

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Vliv MDOC nanotextilie na hojení akutního kožního poranění

Diplomová práce

Tereza Hendrychová

Hradec Králové 2009

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

**Vliv MDOC nanotextilie na hojení akutního kožního
poranění**

The influence of MDOC nanotextile on healing of an
acute dermal wound

Diplomová práce

Student: Tereza Hendrychová
Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Vladimír
Semecký, CSc.

Hradec Králové 2009

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

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi při sepsání této práce pomáhali. Panu Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za trpělivost a cenné rady, paní Pavlíně Jabůrkové za pomoc při laboratorním zpracování, slečně Mgr. Gábině Jamborové, MUDr. Michalu Plodrovi Ph.D. a MUDr. Petru Lochmanovi Ph.D. za poskytnuté výsledky a materiály.

Abstrakt

Tereza Hendrychová

Vliv MDOC nanotextilie na hojení akutního kožního poranění

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

V této práci jsou shrnuty obecné informace o průběhu hojení akutních kožních poranění a jejich ošetřování. Při popisu procesu hojení jsou podrobněji popsány zánětové mediátory (cytokiny). V experimentu byl hodnocen vliv M-DOC[®] (mikrodisperzní oxidovaná celulóza) s navázaným gentamycinem na proces hojení akutních kožních poranění. Preparát byl pracovním názvem nazván jako Nanogenta.

Experimentálním modelem bylo prase domácí, *Sus scrofa*. V pokusu bylo použito 12 zvířat. Pro prokázání účinnosti zkoušeného preparátu byly rány infikovány (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). Účinnost testovaného přípravku byla porovnávána s hromadně vyráběnými přípravky, jejichž účinek již byl v klinické praxi prokázán (Garamycin Schwann[®], Hyiodine[®]). Bylo provedeno makroskopické, mikrobiologické a histologické hodnocení.

U přípravku Nanogenta byla potvrzena dostatečná účinnost na zkvalitnění procesu hojení kožních poranění, srovnatelná s účinností preparátů, které byly použity jako kontrola. Její účinek byl dostačující (ale pouze bakteriostatický) i pro potlačení infekce v ráně, což vedlo k zlepšení procesu hojení ran. Nanogenta má schopnost potlačit především anaerobní infekce. Potvrdilo se, že M-DOC[®] je látka zcela biokompatibilní a kompletně resorbovatelná.

Abstract

Tereza Hendrychová

The influence of MDOC nanotextile on the healing of an acute dermal wound

Diploma paper

Charles University in Prague, The Faculty Of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

In this work there are summarized general information about the course of the healing process of acute dermal wounds and their nursing. There are described the inflammatory mediators (cytokines) in more details. In experiment there was assessed the influence of M-DOC[®] (microdispersed oxidized cellulose) with gentamycin joined on it on the process of the healing of acute dermal wounds. The formulation was called Nanogenta.

Domestic pig, *Sus scrofa* was used as an experimental model. There were 12 animals used, in the experiment. For the demonstration of effectivity of tested formulation the wounds were infected (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). The effectivity of tested formulation was confronted with preparations, that have demonstrated their effect in clinical use yet (Garamycin Schwann[®], Hyiodine[®]). There were performed macroscopic, microbiology and microscopic evaluation.

There were demonstrated sufficient effect of Nanogenta on improving the quality of the healing process of dermal wounds, which was comparable with an effect of the preparations, which were used as a control. Its effect was sufficient (but only bacteriostatic) for suppressing the infection in wound too, which led to improving the process of healing of wounds. Nanogenta is especially able to suppress anaerobic infection. It was confirmed, that M-DOC[®] is wholly biocompatible and completely resorbed.

Obsah

1. Seznam použitých zkratek.....	1
2. Úvod.....	2
3. Cíl diplomové práce	3
4. Kůže	4
4.1. Struktura kůže	4
4.2. Funkce kůže.....	4
5. Extracelulární matrix.....	6
5.1. Složky extracelulární matrix	6
5.1.1. Glykosaminoglykany	6
5.1.2. Proteoglykany.....	7
5.1.3. Fibrózní proteiny	8
5.1.4. Glykoproteiny.....	9
6. Rána.....	10
6.1. Dělení ran	10
6.2. Infikované rány	11
7. Hojení ran.....	12
7.1. Způsoby hojení ran.....	12
7.2. Fáze hojení	12
7.2.1. Hemostáza	13
7.2.2. Zánět.....	14
7.2.3. Proliferace	15
7.2.4. Remodelace	18
8. Cytokiny	19
8.1. Receptory cytokinů	19
8.2. Dělení cytokinů	19
8.3. SIRS a CARS	20
8.4. Proteiny akutní fáze.....	21
8.5. Cytokiny, významné v procesu hojení	21
8.6. Další mediátory významné v procesu hojení	23
9. Faktory ovlivňující hojení ran	25
9.1. Vnitřní faktory.....	25
9.2. Vnější faktory	26
9.2.1. Vitaminy.....	26
9.2.2. Minerální látky	27
10. Ošetřování ran	28

10. 1. Typy terapie.....	28
10. 2. Druhy krycích materiálů.....	28
10. 3. Další způsoby ošetřování ran	32
10. 4. Ošetřování infikovaných ran	33
11. Experimentální část	34
11. 1. Modely hojení ran	34
11. 1. 1. Použitý zvířecí model.....	35
11. 2. Metodika práce	35
11. 2. 1. Operace.....	35
11. 2. 2. Zpracování vzorků.....	36
11. 3. Aplikovaný materiál	38
11. 3. 1. M-DOC®	38
11. 3. 2. Gentamicin	39
11. 3. 3. Hyiodine®	40
12- Výsledky	42
12. 1. Mikrobiologické hodnocení	42
12. 1. 1. Tabulky k mikrobiologickému hodnocení	42
12. 1. 2. Grafy k mikrobiologickému hodnocení	44
12. 2. Makroskopické hodnocení	45
12. 2. 1. Obrazová příloha k makroskopickému hodnocení.....	45
12. 2. 2. Tabulky k makroskopickému hodnocení	46
12. 2. 3. Grafy k makroskopickému hodnocení	47
12. 3. Mikroskopické hodnocení	48
12. 3. 1. Obrazová příloha k mikroskopickému hodnocení	49
13. Diskuze.....	54
14. Závěr.....	58
15. Použité zdroje.....	59

