zároveň neuvolňují do rány vlákna a částičky, nejsou toxické a nealergizují ránu.



Konvenční krycí materiál

5. 3. 2. Interaktivní materiály

Optimalizují proces hojení, zajišťují vlhké prostředí, jsou selektivně propustné, vytváří bariéru proti infekcím a minimalizují frekvenci převazů.

- **Hydrogely**

Hydrogely patří mezi hydrofilní prostředky, které jsou na jedné straně schopny rehydratovat suchou tkáň a na druhé straně absorbovat sekret exsudativních ran. Hydrogely sestávají z polymerů nebo kopolymerů s vysokým obsahem vody. Jejich předností je odstranění nežádoucích nekrotických a fibrinových povlaků, dehydratace rány a vytvoření vhodného mikroklima. Přičemž nepoškozují zdravé tkáňové buňky.



Intrasite gel

- **Hydrokoloidy**

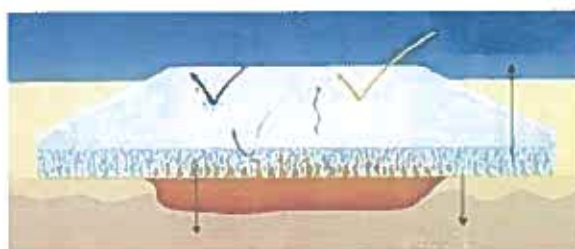
Jde o dvojvrstevné krytí. Vnější vrstvu tvoří polyuretanová hmota, která je nepropustná pro plyny a vodní páry. Vnitřní absorpční vrstva obsahuje hydrokoloidní polymerový komplex želatiny, pektinu a karboxymethylcelulózy. Hydrokoloidní partikule reagují se sekremem rány a vytvářejí tak gelovitou hmotu, která zajišťuje příznivé klima pro hojení rány s požadovanou teplotou a vlhkostí kolem 90 %. Vytvořené hypoxické prostředí s nízkým pH povzbuzuje angiogenezi a granulaci. Charakteristický je kyselý zápach.



Replicare ultra

- **Polyuretanové pěny**

Jde o jednoduchá nebo vícevrstvá krytí vyráběná z měkkých polyuretanových materiálů propustných pro vodní páry a plyny. Obsahují vnější vrstvu, která je semipermeabilní. Vnitřní vrstva je tvořena vysoce absorpčním jádrem, který absorbuje sekret aniž by materiál zkapalněl. Optimální poměr mezi absorpcí a redukcí přebytečného sekretu udržuje ránu přiměřeně vlhkou. Společně s exsudátem jsou pojmány bakterie a tím se pěnové obvazy podílejí na čištění rány. Zároveň neulpívá na spodině rány.



Allevyn

- **Antiseptické krycí materiály**

Tyto porézní materiály jsou impregnovány účinnou antiseptickou látkou čímž získávají baktericidní vlastnosti a jsou prevencí vzniku infekce. Neabsorbují exsudát.



Bactigras

- **Čistící krytí s aktivním uhlím**

Jsou tvořeny jádrem s aktivním uhlím, které podporuje fyziologické čištění rány. Mezi další vlastnosti krytí patří bakteriostatický účinek, deodorační a absorpční schopnost. Mají tendenci přisychat k ráně.



Carbonet

- **Antimikrobiální obvaz s nanokrystalickým stříbrem**

Skládá se z vnitřního absorpčního jádra, které je vloženo mezi vnější vrstvy nízkoadhezní polyetylenové sítě potažené stříbrem. Nanokrystalická vrstva stříbra rychle usmrcuje široké spektrum bakterií již během 30 minut. Vytváří tak účinnou bariéru proti rezistentním bakteriím.



Acticoat

- **Algináty**

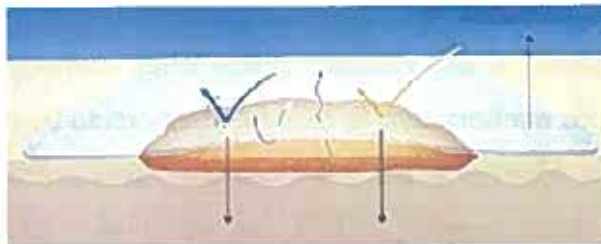
Obsahují vysoce absorpční alginátová vlákna z hnědých mořských řas. Ionty vápníku nebo draslíku, které jsou součástí alginátu, nahradí ionty sodíku přítomné v exsudátu a umožní přeměnu alginátových vláken v hydrofilní neadherentní gel. Mají bakteriostatický a hemostatický účinek. Svou vysokou absorpční schopností vytváří vhodné mikroklima rány. „Nevýhodou“ je, že vyžadují sekundární krytí.



Alginat M

- **Filmová krytí**

Jde o průhledný selektivně propustný polyuretanový film a akrylátové hypoalergenní lepidlo, které vytváří v ráně vhodné mikroklima. Jsou průhledné a umožňují monitorovat ránu. Tvoří antibakteriální bariéru, protože propouští plyny a vodní páry, ale nepropouští bakterie a vodu.



Opsite

- **Mokrý interaktivní krytí**

Moderní mokré krytí - TenderWet, reprezentované polyakrylátovým polštářkem v polypropylenové nepřilnavé síťce se superabsorpčním jádrem aktivovaným Ringerovým roztokem, je klasickým představitelem bioaktivní terapie, která spočívá v kombinaci účinného mokrého obvazu s absorpční složkou. Ringerův roztok je průběžně uvolňován do rány, aktivně změkčuje a rozpouští nekrózy a současně absorbuje zbytky odumřelých buněk, uvolněný detritus a choroboplodné zárodky (osmolytický debridement).

- **Enzymatické preparáty**

Obsahují nepřímo i přímo působící hydrolytické enzymy, které nahrazují nedostatek vlastních enzymů zapojených do procesu hojení. Jejich působením se štěpí narušený tkáňový kolagen, fibrin, rozkládá se deoxyribonukleová kyselina z jader poškozených buněk a tím se docílí bezbolestného vyčištění rány. Odstraňují patofyziologicky změněný tkáňový substrát i nežádoucí nekrotický materiál. Např. Iruxol.

5. 4. Chirurgické ošetření ran

Mnoho komplikací je způsobeno chybnou technikou uzávěru rány. Je potřeba tkáň co nejméně traumatizovat. V případech uzavírání malých ran se používají jednotlivé stehy volně zakládané přiměřeně blízko okrajům rány. U nemocných se zhoršenou hojivostí je potřeba vytvořit pevnější uzávěr. Používají se pomalu vstřebatelné materiály pro šití fascie, stehy na kůži je potřeba zakládat více jak 5mm od okraje rány, protože až sem zasahuje zóna lýzy kolagenu. Po sešití fascie je možno nechat ránu otevřenou 4-5 dní a vytvořit tak odloženou primární suturu, kdy se jen kontroluje okolí rány pro zjištění případné infekce bez nutnosti výměny obvazu. Obecné pravidlo je zakládat stehy z důvodu co nejmenšího narušení krevního oběhu tak daleko od sebe, aby ještě splňovaly základní funkci přiblížování okrajů rány.

5. 5. Oplachy a laváže

Dodržování základního sprchování defektu musí být součástí edukace pacienta, který mnohdy nechápe nebo podceňuje důležitost tohoto banálního úkonu pro lokální ošetřování rány. Účelem výplachu je napomáhání čištění rány odplavením zbytků sekretů, nekrotické tkáně a krevních sraženin. Oplachy a laváže také podporují proces hojení s následnou granulací a epitelizací. Musí se ale provádět opatrně a nesmí narušit žádnou fázi hojení. Při a po aplikaci oplachů sledujeme bolestivost, alergické reakce (výskyt erytému v okolí rány) a celkový stav pacienta (změna teploty, třesavka aj.)

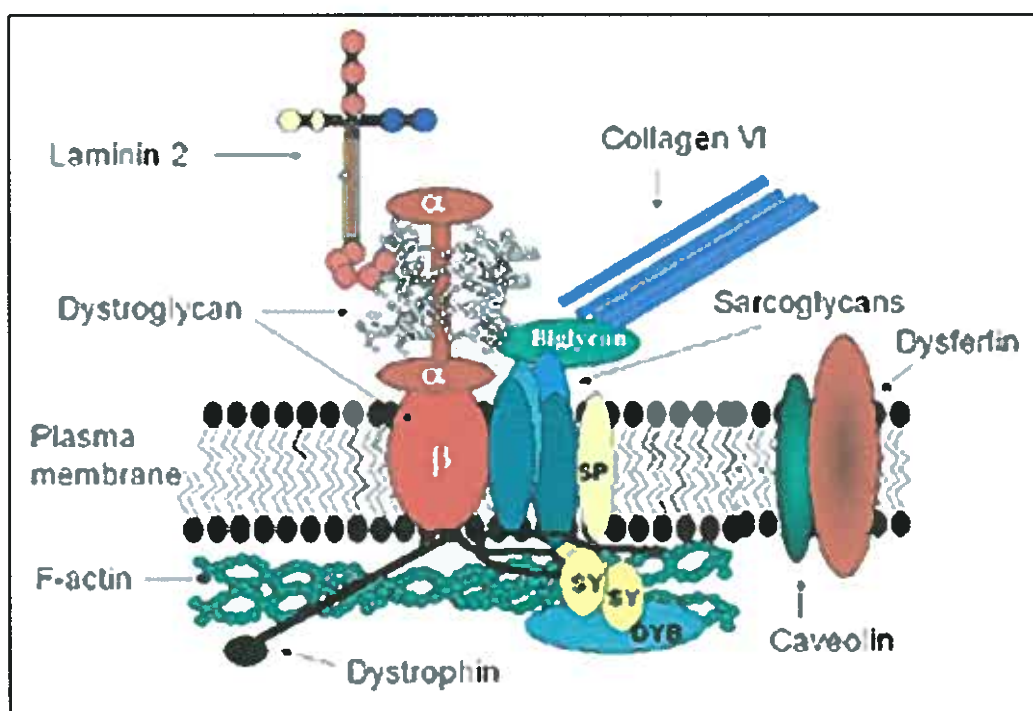
Oplachové roztoky nesmí být cytotoxické. Nesmí alergizovat a vyvolávat bakteriální rezistenci. Obvykle je teplota těchto roztoků kolem 36°C. K aplikaci je nejvíce vhodný Ringerův roztok (iontový izotonický roztok upravující ztrátu iontů z rány), pitná voda či 3% Borová voda

6. Extracelulární matrix

Jde o složitou směs vody, glykoproteinů a proteoglykanů přispívajících k vazbě buněk na vláknité složky vaziva. ECM je největší komponentou pokožkové dermis. Je produkována buňkami jež ji obklopují. V savčích tkáních se ECM častěji nachází v pojivových tkáních jako jsou šlachy, chrupavky, kosti nebo pokožka. Makromolekuly v ní obsažené můžeme rozdělit do 3 skupin:

- Glykoproteiny a proteoglykany
- Fibrilární proteiny (kolagen a elastin)
- Multiadhezivní molekuly a glykoproteidy (fibronectin, vitronectin, tenascin, merozin, laminin)

Syntéza ECM je klíčem k hojení ran, obzvláště tam, kde je významný nedostatek tkáně. Váhový základ a silová roztahitelnost zdravé pokožky se blíží oceli, přesto má pokožka částice elasticity a stažitelnosti. Kolagenová vlákna zodpovídají za sílu a organizaci matrix. Elastinová vlákna poskytují ohebnost a pružnost. Fibronectin, laminin a tenascin se podílejí na přilnavosti a jednotnosti ECM, zodpovídají za spojení buněk a formu vazeb matrix.

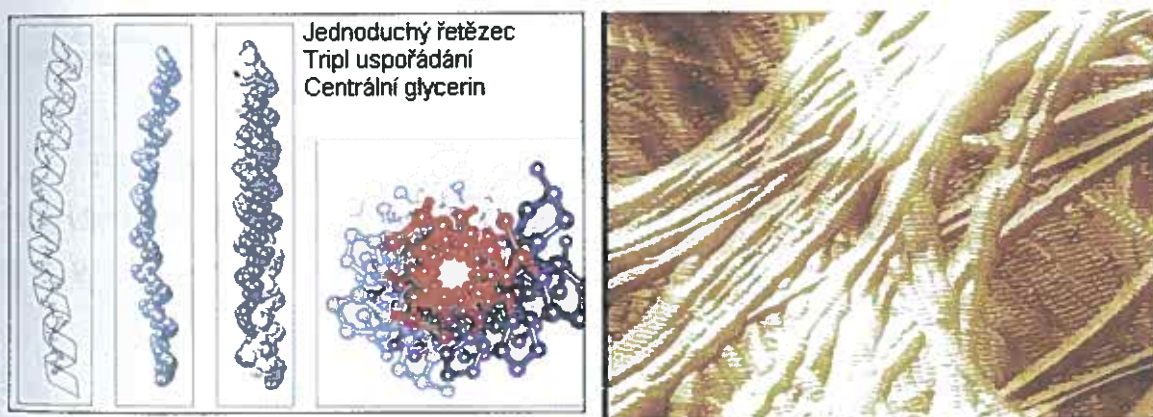


Ukotvení proteinů ECM¹²

Kolagen

Největší skupina vláknitých molekul ECM je „kolagenová rodina“. Jde o hlavní proteinovou složku pojivových tkání a bazální membrány. Vyskytuje se v mnoha formách, které se liší v pevnosti, v tahu a v lokalizaci tkání. Jde o kolagen typu I, II, III, IV, VI, VII, IX a prokolagen.

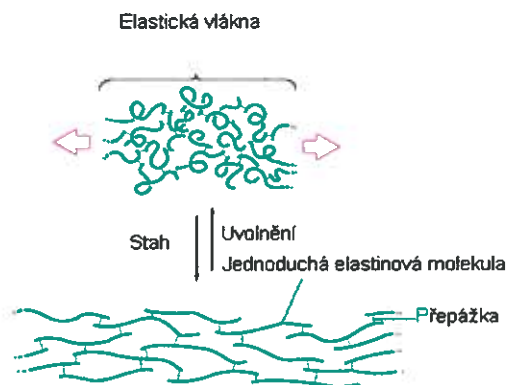
Kolagen je v pokožkové matrix složen primárně z kolagenů typu I (80-85%) a typu III (8-11%). Oba kolageny jsou vláknitého nebo „pruhového“ tvaru. Díky převaze těchto vláknitých kolagenových molekul má pokožka silovou roztažitelnost. Kolagen je tvořen třemi proteinovými řetězci. Kolagen typu I je formován ze dvou pro- $\alpha 1(I)$ a jednoho pro- $\alpha 2$ polypeptidového řetězce. Kolagen typu III se skládá ze tří $\alpha 1(III)$ řetězců. Díky přítomnosti cysteinu v N-terminální části řetězců dochází k tvorbě disulfidických vazeb a zároveň se vytváří typická triphelikální struktura. Kolagenové molekuly se následně přemostují přiléhajícími kolagenovými molekulami a podporují tak sílu a stabilitu kolagenových vláken.



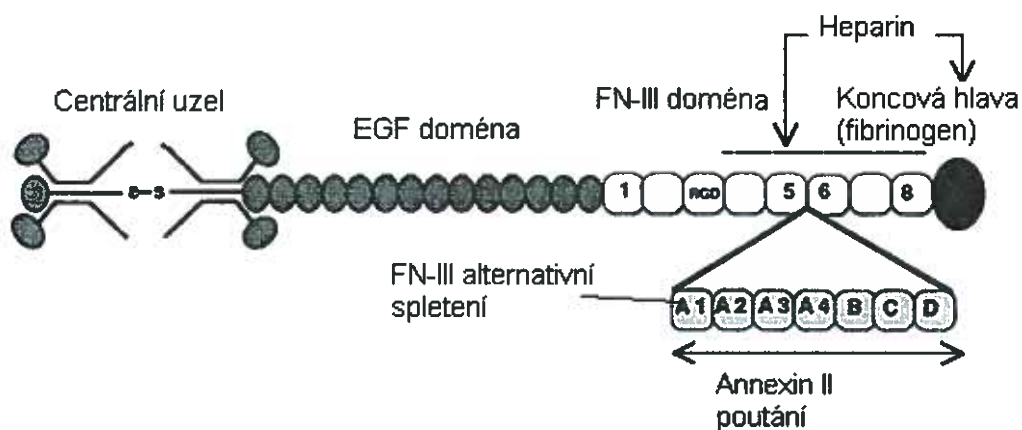
Kolagen ^{7,8}

Elastin

Mnoho tkání potřebují být silné i pružné, aby mohly plnit své funkce. Síť elastinových vláken v ECM udává možnost pohybu při stažení. Hlavní částí elastinových vláken je elastinová molekula umístěná v jádře vláken a kryta fibrilinem, velkým glykoproteinem poutajícím elastin. Fibrilin je nezbytně nutný pro celistvost elastinových vláken.

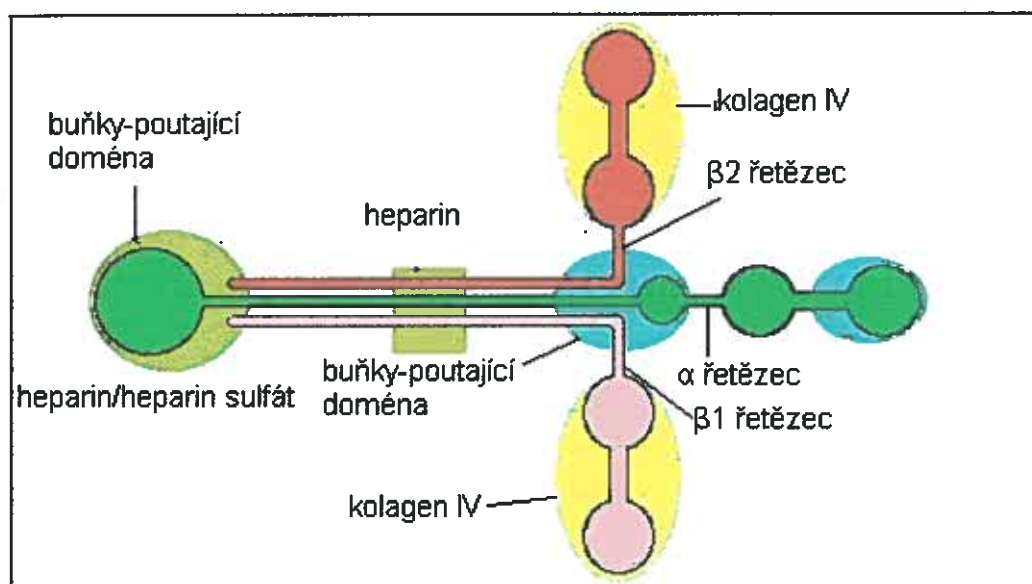
Elastin^{1,2}**Tenascin**

Tenascinová rodina glykoproteinů je zapojena do různých adhezivních interakcí ve vyvíjející se, dospělé i nádorové tkáni. Nejvíce známými izoformami jsou tenascin C, X, R, Y, W.

Struktura tenascinů⁴

Laminin

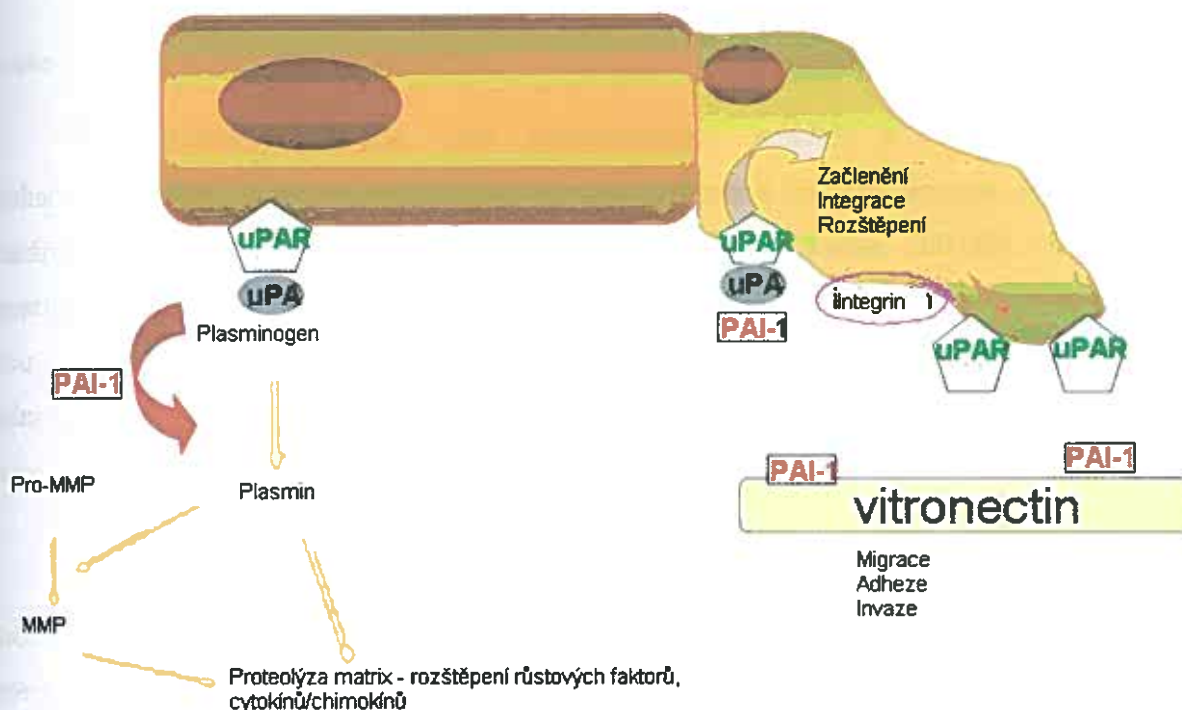
Laminin je velký, nekolagenový protein s různou biologickou funkcí zahrnující diferenciaci, migraci a adhezi buněk. Laminin je komplex tvořený třemi různými polypeptidovými řetězci (α , β , γ), které jsou navzájem poutány disulfidickými vazbami. Tvarem molekuly je kříž s jednou dlouhou a třemi krátkými částmi s globuly na koncích, které se poutají do typu IV kolagenových molekul. Proteoglykan heparan sulfát a specifické proteiny v membráně plazmy se nazývají integrinové receptory. Ty dávají možnost lamininu působit jako multiadhezivní proteinová matrix tvořící přemostění mezi buňkami a bazální membránou.

Laminin³**Merozin (Laminin-2)**

Merozin je přidružený protein bazální membrány ECM podobný ve své velikosti a struktuře ostatním lamininům. Nachází se v placentě, periferním nervstvu a jde o predominantní variantu v bazální membráně kosterních svalů. Defekt v tomto proteinu vede ke vrozené svalové dystrofii. Proteinová struktura se skládá ze 3 lamininových řetězců.

Vitronektin

Vitronektin je glykoprotein s vysokou molekulovou hmotností nacházející se v ECM a krevní plazmě, která podporuje buněčnou adhezi a ovlivňuje buněčnou morfolonii, migraci, diferenciaci a cytoskeletární organizaci. Buněčná migrace je základní funkcí normálních buněčných procesů jako jsou embryogenetický vývoj, angiogeneze, hojení ran, imunitní vlastnosti a zánět. Buněčná migrace je řízena různými faktory. Jedněmi z nich jsou také povrchové adhezivní receptory umožňující poutání buněk k proteinům ECM.



Role vitronektinu ⁵

Fibronektin

Fibronektin je důležitý glykoprotein. Nachází se v krevní plazmě v rozpustné formě (250 kDa podjednotek spojených disulfidickými vazbami). Nerozpustné formy, formálně nazvány „globuliny nerozpustné v chladu“ (cold-insoluble globulin), jsou velké komplexy zesíťovaných podjednotek. Je známo několik izoform fibronektinu a všechny jsou produkovány jedním genem. Strukturu izoformy tvoří 3 typy opakujících se částí (I-III), které naznačují rozdílnou délku a přítomností nebo absencí disulfidických vazeb. Alternativní spojení pre-mRNA vede ke kombinaci těchto 3 typů částí, ale také k dalším částem.

Fibronektin se zapojuje do hojivého procesu, a proto může být použit jako terapeutický agens. Je to jeden z nových proteinů, kde byla zjištěna zvýšená produkce s věkem bez vztahu k patologii. Polymerované formy fibronektinu inhibují růst tumoru a metastáz, ale i angiogenezi. Fibronektin je multifunkční a dokáže poutat integriny stejně jako komponenty ECM, které obsahují kolagen, fibrin a heparin. Poutání fibronektinových molekul k integrinovým receptorům buněk vede ke stimulaci signální dráhy, která podporuje připojení buněk, migraci a diferenciaci. Tyto charakteristiky umožňují fibronektinu hrát důležitou roli v buněčné adhezi a signální komunikaci mezi buňkami a komponentami ECM.

Proteoglykany a glykosaminoglykany

Proteoglykany chápeme jako glykoproteiny, v nichž hmotnostně převažuje sacharidová složka. Vznikají v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Jde o dlouhé lineární řetězce tvořené proteinem o molekulové hmotnosti kolem 200 000, na které se prostřednictvím serinu či treoninu váží molekuly glykosaminoglykanů. Glykosaminoglykany jsou polysacharidy skládající se z opakujících se disacharidových jednotek. Disacharidové jednotky jsou složeny z alternativních hexauronových kyselin a hexosaminových zbytků, které jsou obvykle vysoce sulfatované a jsou silně hydrofilní.