1. Seznam použitých zkratek

3D	3-dimensionální
AMK	aminokyselina
CARS	syndrom kompenzační protizánětové odpovědi
CSF	kolonie stimulující faktory
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
FAD	flavin adenin dinukleotid
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
FMN	flavin mononukleotid
GAG	glykosaminoglykany
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů (granulocyte monocyte colony stimulating factor)
HA	hyaluronová kyselina
HPA	osa hypothalamus-hypofýza-nadledvinky
IFN	interferony
IL	rodina interleukinů
KGF	keratinocytový růstový faktor (keratinocyte growth factor)
M-DOC [®]	mikrodispergovaná oxidovaná celulóza
MMP	metaloproteázy mezibuněčné hmoty
MRSA	meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
PAGA	polyanhydroglukuronová kyselina
PDGF	z destiček odvozený růstový faktor (platelet derived growth factor)
PG	proteoglykany
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PMN	polymorfonukleární leukocyty
SIRS	syndrom systémové zánětové odpovědi
TFPI	inhibitor cesty tkáňového faktoru (tissue factor pathway inhibitor)
TGF α , β	transformující růstový faktor α , β (transforming growth factor)
TIMP	tkáňové inhibitory metaloproteáz matrix
TNF- α , β	faktor nekrotizující tumory α , β (tumor necrosis factor-alpha, beta)
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu (tissue-plasminogen activator)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

2. Úvod

Kůže je největším orgánem těla člověka. Stejně, jako u všech ostatních obratlovců, u něj plní mnoho významných funkcí. Aby je byla schopna bezchybně vykonávat, je třeba, aby byla zcela neporušená. Protože je ale neustále v kontaktu s vnějším prostředím a působí na ni mnoho nepříznivých vlivů, dochází často k jejímu poškození a poruše jejích funkcí. Vzniká rána.

Vznik poranění vede okamžitě ke spuštění sledu procesů, vedoucího k jeho zhojení a obnově ztracené integrity kůže. Dochází k zástavě krvácení, zánětu, proliferaci a epitelizaci. Proces hojení byl a stále je často studovaným jevem. Jeho pochopení a detailní poznání nám umožňuje vyvíjet metody a materiály, které ho urychlují a usnadňují. Již v nejstarších dobách se lidé snažili podpořit organismu vlastní procesy hojení a aplikovaly na rány nejrůznější přírodní prostředky. S postupem doby se při ošetřování ran začaly uplatňovat i přípravky chemické a ani v současnosti se pokrok v ošetřování poranění nezastavil. Ba naopak, neustále jsou snahy hledat nové přípravky a proces hojení co nejvíce ovlivnit pozitivním směrem a minimalizovat následky poranění. Trendem je opět spíše návrat k přírodě a užití materiálů, které jsou pro organismus vlastní, nealergizují a nevyvolávají žádné vedlejší reakce. Zvyšuje se neustále i úroveň studia hojivých procesů se zaměřením na buňky a jimy produkované působky. Ty jsou pro různé fáze hojení specifické a jejich vhodným ovlivněním je možné hojení účinně regulovat žádoucím směrem.

Pro studium procesů hojení je nutné užívat vhodné experimentální modely. Nejlepší by samozřejmě bylo studovat je přímo u člověka. To ale není možné především z důvodů etických. Proto se volí hlavně modely zvířat s anatomickými a fyziologickými charakteristikami co nejbližšími člověku.

3. Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce je zhodnotit vliv MDOC[®] s navázaným antibiotikem na proces hojení akutních kožních poranění. Pro průkaz účinnosti materiálu budou rány infikovány a jeho vliv bude porovnáván s přípravky, které jsou již v klinické praxi používány. Jako kontrola budou použity: antibiotický přípravek Garamycin Schwann[®] a preparát s obsahem kyseliny hyaluronové a jodu, Hyiodine[®]. Experimentálním modelem bude prase domácí (*Sus Scrofa*).

V teoretické části práce se budu zabývat kůží a ranami obecně a budou zde podrobněji popsány jednotlivé fáze hojení kožních poranění se zaměřením na vliv zánětlivých mediátorů (cytokinů). Budu se věnovat i faktorům ovlivňujícím hojivý proces a různým způsobům ošetřování ran.

V praktické části uvedu popis průběhu experimentu a hodnocení vlivu zkoušeného preparátu na proces hojení kožních poranění prostřednictvím mikroskopického histologického zkoumání vzorků tkáně. Bude zde zařazena obrazová příloha. Také se tu zaměřím na popis podobnosti lidské a prasečí kůže, která byla hlavním důvodem pro volbu právě tohoto modelu. Na tomto místě uvedeme i výsledky makroskopického a mikrobiologického hodnocení ran, provedeného na Fakultě vojenského zdravotnictví UO v Hradci Králové. Výsledky všech provedených typů hodnocení zde budou shrnuty.

4. Kůže

4.1. Struktura kůže

Pro studium hojení kožních poranění je nezbytná znalost kůže jako takové. Její strukturu tvoří tři základní vrstvy.

Pokožka (*epidermis*) je tvořena mnoha vrstvami buněk dlaždicového epitelu. Rozlišujeme zde rohovou vrstvu (*stratum corneum*), vrstvu jasných buněk (*stratum lucidum*), vrstvu zrnitých buněk (*stratum granulosum*), vrstvu ostnitých buněk (*stratum spinosum*) a vrstvu bazální (*stratum basale*). Horní vrstvy kůže neustále rohovatí, odumírají a odlupují se. Je to způsobeno tím, že buňky v horních vrstvách pokožky se postupně více a více vzdalují od zdroje krve a živin, takže pozvolna degenerují, naplňují se keratinem a odumírají. Celá pokožka se obmění asi za tři týdny. Buňky ve spodních vrstvách kůže se neustále dělí a vytlačují starší buňky k povrchu. Součástí spodních vrstev pokožky je také pigmentové barvivo melanin, které chrání tělo před škodlivými účinky UV-záření. *Epidermis* neobsahuje žádné kapiláry a většinu živin získává ze škáry.

Druhou vrstvou kůže je škára (*corium*), pevná a pružná vazivová složka kůže. Je silná asi 3cm. Je tvořena sítí kolagenových vláken. Na hranici pokožky a škáry se nacházejí škárové papily, ve kterých jsou kapilární sítě a nervová zakončení. Za účelem dosažení větší plochy, kterou do pokožky pronikají živiny, jsou papily silně zvlněné. Právě jim vděčí člověk za otisky prstů, které zkoumá daktyloskopie. Ve škáře jsou přítomna nervová tělíska. Ruffiniho tepelné receptory, uložené hluboko ve škáře, a Krauseho chladové receptory, uloženy ve svrchních vrstvách škáry. Dále jsou zde obsaženy kožní a mazové žlázy a také vlasové cibulky.