Mezi nejčastější glykosaminoglykany patří kyseliny hyaluronová, dermatan sulfát, chondroitin sulfát, heparan sulfát (viz příloha) a keratan sulfát. Obvyklé je, že poslední část řetězce váže celou molekulu na kyselinu hyaluronovou.

Díky vysoké hydrofilitě řetězců, vtahují do své struktury velké množství vody a výsledkem je změna „hmoty“ ve strukturu gelu s velmi nízkou koncentrací. Proteoglykany jsou důležité pro adhezi buněk a regulaci signálního přenosu mezi buňkami. Například heparin sulfátové řetězce se poutají k různým růstovým faktorům. Mohou prodlužovat zánětlivou odezvu tím, že se poutají na povrch endoteliálních buněk molekuly chemokinů. Zároveň se předpokládá, že modifikují proteolytické prostředí rány.

7. Metaloproteinázy Matrix (MMPs)

MMPs je skupina enzymů s podobnou strukturou (proteázy závislé na zinku), které byly objeveny ve spojitosti se schopností degradovat proteiny extracelulární matrix jako jsou kolagen a elastin. Seznam známých substrátů se stále zvětšuje a zahrnuje také některé nematrixové proteiny vybrané biologické aktivity. U bezorbatých byly identifikovány u mořského ježka, *Caenorhabditis elegans*, soji a *Arabidopsis thaliana*.

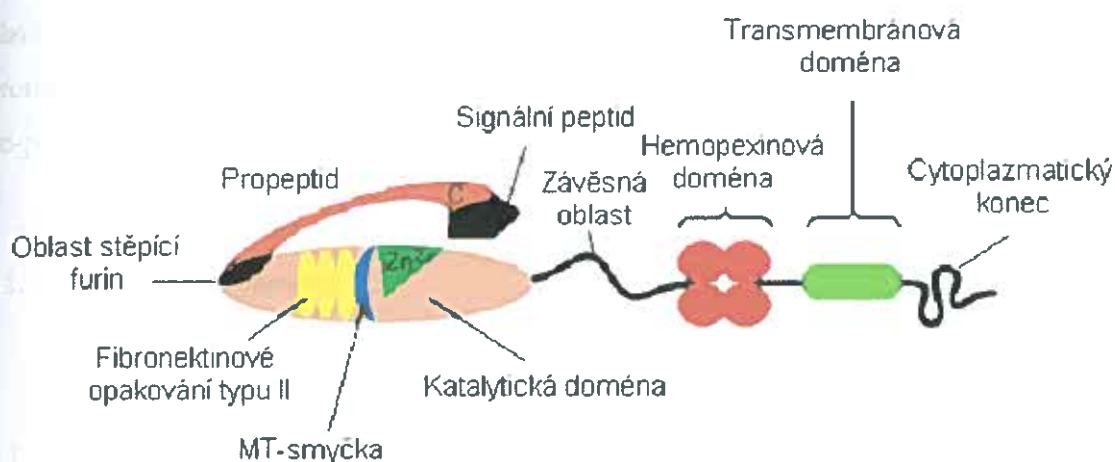
MMPs jsou produkovány mnoha buňkami. Jmenujme např. endoteliální buňky, hladkosvalové buňky či makrofágy.

Včasné odstranění ECM je podstatné pro embryogenezi, morfogenezi, reprodukci, tkáňovou resorpci a remodelaci. MMPs hrají v těchto procesech rozhodující roli. Expres většiny MMPs je regulována transkripcí růstových faktorů, hormonů, cytokinů a buněčnou transformací. Proteolytická aktivita MMPs je kontrolována řízenou aktivací z prekurzorů a inhibicí endogenními inhibitory, α -makroglobuliny a tkáňovými inhibitory metaloproteináz (TIMPs).

Poprvé MMPs popsali pánové Sermone Gross a Charles Lapiere roku 1962, kdy sledovali degradaci tripl-helix kolagenu. Enzym byl nazván intersticiální kolagenáza (MMP-1). Později byl „očištěn“ od lidské pokožky a byla zjištěna možnost syntézy jako zymogenu.

7. 1. Struktura

MMPs jsou tvořeny běžnou doménovou strukturou. Tři běžné domény jsou pro-peptidové (katalytická doména) a hemopexinová C-koncová doména, která je spojena s katalytickou doménou flexibilní „závěsnou oblastí“.



Základní doménová struktura
MMP-7, MMP-26



Kolagenázy, stromelyzin a další
MMPs: MMP-1, MMP-3, MMP-8,
MMP-10, MMP-12, MMP-13,
MMP-19, MMP-20, MMP-27



Gelatinázy MMP-2, MMP-9



Furin-aktivované MMPs:
MMP-11, MMP-21, MMP-28



MMPs membránového typu:
MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP,
MT5-MMP



Variabilita domén⁽⁹⁾

7. 1. 1. Pro-peptid

MMPs jsou primárně syntetizovány jako inaktivní zymogeny s pro-peptidovou doménou, která musí být odstraněna před aktivací enzymu. Pro-peptidová doména (cca 80 AMK) je částí „cysteinového přepínače“, který obsahuje cysteinové zbytky. Má vždy zachovanou PRCG(V/N)PD sekvenci s výjimkou MMPs-23, kde chybí. Cytosin obsažen v této sekvenci („cysteinový vypínač“) ovlivňuje katalýzu zinku. Zabraňuje poutání a štěpení substrátů držících enzymy v inaktivní formě a podporuje tím latenci pre-MMPs. Stromelyzin 3 (MMPs-11) a MMPs -23 mají pro-peptidovou sekvenci RX(K/R)R na C-konci pro-peptidu. MMPs-11 a MMPs-14 jsou aktivovány intracelulárně furinem.

7. 1. 2. Katalytická doména

Rentgenová krystalografie struktury některých MMP katalytických domén naznačuje, že tyto domény mají zploštělý tvar (3,5 x 3,0 x 3,0nm). Aktivační část je charakterizována rýhou 2nm silnou a prochází katalytickou doménou.

Katalytická doména (asi 170 AMK) obsahuje Zn^{2+} ionty, které jsou poutány třemi histidinovými rezidui a vytváří konzervativní sekvenci HExxHxxGxxH. Zachovává metionin, který následně formují „MET-točivou“ strukturu. Tato doména se skládá z pěti točitých částí – β -pás, 3 α -helix a přemostňující smyčky. Zmíněná „backbone“ struktura obsahující „met-točivou“ část je podobná členům dalších metaloproteinázových rodin. Katalytické domény MMPs mají ve své struktuře zinečnatý iont a 2-3 vápenaté ionty, které jsou významné pro stabilitu a expresi enzymatické aktivity. MMP-2 a MMP-9 mají tři opakující se domény fibronektinového typu II, které jsou součástí katalytické domény. Interagují s kolageny a želatinami.

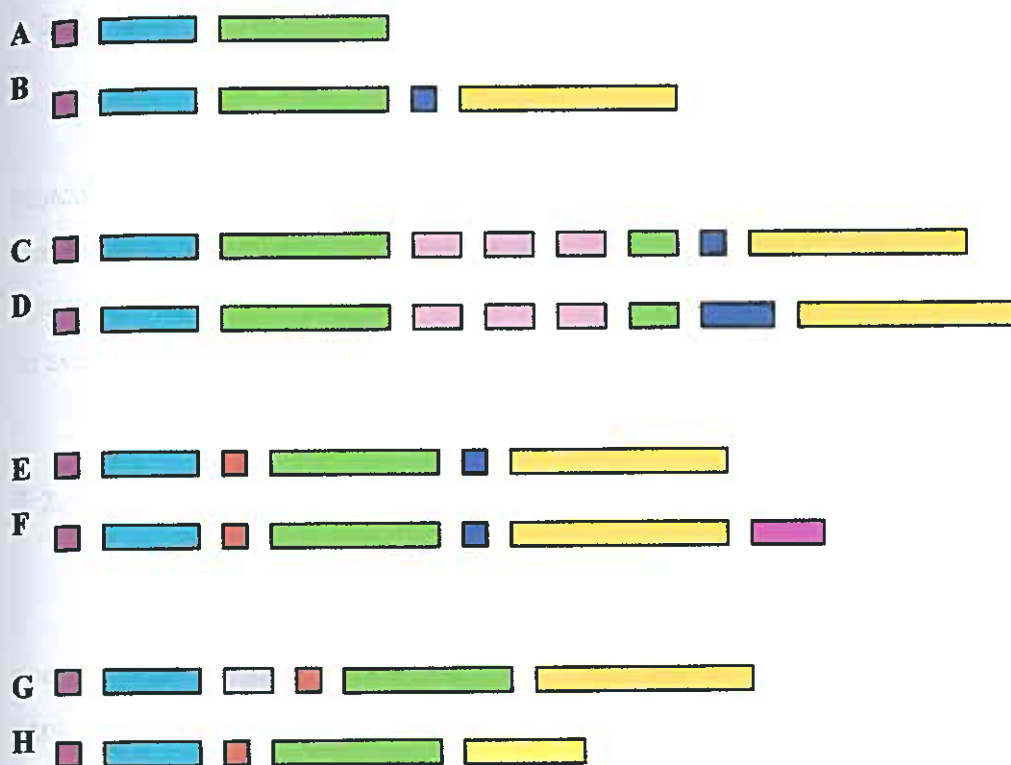
7. 1. 3. „Závěsná oblast“

Katalytická doména je připojena k C-koncové doméně pomocí flexibilní „závěsné“ nebo-li spojovací oblasti. Je dlouhá více než 75 AMK a má neměnnou strukturu.











7. 1. 4. Hemopexinová C-koncová doména

Hemopexinová C-koncová doména (asi 210 AMK) má tvar elipsoidního disku se čtyřmi částmi stočenými do β -šroubovice. Každá část je tvořena čtyřmi antiparalelními β -proužky a α -helix. Struktura poskytuje větší povrch pro interakci protein-protein. Jde o specifickou a neměnnou strukturu a je místem interakce s TIMPs

Hemopexinová doména je absolutním požadavkem pro kolagenázy, aby dokázaly štěpit tripl helikální intresticiální kolagen, ačkoli samotné katalytické domény udržují proteolytickou aktivitu pro další substráty. Hemopexinová doména chybí v MMP-7, MMP-23, MMP-26, rostlinách a nematodách.

Řazení domén¹⁴

Legenda

	Signální proteiny		Propeptidové domény
	Katalytické domény		Linker (spojovník)
	Fibronektinový typ domény		Hemopexinová doména
	Linker, transmembránová & cytoplazmatická doména		
	Natažené s Furin-rozpoznávající sekvencí		
	Vitronectinová doména		
	Receptorová doména bohatá na Cys, Pro & IL-1		

7. 2. Klasifikace

7. 2. 1. Umístění MMPs v rodině peptidáz

MMPs jsou reprezentovány rodinou asi 20 členů transmembránově poutajících proteolytické endopeptidázy. MMP rodina endopeptidáz je součástí velké skupiny proteáz nazývaných metzinciny (podle své zinek-vázající domény a strukturálně důležitého C-konce s metioninovými zbytky). Tyto enzymy mají běžný zinek-poutající motiv (HExxHxxGxxH) ve své aktivační části. Další členové metzincin jsou seralyziny, astaciny a adamalyziny.

7. 2. 2. Podskupiny MMPs

Jednotlivé MMPs můžeme definovat z hlediska domén (viz výše). Běžně se ovšem používá členění na základě specifiky substrátu a částečné buněčné lokalizace. Jde např. o kolagenázy, gelatinázy, stromelyziny. Stále více je dokazováno, že toto dělení je poněkud umělé. Např. jsou členové MMPs, kteří se nehodí do žádné z tradičních skupin.

- *Kolagenázy*

Tyto MMPs jsou schopné degradovat vláknitou trojšroubovici kolagenu na zvláštní $\frac{3}{4}$ a $\frac{1}{4}$ fragmenty. Tyto kolageny jsou hlavními komponentami tkání, kostí a chrupavek. MMPs jsou jedinými známými enzymy obratlovců, které je dokáží rozkládat. Řadíme sem **MMP-1** (intersticiální kolagenáza), **MMP-8** (neutrofilní kolagenáza), **MMP-13** (kolagenáza 3) a **MMP-14** (MT1-MTP), která je navíc schopná štěpit vláknitý kolagen.

- *Gelatinázy*

Hlavními substráty jsou kolagen typu IV a gelatin. Tato oblast je umístěna hned před zinek-poutající částí. Členy této rodiny jsou **MMP-2** (72 kDa gelatináza, gelatináza-A) a **MMP-9** (92 kDa gelatináza, gelatináza-B).

- *Stromelyziny*

Tyto enzymy mají širokou schopnost štípat proteiny ECM, ale nejsou schopné štěpit vláknitou trojšroubovici kolagenu. **MMP-3** (stromelysin-1), **MMP-10** (stromelysin-2) a **MMP-11** (stromelysin-3).