Podkožní vazivo (*tela subcutanea*) je vrstva kůže pod škárou. V různých místech obsahuje více či méně tukových buněk. V podkožním vazivu jsou Meissnerova hmatová tělíska pro vnímání doteku a Vater-Pacciniho tělíska pro vnímání tlaku. Funkcí podkožního vaziva je izolovat a chránit svaly a nervy. Podkožní tuková vrstva určuje tvar a hmotnost celého těla. U žen bývá tato vrstva silnější.^{14, 15}

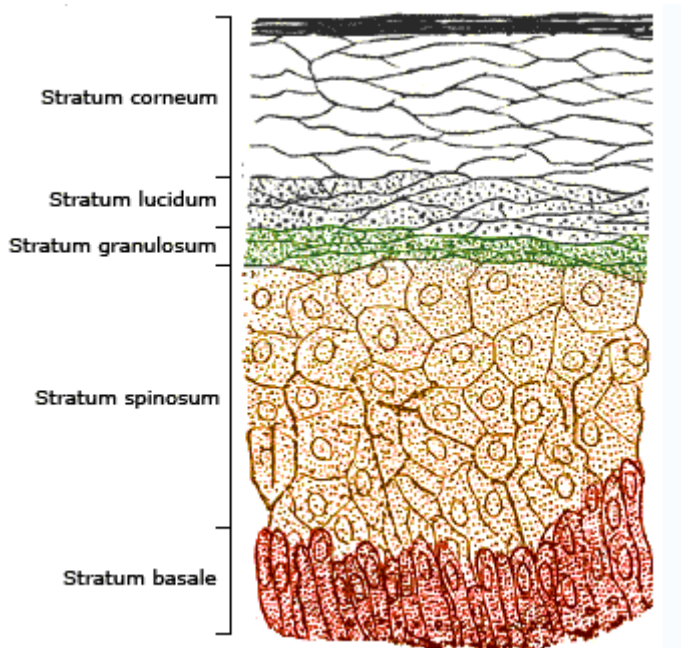
4.2. Funkce kůže

Mezi základní fyziologické funkce kůže patří funkce ochranná. Kůže nás chrání před působením zevních faktorů fyzikálních (mechanické, aktinické, termické), chemických a biologických. Fyzikální bariéru zajišťuje hydratovaná a promaštěná rohová vrstva, desmozomy keratinocytů, vlnitá dermoepidermální junkce a podkožní tuková tkáň. Na fotoprotekci se podílí rohová vrstva, keratohyalinové struktury *stratum granulosum*, obsah urokanové kyseliny, melaninu, aminokyselin, nukleových kyselin, beta-karotenu a hemoglobinu. Elektrická bariéra je zajištěna elektronegativně nabitým povrchem *stratum corneum* a funkční vrstvou mezi *stratum corneum* a *stratum granulosum*, která funguje jako elektrický dipól. Kůže má význam při ochraně před teplem a chladem a při vodním

hospodářství organismu. U chemické bariéry se uplatňují mechanické vlastnosti kůže, nárazníková schopnost kyselého kožního pláště, acidorezistence keratinu, samočisticí schopnost kůže, ředění noxy a její odplavení potem. Neporušená rohová vrstva je překážkou pro koky a jejich enzymy, podílí se také na samočisticí funkci kůže. Kyselé pH ochranného kožního filmu působí antimikrobně, rezidentní kožní flóra vykazuje antimikrobní aktivitu proti bakteriím přechodné mikroflóry.

Kůže má funkci sekreční, exkretční i absorpční. Je v podstatě rozsáhlou holokrinní žlázou, produkující keratin, melanin, pot a maz. Kůže funguje jako semipermeabilní membrána, jejíž propustnost ovlivňuje její stav (zejména stav rohové vrstvy) a hydratace. Průnik látek zvnějšku závisí také na jejich charakteru. Kůže je důležitým rezervoárem vody, která je vázána na kolagenní vlákna. Kůže se dále podílí na termoregulaci změnami prokrvení, pocením a odpařováním vody. V rámci udržování a regenerace struktur probíhá v kůži metabolismus sacharidů, tuků a bílkovin. Vzhledem k rozsahu kožního povrchu se kůže podílí svou sekreční a depotní funkcí na metabolismu celého organismu. V horních vrstvách epidermis dochází vlivem UV záření k přeměně provitaminu ve vitamin D.

Kůže je smyslovým orgánem, předávajícím organismu informace o zevním i vnitřním prostředí pomocí receptorů (teplo, chlad, dotyk, tlak, bolest). Vzhledem k frekvenci kontaktu s antigeny zevního prostředí je kůže největším imunologickým orgánem. Imunokompetentní jsou zejména keratinocyty, Langerhansovy buňky v *epidermis*, v *dermis* pak senzibilizované T-lymfocyty, makrofágy a mastocyty. Nonverbální komunikace kůže je důležitým faktorem ovlivňujícím chování i postavení jedince ve společnosti.^{14, 15, 19, 49}



Obrázek 1: Schéma vrstev epidermis¹⁴

5. Extracelulární matrix

Největší komponentou *dermis* je extracelulární matrix (EM). Extracelulární matrix je složitá směs glykoproteinů a proteoglykanů, přispívající k vazbě buněk na vláknité složky vaziva.⁴⁴ Hlavním úkolem EM je propojit různé tkáně těla dohromady, udržovat jejich trojrozměrný tvar během morfogeneze a hojení ran. Dále mít schopnost přenášet pohyb, ale také umožnit přísun živin, elektrolytů a vody a odsun produktů metabolismu do nitra a ven z buněk. EM má důležité uplatnění v komunikaci mezi buňkami. Její funkce je i obranná. Vytváří fyzickou bariéru proti pronikání mikroorganismů, účastní se při zánětu a hojení defektů. Jen málo tkání, např. epitelie, je složeno převážně z buněk. Malé množství matrix, jako tzv. *lamina basalis*, poskytuje u epitelii podklad pro navázání buněk na pojivovou tkáň, pod nimi ležící. Naproti tomu pojivová tkáň (vazivo, chrupavka, kost) je složena převážně z extracelulární matrix. Extracelulární matrix je sice buňkami produkována, ale není v nich umístěna, a hmotou je přesahuje. Struktura a vlastnosti EM se liší podle vlastností a funkce příslušné tkáně a závisí na vzájemné proporcii rozpustných a nerozpustných komponent.

5. 1. Složky extracelulární matrix

Hlavními složkami EM jsou proteinová vlákna, amorfni hmota, tkáňová tekutina a buňky fixní a volné. Prekurzorem fixních buněk je nediferencovaná mezenchymová buňka. Mezi tento typ buněk patří fibroblasty, fibrocyty, myofibroblasty, buňky retikulinové, adipocyty, chondroblasty, chondrocyty, osteoblasty a osteocyty. Fixní buňky produkují hlavní složky extracelulární hmoty. Buňky volné (bloudivé) se v EM vyskytují pouze po určitou část svého životního cyklu. Jejich prekurzorem je hemocytoblast-hemopoetická kmenová buňka kostní dřeně. Patří sem buňky monocyto-makrofágového systému, produkující cytokiny, mastocyty, významné vylučováním histaminu, heparinu a serotoninu a plazmatické buňky, schopné produkce protilátek.