MMP-3 dokáže degradovat především makromolekuly nekolagenových pojivových tkání. Jmenovitě proteoglykany, fibronectin, laminin a kolagen typu IV (nikoli však kolagen typu I). Bylo zjištěno, že aktivuje matrilysin (**MMP-7**), a že stromelyzin I a matrilysin poté během tkáňové remodelace vzájemně interagují.

- *Matriliziny*

Do této rodiny řadíme **MMP-7** (matrilysin, PUMP) a **MMP-26** (matrilysin, endometáza).

- *Membránu-poutající MMPs*

Jmenovitě jde o **typ-II transmembránového cysteinu MMP-23**, glykosylfosfatidylinozitol připojený k **MMP-17** a **MMP-25** (**MT4-MMP** a **MT6-MMP**), **typ-I transmembránových MMPs 14, 15, 16, 24** (**MT1-MMP**, **MT2-MMP**, **MT3-MMP** a **MT5-MMP**).

- *Další MMPs*

Zde uvádíme metaloproteinázy, které nemají přesně definovanou rodinu. **MMP-11** (stromelyzin 3), **MMP-12** (makrofágová metaloelastáza), **MMP-19** (**RASI-1**, občas označována jako stromelyzin-4), **MMP-20** (enamelyzin), **MMP-21** (**X-MMP**), **MMP-23A** (**CA-MMP**), **MMP-23B**, **MMP-27** (**MMP-22**, **C-MMP**) a **MMP-28** (epilyzin).

MMPs	Alternativní jméno	Substrát	Mr (kDa) Latentní/aktivní	Protein	Monoklonální protilátky	Domény
MMP-1	Kolagenaza-1 Fibroblastová kolagenaza Intersticiální kolagenaza	Kolagen I, II, III, VII, VIII, X Gelatin	52/43	*	*	B
MMP-2	72 kDa Gelatinaza Typu IV Kolagenaza	Kolagen I, II, III, V, VII, X Elastin Fibronektin Gelatin Prokolagenaza-3	72/62	*	*	C
MMP-3	Stromelyzin-1 Tranzin Proteoglykanaza	Kolagen III, IV, V, IX Kolagenaza-1 Entaktin Fibronektin Gelatin Laminin Proteoglykany SPARC	52/43	*	*	B
MMP-7	Matrilysin PUMP	Kolagen IV Elastin Entaktin Fibronektin Gelatin Laminin Tenascin	28/19	*	*	A
MMP-8	Neutrolily Kolagenaza Kolagenaza-2	Kolageny I, II, III	75/55	*	*	B
MMP-9	92 kDa Gelatinaza Gelatinaza B	Kolageny IV, V Elastin Gelatin	92/82/65	*	*	D
MMP-10	Stromelyzin-2	Kolageny III, IV, V, IX Fibronektin Gelatin Laminin Proteoglykany	52/44		*	B
MMP-11	Stromelyzin-3	Fibronektin Laminin α -1-proteinazový inhibitor	51/46	*	*	E

MMPs	Alternativní jméno	Substrát	Mr (kDa) Latentní/aktivní	Protein	Monoklonální protilátky	Domény
MMP-12	Makrohagy Metaloelastaza	Elastin Fibrogen Fibronektin	52/20	*	*	B
MMP-13	Kolagenaza-3	Agrekan Kolageny I, II, III Gelatin Tenascin	52/42	*	*	B
MMP-14	MT1-MMP	Kolageny I, II, III Fibronektin Prokolagenaza-3 Progelistinaza A Pro-MMP-2 Proteoglykany	64/54	*		F
MMP-15	MT2-MMP	Progelistinaza A	71/61	*	*	F
MMP-16	MT3-MMP	Kolagen III Fibronektin Gelatin	68/65	*	*	F
MMP-17	MT4-MMP	Fibrin/Fibrinogen Gelatin	62/51	*		F
MMP-18	Xenopus Kolagenaza-4 Kolagenaza-4	Kolageny I, II, III	70/53	*		B
MMP-19	RASI	Gelatin Agrekan	58/45			B
MMP-20	Enamelyzin	Amelogenin	50/22			B
MMP-21	MMP-23a, Femalyzin	Gelatin	70/53			G
MMP-22	MMP-23b, Femalyzin	Kasein	51/42			
MMP-23	Cystein. matrice MMP, CAMMP MIFR	Gelatin	45/35			H
MMP-24	MT5-MMP	Fibronektin Proteoglykany Gelatin	74/68	*		F
MMP-25	MT6-MMP	Progelistinaza A	62/			F
MMP-26	Matrilyzin-2	Fibrinogen Fibronektin	30/19			A
MMP-27		Vitronektin	60/48			B
MMP-28	Epilyzin	Kasein	60/45			G

Domény¹⁴

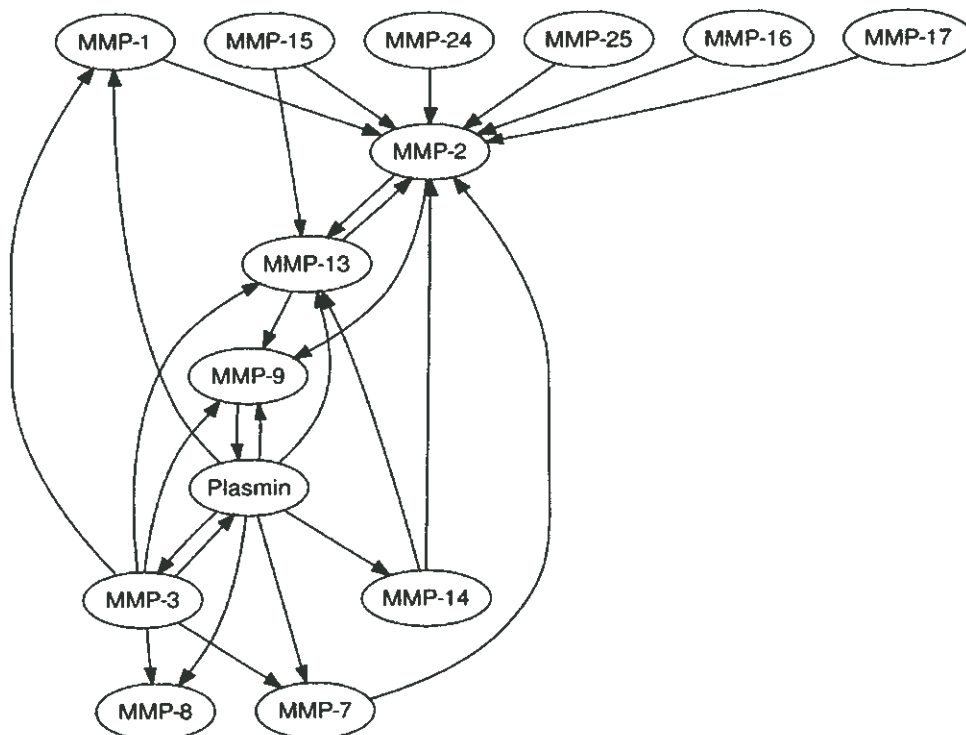
7.3. Funkce a aktivace

MMPs hrají důležitou roli v tkáňové remodelaci ve spojitosti s různými fyziologickými procesy. Jde o morfogenezi, angiogenezi, embryogenezi, implantaci blastocytu, hojení ran, tkáňovou opravu, růst nervů, ovulaci, cervikální dilataci, poporodní involuci dělohy, remodelaci kostí či apoptózu. Asociují se také s patologickými procesy jako je artritida, rakovina, kardiovaskulární onemocnění, nefritida, neurologická nemoc, selhání krevní mozkové bariéry, kožní ulcerace, gastrické vředy, vředy rohovky, ledvinná fibróza, emfyzém, plicní fibróza aj.

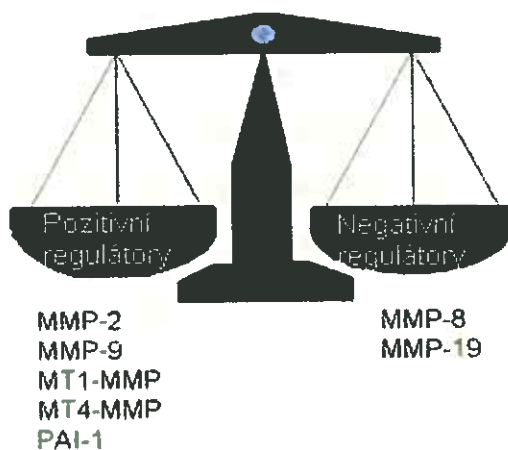
Hlavní funkcí je však vyjmutí ECM během tkáňové resorpce a progresu mnoha onemocnění. MMPs pozměňují biologické funkce ECM makromolekul specifických proteolýz.

Byly analyzovány některé MMPs (MMP-1, -2, -3, -8, -9), jenž jsou zapojeny do procesu hojení (Baker a Leaper, 2003). Byly pozorovány rozdílné hladiny MMPs a TIMPs v závislosti na fázi hojení. Nejvyšší hladina MMP-9 byla pozorována první den a postupně se snižovala do sedmého dne. Předpokládalo se, že neutrofilů a monocytů uvolňují MMP-9 a dochází k disoluci v membránových komponentách a přechází do prostředí rány. Aktivita MMP-2 byla první den nejnižší a zvyšovala se do šestého dne a významně se podílela na výstavbě granulací tkáně a začátku remodelace. MMP-8 je kolagenáza produkovaná hlavně neutrofilů, které se podílejí na zahájení zánětlivého procesu při hojení. Nejvyšší hladiny jsou v tekutině patrné první dva až tři dny.

MMPs jsou sekretovány jako proenzymy a poté jsou štípány, aby se aktivovaly. Jedním ze zvláštních rysů MMPs je skutečnost, že mnoho jejich genů má schopnost indukce. Řada MMPs, jmenovitě MMP-1, MMP-3, MMP-7 a MMP-9, serinové proteázy jako plasmin, plazminogenové aktivátory urokinázového typu a furin, jsou známy jako iniciátory aktivace MMP-2, MMP-3, MMP-9 a MMP-13.



Proteolytická aktivita je MMPs kontrolována řízenou aktivací z prekurzorů, inhibicí endogenními inhibitory, α -makroglobuliny, a tkáňovými inhibitory metaloproteináz (TIMPs).



7. 3. 1. Genová exprese

Jedním ze zvláštních rysů MMPs je skutečnost, že mnoho jejich genů má schopnost indukce. Efektory představují růstové faktory, cytokiny, chemické agens (např. estery forbolu), fyzický stres, onkogenní buněčné transformace aj. Zvýšenou genovou expresí působí zároveň down-regulací pomocí supresivních faktorů (transformující růstový faktor β , retinoová kyselina, glukokortikoidy). V genové expresi MMPs nezáleží pouze na rozpustných faktorech, ale také na buněčné matrix a interakcích buňka-buňka.

Správná signalizace vede k expresi jednotlivých MMPs genů. Zánětlivé cytokiny, TNF- α a IL-1 spouští cestu signalizace ceramidů. Ceramidová exprese MMP-1 ve fibroblastech lidské kůže je zprostředkována třemi cestami MAP-kináz. Ozáření UVB vede k up-regulaci exprese MMP-1, MMP-3 a MMP-9 v lidských kožních fibroblastech. Expozice lidské pokožky UVB *in vivo* aktivuje receptory epidermálních růstových faktorů s zároveň stimulují cesty MAP-kináz, které prostřednictvím fosforylace vedou ke zvýšení exprese MMPs.

7. 3. 2. Aktivace pre-MMPs (buněčná aktivace pro-MMP-2)

Na rozdíl od několika členů aktivovaných furinem, je většina MMPs sekretována z buněk ve formě zymogenu. Sekretované pro-MMPs jsou aktivovány *in vitro* pomocí proteáz a neproteolytických agens, rtuťovými sloučeninami, reaktivním kyslíkem, a denaturováním. Ve všech případech aktivace dochází k rozštěpení díky interakci Cys-Zn²⁺, a postupným přetvořením propeptidových postupů. *In vivo* je mnoho pro-MMPs aktivováno tkáněmi nebo plazmatickými proteázami, případně bakteriálními proteázami. Aktivace pro-MMP-2 probíhá primárně na buněčném povrchu.