Hlavními typy makromolekul, vyskytujících se v EM, jsou glykosaminoglykany a proteoglykany, tvořící gelovou strukturu pojiva. Fibrózní proteiny kolagen a elastin poskytují pojivu dostatečnou pevnost a pružnost. Multiadhezní molekuly a glykoproteiny fibronectin, vitronectin, nebulin, tenascin, fibromodulin, laminin, entaktin a další umožňují přímé spojení buněk s makromolekulami EM.^{44, 45, 46, 47}

5. 1. 1. Glykosaminoglykany

Glykosaminoglykany (GAG) jsou dlouhé nevětvené polysacharidy s opakujícími se disacharidovými jednotkami, v nichž jeden nebo dva cukry tvoří aminocukry N-acetylglukosamin či N-acetylgalaktosamin. Aminocukry jsou obvykle sulfatovány. Sulfátové a karboxylové skupiny cukerných zbytků poskytují GAG silné negativní náboje. To způsobuje přitahování osmoticky aktivních kationtů jako je Na⁺. To vede k tomu, že do EM je vtahována voda. Důsledkem je nabobtnání a turgor. Tlak způsobený turgorem umožňuje EM působit proti silám stlačujícím tkáň. Existují různé typy GAG: chondroitin-4-sulfát, chondroitin-6-sulfát, dermatansulfát, heparansulfát, keratansulfát a kyselina hyaluronová.

Kyselina hyaluronová (HA) je sloučenina mezi GAG unikátní tím, že neobsahuje sulfát a nekovalentně se váže s komplexem proteoglykanů. Je hlavní komponentou EM, která obklopuje migrující a proliferující buňky, zvláště v embryonálních tkáních. Je tvořena 50 000 opakujícími se disacharidovými zbytky, tvořenými $\beta[1-4]$ D-glukuronovou kyselinou a $\beta[1-3]$ N-acetylglukosaminem. Četné hydrofilní komponenty na povrchu HA váží velké množství vody a tvoří již při nízké koncentraci HA viskózní hydratovaný gel, který je 10^3 - 10^4 krát větší než vlastní HA. To znamená, že HA mezi jednotlivými buňkami plně vyplňuje prostor. Dává určité napětí a různě blokuje vzájemný pohyb buněk.

Dermatansulfát - L-iduronová k. + GlcNAc sulfát

Chondroitinsulfát - D-glukuronová k. +GlcNAc sulfát

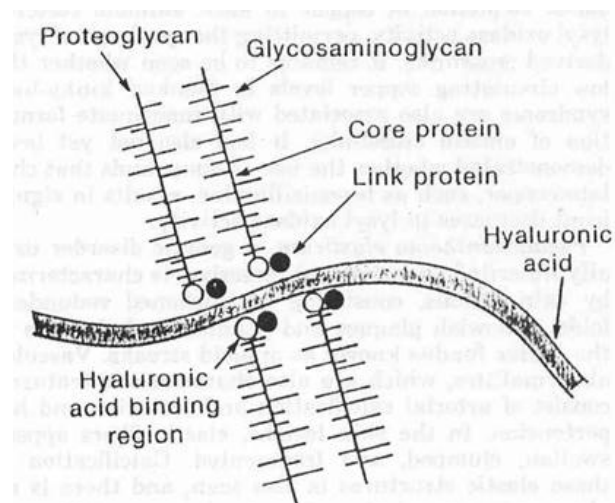
Heparinsulfát a heparansulfát - D-glukuronová k. + N-sulfo-D-glukosamin

Keratansulfát - Gal + GlcNAc sulfát

Obrázek 2: Typy glykosaminoglykanů ⁴⁷

5. 1. 2. Proteoglykany

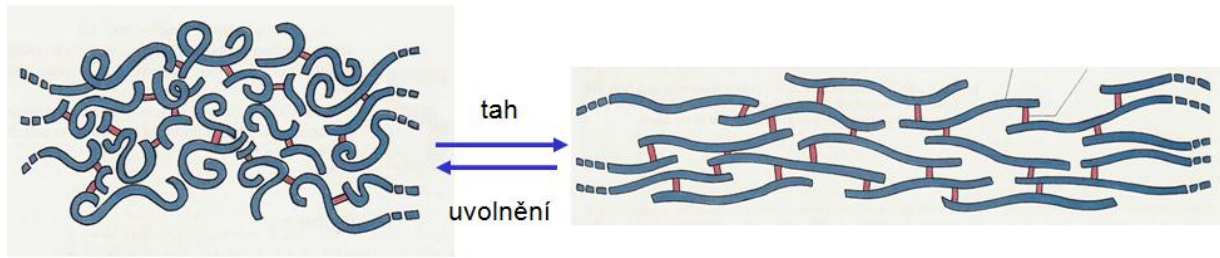
Glykosaminoglykany, s výjimkou hyaluronové kyseliny, se navazují kovalentní vazbou na centrální protein a vytvářejí tak proteoglykany. Proteoglykany (PG) jsou velmi heterogenní skupinou a jsou nazývány podle příslušného GAG. Rozlišujeme proteoglykan- chondroitin-4-sulfát, -chondroitin-6-sulfát, -heparansulfát, -keratansulfát,- dermatansulfát a -heparin. PG mají schopnost agregovat do supramolekulových útvarů. Jsou vysoce hydrofilní, náboji přitahují vodu a mají schopnost bobtnat. Vyplňují prostor mezi buňkami a kolagenními vlákny. Elektronoptické snímky ukazují, že proteoglykany podobou připomínají kulatý kartáč. Různé proteoglykanové podjednotky se napojují prostřednictvím malých spojovacích proteinů na dlouhé vlákno kyseliny hyaluronové. Tím vzniká obrovská makromolekula, která má velikost několika milionů daltonů. Délka středního vlákna kyseliny hyaluronové se pohybuje od 400 nm do 4 000 nm. Na něj je připojeno až 100 proteinových jader proteoglykanů s dalším množstvím glykosaminoglykanů. PG se dělí podle velikosti na velké agrekany a malé biglykan, versikan a dekorin. PG mají také schopnost vázat signální molekuly, jako jsou např. růstové faktory (fibroblastový růstový faktor). To umožňuje signálním molekulám udržet se ve specifických oblastech, v nichž se jejich účinek lokalizuje nebo spolupůsobí s příslušným receptorem. V této formě jsou signální molekuly rezistentní vůči degradaci extracelulárními proteázami a vzniká jejich rezervoár. ^{44, 45, 46, 47}