7. 4. Inhibitory (TIMPs)

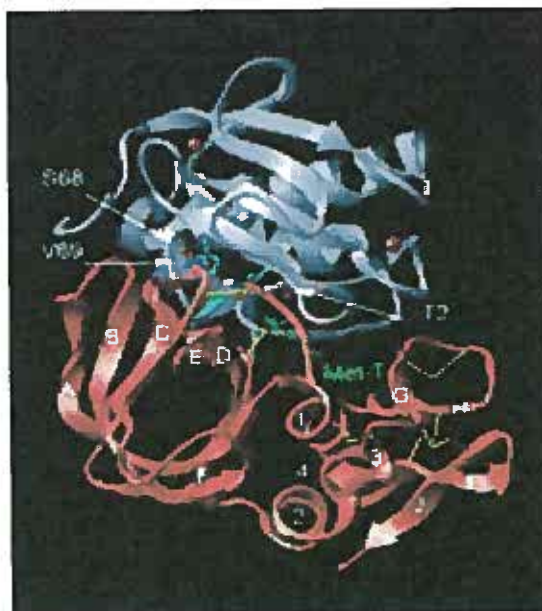
7. 4. 1. Struktura a klasifikace

TIMPs jsou molekuly o velikosti 21-29 kDa. Skládají se ze 2 domén. N-terminální inhibitorové domény a C-terminální vázající domény. Existují 4 homologní lidské TIMPs (TIMP-1 až 4). Všechny MMPs jsou inhibovány TIMP-1, ale gelatináza (MMP-2 a MMP-9) může být komplexně ovlivňována TIMPs za předpokladu, že jsou enzymy v latentní formě.

7. 4. 2. Funkce a mechanismus působení

Jde o hlavní endogenní regulátory MMP aktivity ve tkáních a tělních tekutinách. Inhibicí MMPs aktivity se podílejí na remodelaci tkáně ECM. Rovnováha mezi MMPs a TIMPs aktivitou je rozhodující jak v normálních tak v patologických procesech. Inhibují buněčnou invazi *in vitro* a angiogenezi. TIMP-2 inhibují fibroblastové růstové faktory a tím indukují endoteliální buněčný růst.

Specifické inhibitory všeobecně obsahují chelátové skupiny a chelatovně poutají zinečnaté atomy v MMP aktivačním místě. Běžné chelatovné skupiny obsahují hydroxamáty, karboxyláty, tioláty a fosfinyly. Hydroxamáty jsou částečně potenciální inhibitory MMPs a dalších zinek-dependentních enzymů v důsledku jejich "dvozubého" chelátu zinečnatého atomu. Mezi TIMPs a katalytickou doménou MMPs se v okolí disulfidické vazby mezi Cys¹ a Cys⁷⁰ tvoří krystalická struktura. N-terminální α -AMK a karboxylová skupina Cys¹ koordinuje katalýzu Zn²⁺. TIMPs jsou poutané jednoduchými vazbami a tvoří delší vláknité smyčky. Proteinázové poutání zapříčiňuje interní rotaci mezi N-koncovou a C-koncovou doménou (13°) a další lokální konformační změny.



Komplex TIMP-1 a MMP-3 ⁶

7. 5. Disintegrin a Metaloproteinázy (ADAMs)

Jde o členy stejné nadrodiny jako MMPs, jmenovitě metzinciny. Název ADAMs zahrnuje jak „Disintegrin a Metaloproteinázy“ tak ADAM proteiny. Jde o buněčné proteiny, které mají obě adhezivní domény a také proteázovou doménu. Tato rodina proteinů zahrnuje více než 35 členů. Vlastní funkce mnoha členů nejsou doposud známy. Známa je např. funkce ADAM17 – TNF- α -konvertující enzym).

Často se sem řadí třída ADAM proteinů nazývaná ADAMTS proteiny. Jsou strukturálně homologní k ADAMs proteinům, ale obsahují nejméně 1 C-konec s repeticí trombospondinového typu 1 a sekretují se snadněji než členové poutaní vazbou. ADAMTS-1 a ADAMTS-8 jsou inhibitory angiogeneze a ostatní jako ADAMTS-5 štěpí extracelulární proteoglykany.

Známé druhy ADAMs a ADAMTS:

ADAM2 [Fertilin- β]

ADAM3 [Cyritestin]

ADAM8 [MS2; CD156a]

ADAM9 [Meltrin- γ]

ADAM10 [Kuzbanian]

ADAM12 [Meltrin- α]

ADAM15 [Metargidin MDC15]

ADAM17 [TACE; CD156b]

ADAM19 [Meltrin- β]

ADAM20

ADAM21

ADAMTS-1 [METH 1]

ADAMTS-2 [PCNP]

ADAMTS-4 [Aggrecanase 1]

ADAMTS-5 [Aggrecanase 2]

Kistrin

7. 6. Další matrix-asociované proteiny

BM180

Jde o novou komponentu bazální membrány, která reguluje slzní sekreci.

Katespin

Jde o skupinu proteáz s různými funkcemi. Některé jsou lysozomálními proteázami, jiné mají významnou roli v imunitním systému (role antigenů), může být endo- i exopeptidázou se schopností štěpit proteiny na konci nebo uprostřed. Klasickými katespiny jsou katespin B a D. Ale rodina katespinu se skládá z mnoha členů - C, E, G, H, J, K, L, M, Q, R, S, W, Z.

Urokináza a asociované proteiny

Urokináza (uPA) umožňuje konverzi plazminogenu na plazmin, který poté degraduje fibrinovou zátku stejně jako fibrinogen a další proteiny plazmy. Jde o důležitou regulaci aktivity a exprese proteolytických enzymů podílejících se na degradaci ECM v asistenci leukocytoendoteliální buněčné interakce. Následuje odvod do zánětlivé oblasti cestou β -2 integrinů a uPA receptorů.

Funkce plazminogenových aktivátorů urokinázového (uPA) a tkáňového typu (tPA) je řízena a kontrolována inhibitory plazminového aktivátoru (PAI's). Tento inhibitor je členem nadrodiny inhibitorů serinových proteáz (serpin) a jde o centrálně regulované proteiny krevního koagulačního systému. Tyto unikátní serpiny se vyznačují odlišnou aktivní a inaktivní konformací *in vivo*. Lidský PAI-1 je jednořetězcový glykoprotein s Mr 43 kDa. Jeho rychlá interakce s tPA je klíčovým bodem v regulaci fibrinolýzy.

8. Experimentální část

8. 1. Použitý zvířecí model

Aktivitu MDOC™ jsme zjišťovali na zdravých samcích potkanů kmene Wistar (Bio Test s. r. o., Česká republika) o hmotnosti 250-300g a stáří v rozmezí 6-8 týdnů. Vše za souběžné kontroly hojení bez aplikace. Taxonomické zařazení:

Třída: Savci (*Mammalia*)

Řád: Hlodavci (*Rodentia*)

Čeleď: Myšovití (*Muridae*)

Rod: Krysa (*Rattus*)

Druh: Potkan (*Rattus norvegicus*)

Zvířata jsme chovali v oddělených klecích ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Zajistili jsme ventilaci vzduchu pro otevřené chovy, teplotu v rozmezí 22 - 24°C, vlhkost vzduchu od 30 do 70 %. Zajištěn byl volný přístup zvířat ke standardní peletizované stravě (kompletní krmný premix pro myši a krysy pěstované v SPF, Velas, a. s. No 10382) a pitné vodě.

Všechny experimenty jsme prováděli v histologicko-morfologické laboratoři Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové a to v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. o ochraně zvířat proti týrání a pod odborným dohledem Etické komise Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Po ukončení experimentů byla všechna zvířata usmrcena zodpovědnou osobou. Celý pokus prošel kontrolou standardních laboratorních podmínek a byl navržen s ohledem na proces hojení zahrnující zánět, tkáňovou proliferaci a tkáňovou remodelaci.

8. 2. Metodika práce

48 samců potkanů jsme rozdělili do 17 skupin a využili k experimentům. K celkové anestezii jsme použili Narkamon (Spofa 1% inj.sol., Česká republika) v objemu dle velikosti zvířete v rozmezí 3-9 ml. Aplikace byla intraperitoneální injekcí do břišní dutiny.

Připravili jsme si operační pole oholením chlupů v oblasti šíje (třísla), omytím plochy vodou, 70% etanolem a zarouškovaním oblasti. V hřbetní šíjové oblasti jsme vytvořili jednu centrální kruhovou kožní ránu o průměru 15mm. Příslušný testovaný materiál MDOCTM jsme ve standardním množství nanášeli na místo poranění. Kontrolní skupiny byla „hojena“ pouze solným roztokem a ihned překryta klasickou bandáží. V časových intervalech 3., (5.), 7., 14., (21.) dnů po aplikaci jsme odebrali vzorky. Tkáň jsme fixovali, odvodnili, projasnili, prosytili a nakonec zalili do parafinu. Poté následovalo krájení bločků na mikrotonu, vlastní barvení, montování a hodnocení řezů pod mikroskopem. Prováděli jsme fotodokumentaci, makroskopická měření a odběry vzorků kožní tkáně pro histologické a imunohistochemické vyšetření.

8. 2. 1. Fixace

Fixace je denaturace bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky. Cílem je zabránit samovolnému rozkladu tkáně (autolýze). Ta je podmíněna působením enzymů a vede rychle ke změnám protoplazmy až k úplnému rozkladu buněk a tkání. Fixace musí být šetrná, abychom zachovali strukturu tkáně jaké jsou za živa. Fixace také musí zachovávat barvitelnost tkáně a musí do ní rychle pronikat. Odebraná tkáň musí být fixována co nejrychleji a to po dobu minimálně 24 hodin. Fixaci jsme provedli Bouinovou fixační tekutinou:

- Nasycený roztok kyseliny pikrové 300 ml
- Neutrální formol 100 ml

Před použitím jsme přidali 3-5ml ledové kyseliny octové na každých 100 ml roztoku.

8. 2. 2. Odvodnění a projasnění

K odvodnění vzorků jsme použili vzestupnou alkoholovou řadu. Samotný proces trvá 6-24 hodin. Projasněním pak chápeme odstranění etanolu ze tkáně a prováděli jsme ji rozpouštědlem parafinu xylenem (1-6 hodin). Vše dle standardních laboratorních předpisů Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

8. 2. 3. Prosycení a zalití do parafinu

Po prosycení, kdy teplota parafinu nesmí překročit 58 °C, jsme vzorky zalili do zkvalitněného a přefiltrovaného parafinu. Ten jsme získali tak, že jsme k přetavenému parafinu přidali 3-5g včelího vosku na 100g parafinu. Mezi tím jsme si vytvořili kovovou komůrku, do které jsme vložili fixovanou tkáň, zalili parafinem a na horní část přiložili plastovou destičku. Po ztuhnutí jsme bloček ořízli tak, aby okolní vrstva parafinu nepřesahovala 3-5mm. Tyto bločky jsme poté uchovávali v lednici.

8. 2. 4. Krájení, lepení na podložní sklíčka

Vzorky jsme krájeli pomocí sáňkového mikrotonu (Reichert, Leitz-Wetzlar). Bloček jsme nejprve nahrubo prokrájeli ke tkáni a pomocí mikrometrického šroubu jsme nastavili námi požadovanou tloušťku řezu (2-4 μm). Vhodné řezy jsme přenesli na podložní sklíčko, které jsme předtím potřeli směsí glycerolu a bílku a zakápli vodou. Důvodem je lepší napínání a fixace řezu na sklíčku.

8. 2. 5. Barvení a zamontování

Samotnému barvení předchází odparafinování řadou xylenů 3x po 5 minutách, dále sestupnou alkoholovou řadou (96%, 70%) po 5 minutách a dehydratace destilovanou vodou po 5 minutách. Pro základní morfologické studie jsme použili klasická barvení - zelený trichrom a hematoxylin-eozin dle standardních laboratorních postupů Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. V samotném závěru jsme obarvené řezy dali mezi podložní a krycí sklíčko do uzavíracího media. Medium musí být látka dokonale průhledná, nesmí poškozovat zbarvení tkáně a musí mít vysoký index lomu světla. V tomto případě jsme použili kanadský balzám.

8. 3. Aplikovaný materiál

K experimentům jsme používali MDOCTM, což je Mikro Dispergovaná Oxidovaná Celulóza. Tato substance je patentem irské firmy Alltracel (Patent Alltracel Pharmaceuticals, I. Santar et al GB2335921). Jde o kopolymer složený z opakujících se jednotek polyanhydroglukuronové kyseliny (PAGA) a polyanhydroglukozy o velikosti 50-500nm. Vyrábí se selektivní oxidací primární hydroxylové skupiny na C6 v molekule celulózy a následnou hydrolýzou.

Jde o přírodní materiál, který je bez nežádoucích účinků, alergií či kontraindikací. Byl prokázán jako efektivní a účinný agens při zástavě krvácení. Při malém říznutí, škrábnutí a povrchovém zranění nastává zástava krvácení do 1-2 minut. Zároveň se snižuje riziko znovuoobnovení krvácení. V rámci preklinických a klinických studií v Evropské unii je sledováno snižování cholesterolu a jeho možný benefit při koronárních onemocněních.