Obrázek 3: Struktura proteoglykanu ⁴⁷

5. 1. 3. Fibrózní proteiny

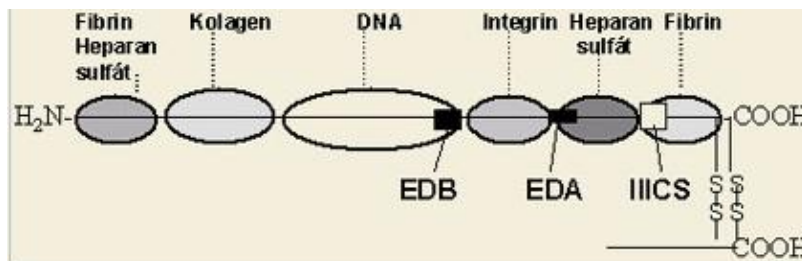
Kolagen je hlavním glykoproteinem mezibuněčné hmoty pojiva. U savců představuje až 25 % hmotnosti všech tělesných bílkovin. Dosud je známo devatenáct typů kolagenu (kolageny I – XIX), které se liší výskytem a částečně i strukturou a funkcí. Ve všech typech kolagenu je přítomna (vždy aspoň v části struktury) charakteristická trojřetězcová šroubovice (triplhelix), která je v jiných proteinech spíše výjimečná. Pouze pět druhů kolagenu jsou typické fibrilární proteiny, jejichž molekuly jsou organizovány do dlouhých vláknitých útvarů, fibril. Ostatní typy kolagenu mají části polypeptidových řetězců uspořádané do jednoho nebo více globulárních útvarů. Každou třetí aminokyselinou ve struktuře kolagenu je glycin, pomáhající stabilizovat řetězce. Často se zde také vyskytují prolin a hydroxyprolin. Molekuly kolagenu obsahují i cukernou složku, tvořenou glukózou a galaktózou. Kolagen je charakteristický vysokou mechanickou pevností a poddajností. V kůži se vyskytují především kolagen typu I a III. Kolagen typu I se skládá ze dvou řetězců $\alpha 1(I)$ a jednoho $\alpha 2(I)$. Kolagen typu III je tvořen třemi řetězci $\alpha 1(III)$ a vytváří tenká retikulinová vlákna. Díky obsahu cysteinu vytváří i menší počet disulfidových můstků. Syntéza kolagenu (viz. níže) probíhá ve fibroblastech, chondroblastech a osteoblastech.

Elastin je hydrofobní protein, zodpovědný za protažitelnost a elastické vlastnosti tkání. Jeho základní strukturu tvoří tropoelastin (přibližně 750 zbytků aminokyselin). V jeho řetězcích převládají nepolární AMK (glycin, valin, alanin...). Agregace tropoelastinu se děje pomocí příčnovazebného elementu desmosinu. Toto zesíťování tropoelastinu poskytuje nerozpustný elastin. Vzniká pružná prostorová síť. Její elasticitu podporují hydrofobní interakce mezi početnými zbytky nepolárních aminokyselin, zejména valinu. Elastinová vlákna jsou pokryta mikrofibrilami, tvořenými různými glykoproteiny. Pravděpodobně nejdůležitějším je fibrilin. I když je elastin hlavní součástí elastických fibril, není typickým fibrilárním proteinem. Řetězce rozpustného tropoelastinu (označované někdy za monomery nebo podjednotky elastinu) nemají pravidelnou sekundární strukturu. Jejich konformace se označuje jako neuspořádaná. ^{44, 45, 46, 47}

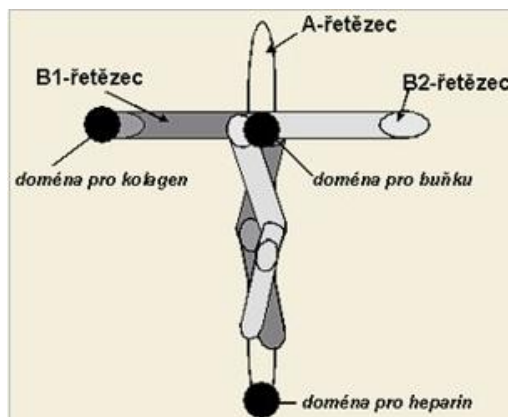
Obrázek 4: Schematické znázornění elastické prostorové sítě elastinu ⁴⁶

5. 1. 4. Glykoproteiny

Hlavním adhezivním proteinem pojivové tkáně je **fibronectin**. Jedná se o glykoprotein vylučovaný fibrocyty, endotelem a dalšími typy buněk. Je tvořen dvěma identickými polypeptidovými jednotkami, spojenými na C-konci disulfidovými vazbami. Molekula je tvořena šesti globulárními doménami, z nichž každá má specifické vazebné místo pro interakci s integriny na povrchu buněk, s denaturovanou formou kolagenu, s fibrinem a sulfatovanými proteoglykany. Fibronectin se účastní přímo adheze, migrace a průniku buněk. Má proto význam i v procesu zánětu, hojení ran i nádorové generalizace. V rozpustné formě se nachází i v krevní plazmě.

Obrázek 5: Schéma struktury řetězce fibronektinu ⁴⁵

Laminin je adhezivní molekula, specifická pro bazální laminu. Je složen ze 3 polypeptidových řetězců (A, B1 a B2), propojených vzájemně pomocí disulfidových vazeb do tvaru kříže se třemi vazebnými doménami pro kolagen, heparin a buňku. ^{44, 45, 46, 47}

Obrázek 6: Schéma struktury lamininu ⁴⁵

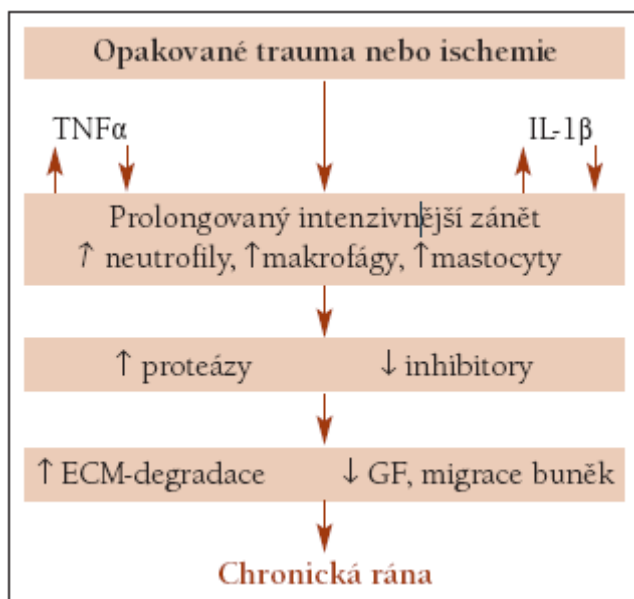
6. Rána

Rána (*vulnus*) je definována jako narušení normální anatomické struktury a funkce tkáně-kůže, sliznice, či povrchu orgánu. Může mít vnější i vnitřní příčiny. Organismus je ohrožen krvácením, ztrátou tkáně, infekcí, poraněním životně důležitých orgánů, bolestí.^{5, 12}

6. 1. Dělení ran

Podle způsobu vzniku, rozsahu, hloubky a především podle délky trvání, se rány dělí na akutní a chronické. **Akutní rány** vznikají náhle ve zdravé tkáni a jsou nejčastěji traumatické.¹⁰ Dále je můžeme dělit na **rány s rovným okrajem** a na **rány s nerovným okrajem**. V první skupině jde o rány bodné (*vulnus punctum*), sečné (*vulnus sectum*) a řezné (*vulnus scissum*) a ve druhé skupině o rány tržné (*vulnus lacrum*), zhmožděné (*vulnus contusum*), tržně-zhmožděné (*vulnus contusolacerum*), střelné (*vulnus sclopetarium*) a kousnutím (*vulnus morsum*). Mezi akutní rány patří i popáleniny (*combustio*), omrzliny (*congelatio*) a zlomeniny kostí (*fractura*). Speciálním typem jsou rány chirurgické.^{11, 13}

Chronické vředy se často vyvíjejí především u infikovaných nebo metabolicky pozměněných ran. Vředy lze dělit na venózní, arteriálně-ischemické, traumatické, trofické, metabolické, infekční, autoimunitní, neoplastické, geneticky podmíněné, krevní a lymfatické. Chronické rány se hojí sekundárně s výraznější granulací. Doba hojení přesahuje šest týdnů.⁹



Obrázek 7: Vývoj chronické rány⁵⁵

Podle hloubky poškození dělíme rány na **povrchní** a **hluboké**. Rány zasahující jen do podkožního nebo podslizničního vaziva jsou **jednoduché**, ty, které poškozují hlubší struktury, označujeme jako **komplikované**, pronikají-li do tělních dutin, jedná se o rány **penetrující**.⁹

Pro další způsob ošetření má význam dělení ran na **čisté** a **znečištěné**. Z hlediska bakteriální kontaminace se rozeznávají rány aseptické (biologicky čisté) a infikované rány.

Podle přítomnosti mechanických, nebo chemických nečistot na čisté a mechanicky, či chemicky znečištěné.⁹

Důležitými markery pro hodnocení rány jsou její typ a lokalizace, hloubka, rozsah, vzhled a případně zápach, okolí rány, secernace a bolest.¹¹

6. 2. Infikované rány

Komplikací hojení nebo příčinou defektu je bakteriální infekce. Mezi lokální známky infekce patří zvýšená teplota, zarudnutí, otok a patologická sekrece z rány, spojená se zápachem. Plocha rány je často jen kolonizována. V případě dalšího množení mikrobu hovoříme o kritické kolonizaci a následně o infekci. Před exogenní infekcí je rána chráněna až po proběhlé epitelizaci. V předchozích fázích hojení se v likvidaci možných patogenů přítomných v ráně uplatňují neutrofilní makrofágy schopné fagocytózy.^{48, 50, 51}

Infekce ran patří mezi sekundární kožní infekce, protože kůže je primárně poškozena jiným způsobem. Sekundární infekce jsou endogenní i exogenní. Důležitým predisponujícím faktorem infekce je porucha trofiky, jako je tomu např. u bércoých vředů nebo u dekubitů. Ty jsou infikovány vlastní flórou, většinou fekální, ale i stafylokoky. Často infekce vyvolávají *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* a další gram-negativní tyčky. Výraznou predispozici k rozvoji infekce mají také popálené plochy. Kromě stafylokoků je infikují *Pseudomonas aeruginosa* a další gram-negativní tyčky. Rány po chirurgickém zákroku se infikují endogenně nebo exogenně stafylokoky. Vnímavý je, vzhledem k patogenezi primárního onemocnění, každý bez výjimky. Zvýšená vnímavost je především u imunodeficientních pacientů, při poruše trofiky nebo u diabetiků.

Pro bakteriální zánět je typická především kolonizace neutrofilními leukocyty se schopností fagocytózy (mikrofágy). Je to dáno hlavně výrazným chemotaktickým účinkem některých mikrobu. V praktické části této práce byla kůže kontaminována mikroorganismy *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Dále se tedy zmíním o hlavních projevech infekce vyvolané těmito druhy mikroorganismů.

Rány infikované *Pseudomonas aeruginosa* jsou typické modrozeleným sekretem a ovocným zápachem. Infekce ran mikroorganismem *Staphylococcus aureus* je charakterizována hromaděním hnisu, až vznikem abscesů a vředů. *Staphylococcus aureus* a *E. coli* mohou mít v některých případech na hojení ran dokonce pozitivní efekt. Mají schopnost vyvolat plnou zánětlivou odpověď, stimulovat prokrvení, a tím urychlit proces hojení. Pozitivní vliv na hojení ran se však uplatňuje jen u některých druhů patogenů a pouze při jejich malém počtu v ráně.⁵⁶ Anaerobní mikroorganismy naopak výrazně zhoršují hojivý proces inhibicí proliferace fibroblastů a keratinocytů. Infekce anaeroby je také typická výrazným zápachem z rány. Gram-negativní bacili, jako právě např. *Pseudomonas aeruginosa* a *E. coli* mají obrovskou schopnost adherence k ráně a působí antifagoticky. Produkují toxiny, které prodlužují trvání zánětu a mohou vést až k přechodu rány do chronicity.^{13, 48, 50, 51, 52, 53,}

7. Hojení ran

7. 1. Způsoby hojení ran

Hojení ran je proces obnovování kontinuity a funkce tkáně po poranění. Poraněná tkáň se hojí buď částečnou nebo kompletní regenerací či reparací.

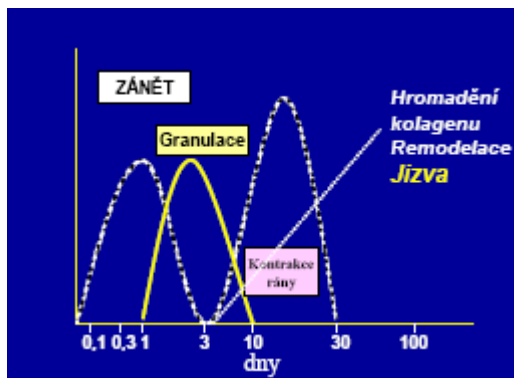
Regenerací rozumíme kompletní obnovení původní struktury tkáně se zachováním všech jejích specifických funkcí. Tento proces probíhá především u poikilotermních živočichů, kde je možná kompletní obnova celých končetin. U živočichů homiootermních je omezen pouze na některé tkáně. U člověka se jedná o **tkáně obnovovací**- epitel (epidermis, epitel trávícího traktu, dělohy...), kostní dřev a lymfatickou tkáň a **tkáně stabilní**- parenchym jater, ledvin, slinivky, hladkou svalovinu a fibroblasty. V obnovovacích tkáních procházejí buňky během života na sebe navazujícími buněčnými cykly, které končí jejich mitotickým dělením. V tkáních stabilních se buňky nachází většinou v klidové fázi buněčného cyklu a k jejich dělení dojde až po určitém podnětu, jakým je např. poškození tkáně.