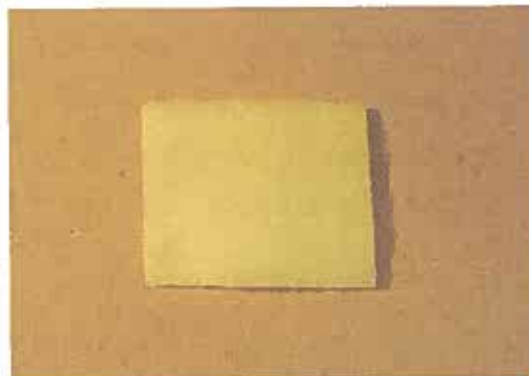
V této práci jsme se snažili signifikantně prokázat, zda dojde k urychlení procesu hojení akutní rány za použití materiálů obsahujících MDOCTM. Všechny výsledky jsme porovnávali s průběhem hojení za použití pouze solného roztoku v kombinaci s klasickým obvazem Hartmann-Ricko, s.r.o. Aplikovali jsme materiály s různými obsahovými látkami s cílem objasnit, zda aplikační forma či modifikace jejího složení významnějším způsobem ovlivní proces hojení ať už po stránce makroskopické (tvorba krusty) či mikroskopické (histologický nález). Níže je uveden soupis použitých materiálů, které jsou buď ve formě gelu či ve formě vláknité tkaniny.

- Nezesíťené nanovláknno 20% MDOCTM
- Nezesíťené nanovláknno 40% MDOCTM + 10% PEO
- Nezesíťené nanovláknno 20% MDOCTM + 40% PEO
- Nezesíťené nanovláknno 16% MDOCTM + 16% PVA + 10% glycerol
- Nezesíťené nanovláknno MDOCTM + PEO (4:2)
- Nezesíťené nanovláknno MDOCTM + Cu²⁺ sůl
- Nezesíťené nanovláknno MDOCTM + I₂
- Altracel gel MDOCTM 30 mg/g
- Altracel gel MDOCTM 10 mg/g

- Gel MDOCTM + CMC + kopolymer PEO/PPO
- Gel MDOCTM + Aquasorb A-500
- Gel MDOCTM



MDOCTM + 40% PEO



MDOCTM + 10% PEO



Gel MDOCTM



Gel MDOCTM + CMC + PEO/PPO



MDOCTM + PEO (4:2)

8. 4. Makroskopické a histologické hodnocení

8. 4. 1. Kontrolní skupina

Jak již bylo zmíněno výše, při každém experimentu byla paralelně testována a sledována tzv. kontrolní skupina (bez aplikace), přičemž postup celého experimentu byl ekvivalentní. U kontrolní skupiny jsme pozorovali vyšší prokrvenost a tvorba krusty probíhala rychleji. Baze rány byla bez sekrece a tvorba jizvy byla odpovídající hojení pomocí MDOC™.

0. den vytvořena rána.

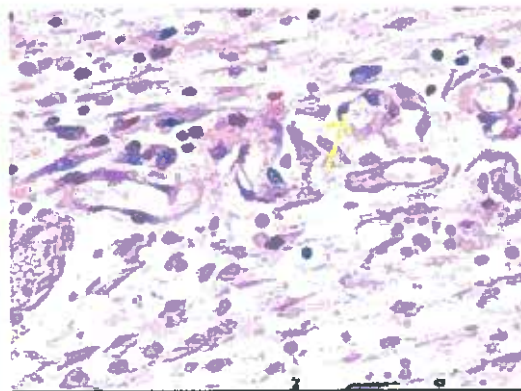


Kontrolní skupina

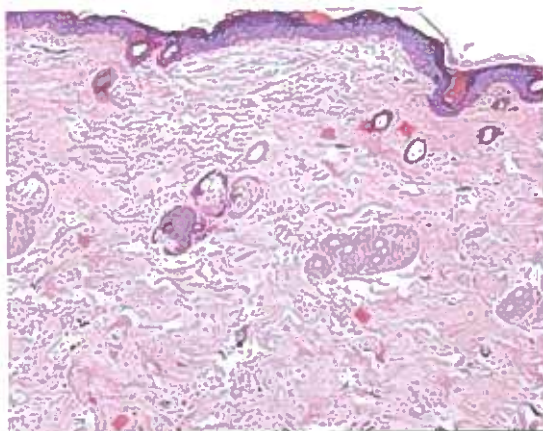
3. den nízká, suchá, žlutohnědá hemoragická krusta. Střed rány byl zpravidla vyšší než okraje a okolí rány. Okraje ohaničené, spodina čistá. Histologie prokázala zvýšené množství neutrofilů, monocytů a lymfocytů. Také přítomnost překrvených cév, fibroblastů a zánětlivého infiltrátu.



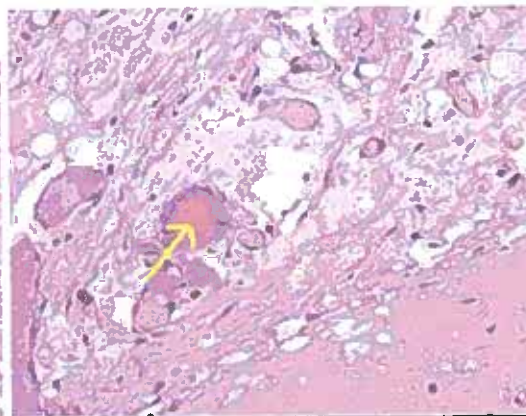
Kontrolní skupina



Tkáň s bohatou granulací a překrvené cévy
(H&E barvení, 40x)



Intaktní dermis
(H&E barvení, 10x)



Svazky kolagenových vláken,
prekrvené cevy
(H&E barvení, 20x)

5. den nízká krusta se zvlněnými okraji, hemoragickým centrem a čistou spodinou rány.



Kontrolní skupina

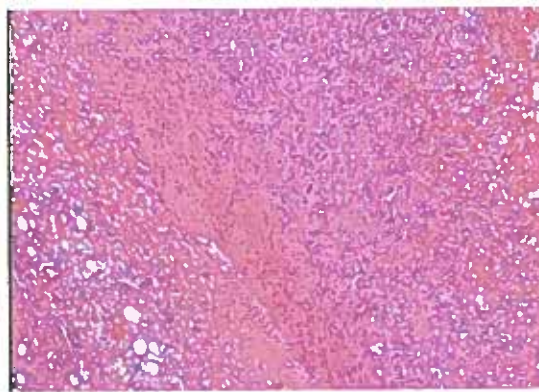


Kontrolní skupina

7. den nízká krusta s vlnitými hemoragickými okraji a čistou spodinou rány. Byla patrná hypergranulace a fibrinová zátka. Z laboratorních výsledků bylo zjištěno rozsáhlé spojení tkáně pomocí populace buněk. Barvení trichromem odhalilo početná ložiska leukocytů, makrofágů, fibroblastů a fibrocytů v ráně.



Kontrolní skupina

Defekt kůže s četnými buňkami, hyperemií
(H&E barvení, 10x)

14. den zhojená rána s jizvou. Histologicky prokázána remodelace epidermis a dermis.



Kontrolní skupina

Granulační tkáň s méně buňkami makrofágů
a tenčí epidermis(H&E barvení, 10x)

8. 4. 2. Pokus s MDOC™

U tohoto reprezentativního vzorku bylo na vytvořenou ránu aplikováno nezesítěné nanovláknno 40% MDOC™ + 10% PEO. Nebudeme zde uvádět výsledky všech výše zmíněných pokusů, protože rychlost hojení se při aplikaci různých materiálů MDOC™ výrazně nelišily.

0. den vytvořena rána.

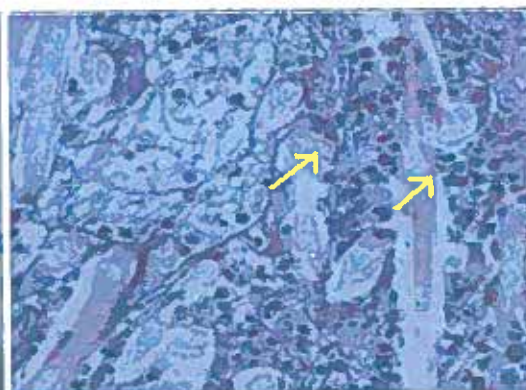


MDOC™ + 10% PEO

5. den světlejší, volnější krusta, která se na jedné straně odlupovala a krvácela. Konzistence byla pevná, spodina čistá. Histologie poukázala na bohatou granulaci v oblasti rány, přítomnost překrvených cév a fibroblastů v poškozené tkáni.

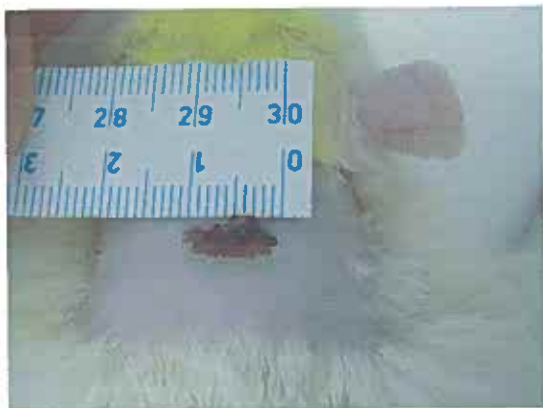


MDOC™ + 10% PEO



Oblast defektu se zbytky nanovláknna
(H&E barvení, 40x)

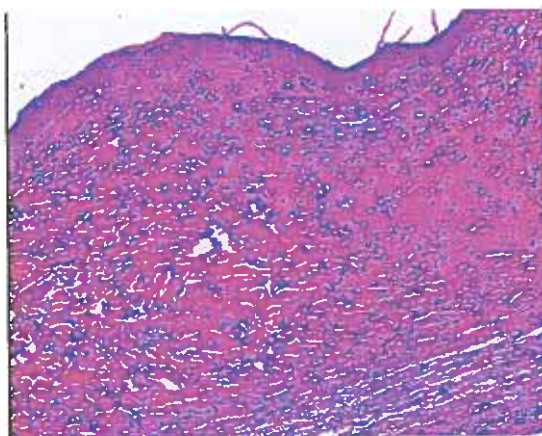
7. den vyšší zvlněná krusta s nepravidelnými a odlupujícími se okraji. Spodina rány byla čistá a vaskularizace byla dobrá. Z laboratorních výsledků byla patrná vysoká hustota matrix s přítomností mnoha buněk s dostatečným prokrvením.



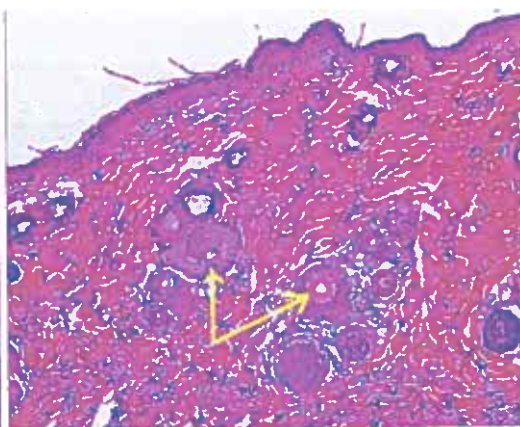
MDOC™ + 10% PEO



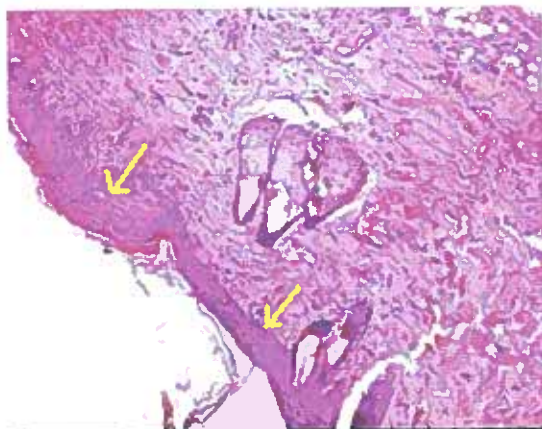
MDOC™ + 10% PEO



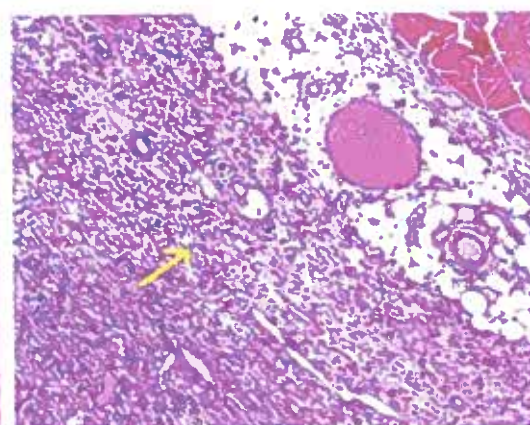
Oblast defektu s intaktní dermis, normální strukturou a keratinizací (H&E barvení, 10x)



Oblast defektu (dermis) s vlasovými folikuly a žlázami (H&E barvení, 10x)



Detail intaktní dermis vs defekt kůže (H&E barvení, 10x)

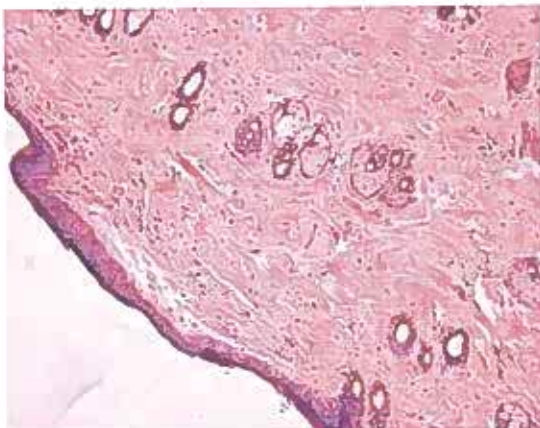


Detail defektu kůže s bohatým prokrvením (H&E barvení, 10x)

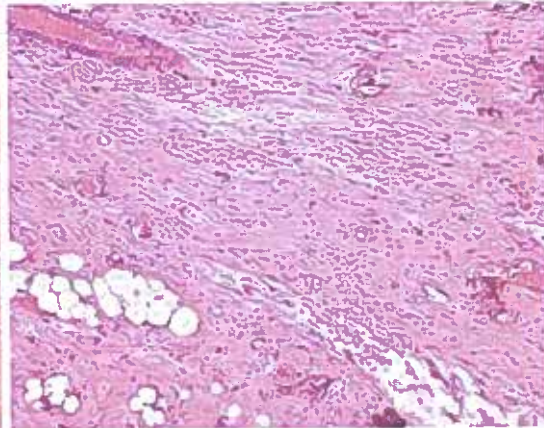
14. den zhojená rána s jizvou a čistou spodinou rány. Histologický náleznou poukázal na granulační tkáň s makrofágy, fibroblasty a lymfocyty.



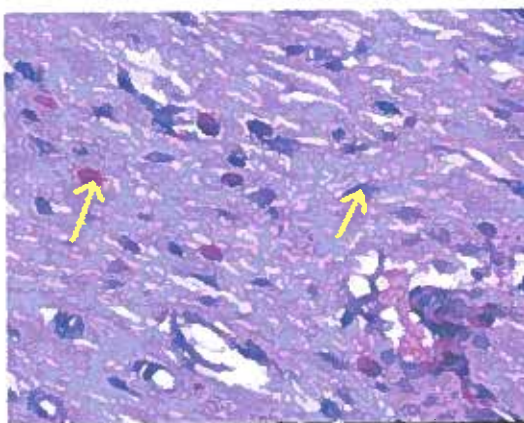
21. den silná epidermis se silnou rohovou vrstvou, ve škáře malé množství fibroblastů a fibrocytů a adipocitů a buňky zánětu.



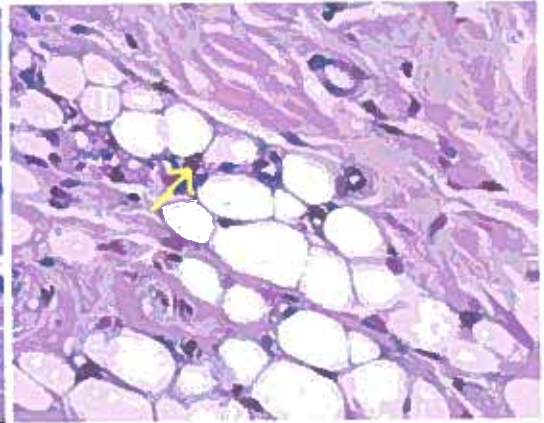
Kompletní remodelace dermis a epidermis
(H&E barvení, 10x)



Detail hojivé dermis
(H&E barvení, 10x)



Detail fibroblastů a buněk zánětu
(H&E barvení, 40x)



Detail tkáně s adipocitů, buňkami zánětu
(H&E barvení, 40x)

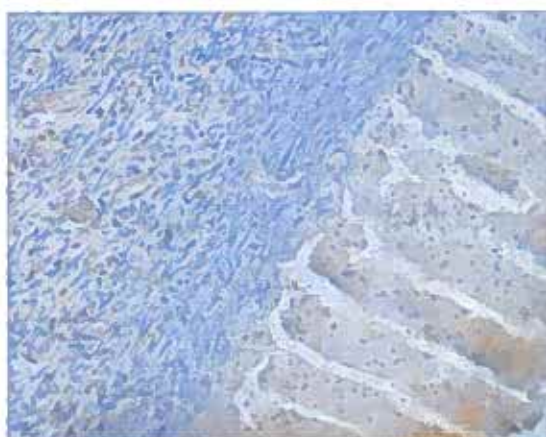
8. 5. Imunohistochemie

Tuto metodu jsme využili pro důkaz exprese metaloproteináz v zánětlivé oblasti akutní rány u potkana. Podstatou je využití specifické reakce antigenu s protilátou. Celý proces probíhal dle standardního laboratorních předpisů Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Postup přípravy řezů je shodný s postupem pro získání histologických vzorků. Následuje níže uvedený postup zpracování vzorků. Jde o tzv. EnVision metodu:

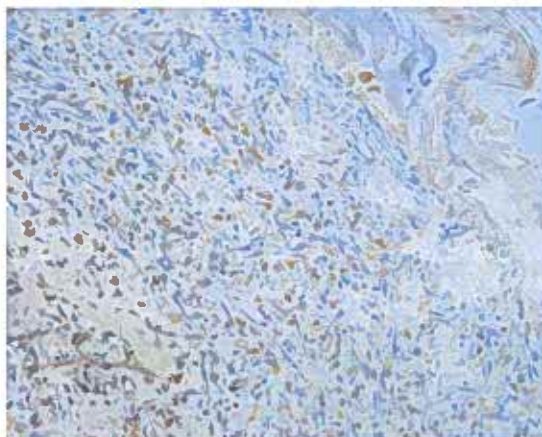
- | | | |
|---|-----|----------|
| • páry formaldehydu v termostatu | 60 | min |
| • odparafinování až do destilované vody | 30 | min |
| • PBS | 5 | min |
| • pretreatment (citrátový pufr) | 2x8 | min |
| • PBS | 2x5 | min |
| • goat serum | 30 | min |
| • primární Ab inkubace přes noc při 4°C | | |
| • PBS | 2x5 | min |
| • 3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml PBS) | 15 | min |
| • PBS | 2x5 | min |
| • En Vision (sekundární Ab + 2% potkaní sérum) | 30 | min |
| • PBS | 2x5 | min |
| • DAB | 10 | sec |
| • destilovaná voda | | proplach |
| • dobarvení jader hematoxylinem | 5 | sec |
| • pramenitá voda | 1 | min |
| • aceton | | oplach |
| • aceton-xylen (10:1) → aceton-xylen (1:10) | 3 | min |
| • 3x xylen | 2 | min |

Byly zde použity také chemikálie a další prostředky odlišující se od zpracování vzorků pro histochemii. Potkaní sérum (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Německo), primární protilátka MMP-2 (myšší monoklonální Ab Abcam, Cambridge, Velká Británie) a sekundární protilátka Goat anti-mouse Ab + 2% potkaního séra, Dako EnVision™ (DAKOCytomation, Carpenteria, USA). Dále byl použit citrátový pufr pH=6 (dle standardních laboratorních postupů), fosforečnanový pufr PBS (dle standardních laboratorních postupů) a DAB. DAB je diaminobenzidin byl použit jako substrát pro teroxidázu v poměru 20 μ l/ml pufru (pufr je součástí kitu). Dako Liquid – DAB + substrát-chromogen systém (DAKOCytomation, Carpenteria, USA). Pro větší názornost a zdůraznění jader byla některá sklíčka dobarvena hematoxylin-eozinem.

Imunohistochemické výsledky prokázaly přítomnost markeru (MMP-2) v akutní zánětlivé fázi. V kontrolní skupině byla 3. den patrná velmi nízká pozitivita ve srovnání s MDOC™. Stejně tomu bylo také den 7. U MDOC™ byla patrná vysoká pozitivita některých buněk, zejména pak fágů a fibroblastů.



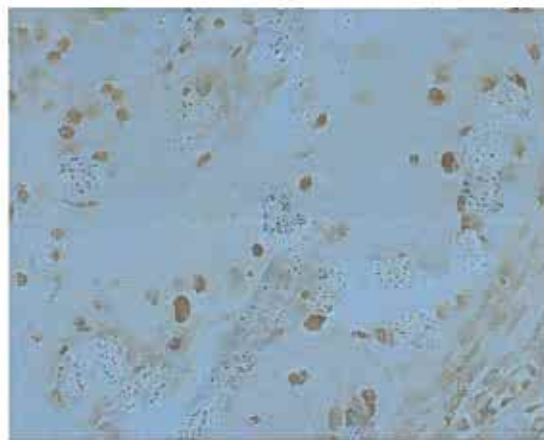
Kontrolní skupina (H&E barvení, 400x)



MMP-2 (H&E barvení, 400x)



MMP-2 (400x)



MMP-2 (400x)

8. 6. Aplikace Hyiodine

Pro kvalitnější zpracování diplomové práce jsem se rozhodla seznámit se také s problematikou hojení akutních ran v klinické praxi. Kromě samotného pochopení celého procesu ambulantní léčby jsme provedli menší studii s aplikací Hyiodine. Jak již bylo zmíněno dříve, význam této klinické studie je pouze orientační a blíže se jí budeme věnovat v následující práci.

Preparát Hyiodine je komplex hyaluronátu sodného (sodné soli kyseliny hyaluronové), jodidu draselného a jódu. Po aplikaci preparátu Hyiodine přítomná kyselina hyaluronová "nasává" vodu spolu s růstovými faktory z okolí a podloží rány a tímto způsobem pozitivně ovlivňuje proces hojení. Originální preparát Hyiodine je určen pro krytí, čištění a hydrataci kožních defektů. Jako součást lokální terapie má unikátní antiadhezivní účinky, přičemž současně zabraňuje maceraci okolní kůže a zlepšuje podmínky pro granulaci a epitelizaci (hojení) rány.



Z finančních důvodů byli do naší studie zapojeni pouze dva vhodní pacienti. Jednalo se o muže ve věku 61 a 65 let. Oba defekty byly lokalizovány shodně na levé dolní končetině – jedna na dorzu a druhá na patě. Studie probíhala kontinuálně po dobu 4-5 měsíců. Pacientům byl aplikován preparát Hyiodine ve formě gelu v dostatečném množství, aby pokryl sledovaný kožní defekt a vždy za sterilních podmínek. Následně byla rána překryta sterilní gázou a fixována obinadlem či náplastí. K převazům docházelo u jednoho pacienta denně (díky hospitalizaci), u druhého pacienta 3x týdně. Nebyl pozorován, žádný vztah mezi užívanými léky a účinkem preparátu.



Aplikace Hyiodine

Po měsíci aplikace byla pozorována pomalá granulace v ráně a rána byla výrazně čistější. Hojení probíhalo velmi pozvolna, i když docházelo ke zmenšení defektu. Po 4 měsících byla aplikace Hyoidine u jednoho z pacientů ukončena z důvodů větší bolestivosti v ráně a zastavení progresu rány.



Počátek léčby



Zhojení po 3 měsících

9. Diskuse

Množství a kvalita extracelulární matrix, tudíž i celý proces hojení, je závislý na posunu rovnováhy produkce/degradace. Existuje několik mechanismů, kterými se u člověka rány hojí. Úplná regenerace poškozených tkání je charakteristická pouze pro časně fetální období. V pozdním fetálním a postnatálním období pak většinou dochází ke kontrakci rány a tvorbě jizvy. Bylo zjištěno, že k regeneraci bez jizvy dochází, pokud nejsou v organismu vyvinuty zánětlivé procesy, případně pokud tkáň na poranění nereagují vznikem klasického zánětu. Zánět je významný z hlediska inhibice napadení organismu infekcí. Rovněž bylo prokázáno, že v počátečních fázích hojení má pozitivní vliv na regeneraci. Naproti tomu dlouhodobé přetrvávání zánětu vede ke zhoršení hojivého procesu.

Prodloužení hojení může nastat nejen vlivem vnějších faktorů (přítomnost nekrotické tkáně, snížené pH rány, mikrobiální infekce, teplotní výkyvy v ráně), ale také působením tkáňových působků. Pokud snížíme koncentraci prozánětlivých cytokinů, volných kyslíkových radikálů, MMPs, či zvýšíme koncentraci růstových faktorů, dojde ke zrychlení hojivého procesu s minimalizací následků (jizva). MMPs zapojené do procesu hojení jsou především kolagenázy (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelyziny (MMP-3, MMP-11) a gelatináza A (MMP-2) a gelatináza B (MMP-9). Jejich inhibice pak vede ke zrychlení a zkvalitnění hojení a jsou součástí tzv. Moderní terapie. Na základě imunohistochemických výsledků naší studie byla prokázána exprese MMP-2, který je považován za jednoho z markerů časně zánětlivé fázi akutní rány.