Tkáně trvalé, které nejsou schopné regenerace, se hojí procesem **reparace**, kdy je poškozená tkáň nahrazena nespecifickou spojovací tkání, která vytváří funkčně druhořadou jizvu. Její význam spočívá především ve spojení zbylé tkáně. Má schopnost vykonávat pouze část z původních specifických funkcí tkáně předchozí. Zjizvená tkáň také vykazuje nižší pevnost, což může být dáno do souvislosti s uspořádáním kolagenních vláken. Takto probíhá hojení např. u dermis, srdeční a nervové tkáně.^{5,6}

Dále lze hojení ran rozdělit na hojení **per primam** u ran, jejichž okraje jsou těsně u sebe, čisté, nezhožděné, rána není infikovaná. Jde většinou o rány řezné, či chirurgické. A na hojení **per secundam** v případě ran, které jsou široké, kde došlo ke ztrátě tkáně či infekci.^{5,9}

7. 2. Fáze hojení

Hojení akutních poranění probíhá běžně velmi přesným a účinným způsobem. Ve většině odborných prací se dělí na několik vzájemně se překrývajících fází. Jedná se o **hemostázu**, **zánět**, **proliferaci** a **remodelaci**. Každá z fází je charakterizována určitými procesy, buňkami, které se jich specificky účastní, a biologickými markery. Jejich studiem lze získat cenné informace nejen o aktuálním stavu rány, ale i o možnosti ovlivnění procesu hojení. Zvláštní markery ukazují i na probíhající procesy patologické, ústící např. v chronické nehojící se vředy.⁶



Obrázek 8: Grafické znázornění dynamiky procesu hojení ⁴⁴

Během normálního hojení se ustavuje rovnováha mezi utvářením a remodelací jizvy. V případě nadměrné depozice pojiva vzniká pozměněná struktura „neschopná funkce předchozí tkáně. Hovoříme například o fibróze, adhezích, stahu a kontrakci.

Fibróza znamená zmnožení vaziva ve tkáni, většinou na úkor funkční tkáně. Většinou vzniká po destrukčním zánětu, působení toxických vlivů, nebo je její původ nejasný. V patogenezi se uplatňují mimo jiné vlivy cytokinů, které mají schopnost indukovat tvorbu vaziva. Adheze jsou srůsty, vznikající např. po operacích v dutině břišní. ^{6, 60}

7. 2. 1. Hemostáza

V některých pracích je zánět dále dělen na fázi časnou a pozdní, které se liší zastoupením buněk imunitního systému v zánětlivém exudátu, probíhajícími procesy a délkou trvání. K časné fázi zánětu je pak řazen i proces hemostázy, na němž se podílí trombocyty, proces hemokoagulace, reakce cév v místě poranění a fibrinolýza. ^{5, 16}

7. 2. 1. 1. Trombocyty

Proces hemostázy je zahájen kontaktem krve s exponovaným subendotelovým kolagenem při narušení cévy. To vede k aktivaci krevních destiček a secernaci látek s prozánětlivými účinky-serotoninu, bradykininu, prostaglandinů, prostacyklinů, tromboxanů a histaminu. Důležité je i uvolňování proteinů extracelulární matrix a cytokinů, zahrnujících růstové faktory. Také z poškozených endotelových buněk se uvolňují chemotaktické substance, např. interleukin-1 (IL-1), interleukin-8 (IL-8) a růstové humorální faktory „např. fibroblastový růstový faktor (FGF), faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů (GM-CSF) a z destiček odvozený růstový faktor (PDGF).

Aktivované trombocyty exprimují na svém povrchu glykoproteinové receptory, které jim umožňují vzájemnou agregaci a adhezi na subendotelový kolagen. Místo, kde došlo k poranění cévy, krevní destičky doslova ucpou. Nakonec se trombocyty úplně rozpadnou a splynou a vzniká destičkový (bílý) trombus. Jedná se o provizorní hemostatickou zátku.

7. 2. 1. 2. Reakce cév

Nadměrným ztrátám krve v prvních okamžicích po poranění brání uvolnění tromboxanů a prostaglandinů s vasokonstrikčním účinkem. Spasmus cévy také umožní nahromadění buněk a faktorů, významných pro průběh zánětu v místě rány. K vasokonstrikci dochází okamžitě po narušení cévy a trvá od pěti do deseti minut. Zhruba po dvaceti minutách vrcholí děj opačný – vasodilatace, která je aktivována především histaminem. Ten také umožní prostup buněk imunitního systému z krevního řečiště do extravaskulárního prostoru zvýšením porozity stěny cév. To vede i k úniku krevních proteinů spolu s vodou a vzniku edému. Vstupem chemotakticky ovlivněných leukocytů se dále zvyšují metabolické nároky tkáně, čímž se díky nedostatečné místní mikrocirkulaci prohlubuje anaerobní stav spojený s poklesem parciálního tlaku kyslíku, vzestupem parciálního tlaku oxidu uhličitého a hromaděním laktátu v ráně.

7. 2. 1. 3. Hemokoagulace

Proces krevního srážení je kaskádovitý sled enzymatických reakcí, při nichž se postupně aktivují v krvi cirkulující inaktivní enzymy (koagulační faktory). Všechny koagulační faktory jsou glykoproteiny, řadí se mezi plazmatické globuliny. Vznikají v játrech. Výsledkem jejich interakcí je aktivace protrombinu na trombin a následně rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Významným důsledkem procesu hemokoagulace je vznik „definitivní“ hemostatické zátky, tj. červeného trombu. Vzniká ze sítě fibrinových vláken, která zpevňují trombus destičkový a mezi něž se zachycují krevní buňky.