V experimentální části této práce jsme se zaměřili na porovnání tkáňových parametrů (zmenšení rány, uzávěrka, hemoragická krusta, jizva, sekrece) u potkanů s a bez aplikace MDOCTM. Zvířata byla monitorována v časových intervalech 3., (5.), 7., 14., (21.) dní. Byla studována celá škála parametrů hojení z hlediska histologického. Stupeň epitelizace, stupeň uzávěru rány, formace ECM, kolagenová remodelace, buněčná hustota, přítomnost makrofágových buněk, fibroblastů a fibrocytů, vaskularita.

Proces hojení byl optimální ve všech případech s použitím MDOCTM. Velmi výrazné odlišnosti ovšem nebyly pozorovány u žádného z materiálů. Obecně byla v prvních dnech při aplikaci MDOCTM pozorována rychlejší tvorba krusty, hypergranulace a vysychání spodiny (chyběla sekrece) ve srovnání s kontrolní skupinou. Histologický nález odhalil vyšší

kvalitu krevních cév a silnější epitelovou vrstvu. Hustota kolagenových vláken byla rovněž vyšší. Byly objeveny ohniskové oblasti polymorfonukleárů, leukocytů, makrofágů (možný, ale ne potvrzený efekt MDOCTM jako chemoatraktant), fibroblastů i fibrocytů v prostoru rány. V pozdějších dnech se vytvořila dostatečně zralá spojovací tkáň. Ráda se uzavřela, zacelila díky kontrakci a vytvořila se jizva. Z histologických výsledků bylo patrné, že zánět se objevuje o něco dříve než u kontrolní skupiny. Zároveň zánět i reepitelizace rychleji odeznívají, což příznivě ovlivňuje tvorbu jizvy a formování nové tkáně. Celkové dozrávání tkáně se zrychluje.

Můžeme říci, že MDOCTM produkty pozitivně ovlivňují hojení. I když rozdíly oproti skupině bez aplikace nebyly tak výrazné jak jsme původně předpokládali. Při porovnání různých aplikačních forem (nezesítěné nanovláknko, gel) nebyl prokázán významný rozdíl z hlediska účinku na proces hojení. Ani s rozdílným složením jednotlivých forem nedošlo k radikálnímu zrychlení či zlepšení výsledků (jizva) hojení. Výhodu můžeme pozorovat z hlediska terapeutického v lepší adhezenci gelu k ráně. Nezesítěná nanovláknka je nutno vždy po aplikaci dobře fixovat k okolní tkáni, což byl u zvířat občas problém a docházelo k odnímání testovaného materiálu.

Mechanismus působení přípravku Hyoidine jako komplex hyaluronan-jod není dosud přesně znám. Ovšem předpokládá se, že pozitivně ovlivňuje kontrakci rány. Jód zde zastává funkci širokospektrého dezinfekčního prostředku, který bezpečným způsobem dekontaminuje ránu. Současně však zabraňuje rozkladu hyaluronové kyseliny vlivem bakteriálních enzymů. Hyoidine zabraňuje maceraci okolní tkáně a zlepšuje podmínky pro granulaci a epitelizaci rány, tudíž zlepšuje celkové hojení. Jde o látku, která se v současné medicíně využívá jen zřídka a spíše k léčbě ran chronických. Hlavním důvodem je finanční nákladnost.

Hojivý proces ovšem není jen „problémem“ medicínským z hlediska výběru aplikované látky, ale významnou roli sehrává také compliance pacientů. S tímto aspektem jsem se setkala při své ambulantní „praxi“. Pokud je pacient hospitalizován, tento problém zpravidla odpadá. Ovšem nutnost docházení k lékaři na převazy je pacienty označováno jako tzv. time-consuming. Nepravidelnost převazů, nedostatek aplikované látky, nešetrnost zacházení s postiženým místem rovněž vedou k nezdarům s hojením ran.

10. Závěr

V této práci jsme shrnuli obecné informace ohledně proteáz extracelulární matrix. Zároveň jsme prokázali jejich expresi v akutní ráně. Konkrétně šlo o gelatinázu A (MMP-2), která je exprimována již kolem 3. dne v časné fázi zánětu akutní rány. Zároveň jsme při aplikaci MDOCTM na akutní ránu pozorovali mírnou progresi z hlediska účinnosti. Došlo ke snížení délky zánětlivé fáze, což má příznivý vliv na následnou tvorbu jizvy a formování regenerované, případně nové tkáně. Ve srovnání s kontrolní skupinou bez aplikace ovšem nedošlo k výraznému urychlení hojení. Rovněž se nepotvrdil předpoklad lepších výsledků při změně lékové formy. Ani obměna složení jednotlivých forem nepřinesla kýžené, příliš odlišné výsledky.

Evoluce je „synonymem“ současnosti. Vývoj společnosti a touha lidí vědět více o světě kolem sebe přináší mnoho nových poznatků. S tím jde ruku v ruce také rozvoj zdravotnictví a objevování nových léčebných metod a přípravků. Jejich zavádění do praxe ovšem neprobíhá v tak hojné míře, jak by se předpokládalo. Důvodem jsou často vysoké náklady spojené s přístrojovým vybavením či výrobou přípravků, jako je tomu např. u námi testovaného Hyoidine. Z důvodů minimalizace nákladů jsou často lékaři vedeni k využívání starší, méně efektivní léčby a nové technologie jsou ponechány jako možnost druhé, třetí případně poslední volby.

11. Seznam použité literatury

- [1] Baker EA, Leaper DJ: *Proteinases, their inhibitors, and cytokine profiles in acute wound fluid*, 2000, 8(5), s. 392-8
- [2] Baker EA, Leaper DJ: *Profiles of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in peritoneal drainage fluid: relationship to wound healing*, 2003, 11(4), s. 268-74
- [3] Bureš I (ed.): *Léčba rány*, Galén, Praha, 2006, s.11
- [4] Culen B, Watt PW, Lundqvist C, Silcock D, Schmidt RJ, Bogan D, Nicholas DL: *The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action*, 2002, 34, s. 1544-1556
- [5] Dechert TA, Ducale AE, Ward SI, Yager DR: *Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds*, 2006,14(3), s. 252-8
- [6] Grzeszkiewicz TM, Lindner V, Chen N, Lam SC, Lau LF: *The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin alpha(6)beta(1) and cell surface heparan sulfate proteoglycans*, 2002, 143 (4), s. 1441-50
- [7] Chen CC, Chen N, Lau LF: *Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin alpha 6beta 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans*, 2000, 275 (32), s. 24953-61
- [8] Chen CC, Chen N, Lau LF: *The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts*, 2001, 276 (13), s. 10443-52
- [9] Jelinkova M, Briestensky J, Santar I, Rihova B: *In vitro and in vivo immunomodulatory effects of microdispersed oxidized celulos.*, 2002, s. 1429-1441
- [10] Komarcevic A: *The modern approach to wound treatment*, 2000, 53 (7-8), s. 363-8

- [11] Komarcevic A, Pejakov L, Komarcevic M: *New views on the physiology of wound healing*, 2000, 53 (9-10), s. 479-83
- [12] Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laureát GJ: *Mechanismu of tissue repair from wound healing of fibrinosis*, 1997, 29, s. 5-17
- [13] Nagase H, Woessner JF: *Matrix metalloproteinases*, 1999, 274, s. 21491-21494
- [14] Pirilä E, Korpi JT, Korkiamäki T, Jahkola T, Gutierrez-Fernandez A, Polez-Otin C, Saarialho-Kere U, Salo T, Sorsa T: *Collagenase-2 (MMP-8) and matrilysin-2 (MMP-26) expression in human wounds of different etiologie*, 2007, 15(1), s. 47-57
- [15] Resl V: *Hojení chronických ran*, GRADA, Praha, 1997, s. 147
- [16] Sliva J: Hyaluronat – známý neznámý. *New EU MAGAZINE of MEDICINE*, 2007, 2(3), s. 24-26
- [17] Sobotka L: *Metabolické, systémové a lokální aspekty hojení ran*, 4, Interní Med., 2006, s. 182-184

<<http://www.worldwidewounds.com>> [citováno 13.února 2006]

<<http://www.cslr.cz/kongresy/stryja2.php>> [citováno 6.prosince 2006]

<<http://www.bbraun.cz/braunoviny/tema/tema200610c.htm>> [citováno 6.prosince 2006]

<<http://www.rany.cz/>> [citováno 6. prosince 2006]

<<http://www.alltracel.com>> [citováno 5.února 2007]

<<http://www.lf3.cuni.cz/physio/Physiology/education/materialy/praktika/potkan.htm>>
[citováno 7.února 2007]

<<http://cz.hartmann.info/CZ/75864.htm>> [citováno 13.března 2007]

<http://en.wikipedia.org/wiki/Matrix_metalloproteinase> [citováno 25.března 2007]

<<http://www.mdbiosciences.com/MatrixMetalloproteinases.html>> [citováno 26. března 2007]

<<http://www.medon-solutio.cz/online2006/index.php?linkID=tst14>> [citováno 26. března 2007]

<<http://www.jbc.org/cgi/content/full/274/31/21491?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Hideaki+Nagase&fulltext=matrix+metaloproteinases&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=HWCIT>> [citováno 12. července 2007]¹⁴

<<http://www.nature.com/jid/journal/v119/n1/full/5601526a.html>> [citováno 5. ledna 2008]

<<http://www.jbc.org/cgi/content/full/272/29/18147>> [citováno 5. ledna 2008]

<<http://pga.mbt.washington.edu/data/mmp3/>> [citováno 5. ledna 2008]

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=185250>> [citováno 5. ledna 2008]

<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.people.vcu.edu/~glbowlin/Elastin_1_2_copy.gif&imgrefurl=http://www.people.vcu.edu/~glbowlin/elastin.htm&h=228&w=288&sz=22&hl=cs&start=7&tbnid=LgVi6C43WQE42M:&tbnh=91&tbnw=115&prev=/images%3Fq%3Delastin%26gbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dcs> [citováno 11. března 2007]¹

<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/gifs/elastin.gif&imgrefurl=http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_classification.html&h=260&w=292&sz=13&hl=cs&start=45&tbnid=FvPQX-T-PBEdYM:&tbnh=102&tbnw=115&prev=/images%3Fq%3Delastin%26start%3D40%26gbv%3D2%26ndsp%3D20%26svnum%3D10%26hl%3Dcs%26sa%3DN> [citováno 11. března 2007]²

<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.med.unibs.it/~marchesi/laminim.jpg&imgrefurl=http://www.med.unibs.it/~marchesi/extracellularmatrix.html&h=289&w=518&sz=31&hl=cs&start=24&tbnid=IN2k7vZtsaN0_M:&tbnh=73&tbnw=131&prev=/images%3Fq%3Dlaminin%26start%3D20%26gbv%3D2%26ndsp%3D20%26svnum%3D10%26hl%3Dcs%26sa%3DN> [citováno 11. března 2007]³

<<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://home.comcast.net/~kennethingham/newsite/images/tenascin.gif&imgrefurl=http://home.comcast.net/~kennethingham/newsite/figs/tn.htm&h=299&w=600&sz=34&hl=cs&start=1&tbnid=IiYpsbmZNT2EMM:&tbnh=67&tbnw=135&prev=/images%3Fq%3Dtenascin%26gbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dcs>> [citováno 11. března 2007] ⁴

<<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.lbtd.ulg.ac.be/images/adhesion.jpg&imgrefurl=http://www.lbtd.ulg.ac.be/mmp.html&h=598&w=856&sz=37&hl=cs&start=2&tbnid=gustkFK5tYhLSM:&tbnh=101&tbnw=145&prev=/images%3Fq%3Dvitronectin%26gbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dcs>> [citováno 11. března 2007] ⁵

<<http://www.jbc.org/cgi/content/full/274/31/21491/F2>> [citováno 11. března 2007] ⁶

<<http://me.engin.umich.edu/research/images/collagen.jpg>> [citováno 11. března 2007] ⁷

<<http://www.mad-cow.org/collagen.gif>> [citováno 11. března 2007] ⁸

<<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/fig003den.gif&imgrefurl=http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03006653h.htm&h=810&w=587&sz=66&hl=cs&start=1&tbnid=7afbGvKxGjHWvM:&tbnh=144&tbnw=104&prev=/images%3Fq%3DMMPs>> [citováno 11. března 2007] ⁹

<<http://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2003/05/07.pdf>> [citováno 11. března 2007] ¹⁰

<<http://www.medon-solutio.cz/online2006/index.php?linkID=txt14>> [citováno 11. března 2007] ¹¹

<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.muscular-dystrophy.org/images/diagram350.jpg&imgrefurl=http://www.muscular-dystrophy.org/information_resources/factsheets/medical_conditions_factsheets/merosindeficien.html&h=239&w=350&sz=63&hl=cs&start=1&tbnid=pM0LqWyQE_3TCM:&tbnh=82&tbnw=120&prev=/images%3Fq%3Dmerosin%26gbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dcs> [citováno 11. března 2007] ¹²