7. 2. 1. 4. Fibrinolýza

Celá hemokoagulační kaskáda musí být regulována, jinak by došlo během několika desítek sekund ke srážení veškeré krve v organismu. Na regulaci se podílí vlastní proud krve, který odplavuje koagulační faktory z místa poranění, neporušený cévní endotel, fibrinolýza a přirozená antikoagulancia. Jedná se o antitrombin III, protein C a inhibitor cesty tkáňového faktoru (TFPI). Fibrinolýza představuje enzymatické štěpení fibrinu plazminem na degradační produkty. Plazmin vzniká proteolytickým štěpením z plazminogenu prostřednictvím tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) a urokinázy.^{4, 5, 6, 16}

7. 2. 2. Zánět

Zánět lze definovat jako reakci cévami prostoupené tkáně na lokální poškození.⁵ Jeho cílem je zničení, rozpuštění či ohraničení škodliviny, která ho v organismu vyvolala, ale také rekonstrukce a náhrada zničené tkáně. Nejzřetelnějším důsledkem zánětu je odstranění nekrotické tkáně a lokální potlačení infekce. Zánět může být vyvolán mikroorganismy, jinými cizorodými látkami (např. cizorodé bílkoviny, částice azbestu), zničením tkáně, způsobeným mechanickým poškozením (např. vpich), chemickými noxami (např. kyseliny) a fyzikálními vlivy (např. žár, chlad). Může vzniknout i působením tělu vlastních nox, jako jsou rozpadající se nádorové buňky, extravaskulární krev, krystaly vzniklé vypadnutím z roztoku látek tělu vlastních (např. kyselina močová) nebo autoimunitní reakce. Mnohdy zánět vzniká z příčin

iatrogeních. Zánět probíhá tak dlouho, dokud se v ráně nachází jakékoliv odpadní struktury. Někdy tak dochází až k rozvoji chronických vředů a příliš dlouho probíhající zánět vede k poškození tkáně. Pak je žádoucí ho tlumit.

Hlavní místní tělesné charakteristiky zánětu byly popsány již Celseem (30 B.C.- 38 A.D.). Jedná se o bolest (*dolor*), zvýšenou teplotu (*calor*), zarudnutí (*rubor*), zduření (*tumor*) a narušenou funkci (*functio laesa*). Poslední jmenované bylo přidáno Virchowem až roku 1858. Celkové příznaky zánětu jsou zvýšená teplota, změny v krevním obraze, zvýšená sedimentace (změny spektra bílkovin) a tvorba protilátek. Za charakteristické známky zánětu jsou zodpovědné působky, které jsou uvolňovány žírnými buňkami. Ty obsahují granula, z nichž uvolňují enzymy a aktivní aminy-především histamin. Dalšími významnými látkami v procesu zánětu jsou zánětové mediátory (cytokiny), které budou podrobněji popsány níže.^{4, 5, 6}

7. 2. 2. 1. Neutrofily

Dominantními buňkami v místě zánětu se během prvních tří dnů po poranění stávají neutrofily (polymorfonukleární leukocyty, PMN). Jejich počty vrcholí především během druhého dne. Význam těchto buněk spočívá ve fagocytóze cizorodého materiálu, bakterií a nefunkční zničené tkáně v ráně. Díky tzv. respiračnímu vzplanutí, kdy dochází k uvolnění volných radikálů, mají i schopnost hubení bakterií. V ráně dále uvolňují proteázy, degradující narušenou tkáň. Po splnění své funkce podstupují apoptózu, nebo jsou pozřeny makrofágy, které je v místě poranění nahrazují přibližně po dvou dnech. Ty také brání nadměrné tvorbě reaktivních sloučenin neutrofily a chrání tak tkáň před dalším poškozením.

7. 2. 2. 2. Makrofágy

Makrofágy vznikají z monocytů po jejich výstupu z krevního řečiště do extravaskulárního prostoru. S jejich příchodem se pojí přechod časné fáze zánětu do fáze pozdní. Mají opět význam především díky schopnosti fagocytózy a uvolňování proteáz. Během třetího až čtvrtého dne vrcholí jejich produkce cytokinů. Mezi zásadní zde patří PDGF a transformující růstový faktor β (TGF- β), dále TGF- α , FGF a IL-1. Makrofágy jsou stimulovány nízkým obsahem kyslíku v ráně k produkci faktorů urychlujících angiogenezi. Aktivují také buňky produkující extracelulární matrix. Jsou zásadními buňkami v procesu zánětu, tvorby granulační tkáně a přechodu první fáze hojení ran do fáze druhé, kterou je proliferace.^{4, 5, 6}

7. 2. 3. Proliferace

Proliferační fáze se částečně překrývá s fází zánětlivou. Významný je pro ni vstup fibroblastů a endoteliálních buněk do místa rány, k němuž dochází zhruba druhý až třetí den po vzniku poranění. Tyto buňky jsou atrahovány TGF- β uvolňovaným trombocyty, makrofágy a T-lymfocyty. TGF- β zde má význam i pro ukládání extracelulární matrix. Zvyšuje transkripci genů pro kolagen, proteoglykany a fibronektin, snižuje sekreci metaloproteáz matrix (MMP) a stimuluje tkáňové inhibitory metaloproteáz (TIMP). Mezi

další významné působky této fáze se řadí interleukiny, TNF- α a FGF. Protože fibroblasty a epitelové buňky vyžadují pro svou činnost přítomnost kyslíku, je nutné, aby došlo v ráně k obnovení krevních cév.

7. 2. 3. 1. Tvorba granulační tkáně

Proces angiogeneze a fibroplazie pak shrnujeme pod pojem tvorba granulační tkáně. Tato tkáň vzniká v ráně již během fáze zánětu, zhruba dva až pět dní po poranění. Je nezbytná pro dočasné vyplnění prázdňého prostoru, který zde vznikl a v ráně přetrvává až do okamžiku překrytí dna rány tkání novou. Granulační tkáň je tvořena novými krevními cévami, fibroblasty, buňkami zánětu, endoteliálními buňkami, myofibroblasty a komponenty nové provizorní EM. Složení provizorní EM je odlišné od té, která se vyskytuje v normální tkáni. Provizorní matrix obsahuje fibronectin, kolagen, glykosaminoglykany a proteoglykany. Jejimi hlavními komponentami jsou fibronectin a hyaluronan. Hyaluronan vytváří vysoce hydratovanou strukturu a umožňuje migraci buněk významnou pro proces hojení rány.

Angiogeneze neboli neovaskularizace je významnou součástí proliferační fáze. Základem nových cév se stávají endoteliální buňky, pocházející z cév zachovalých. Ty vysílají pseudopodia a protlačují se skrz EM do místa poranění. Pro svou migraci využívají kolagenázy a aktivátor plazminogenu. Ty jim umožní degradovat část EM a sraženinu. Endoteliální buňky se řadí k sobě a dávají vzniknout jakémusi výhonku. Tyto struktury se pak slučují za vzniku kapilárních smyček-lumen cév. Nově vzniklé kapiláry jsou velmi křehké a propustné. To umožňuje přístup tekutiny bohaté na proteiny a červených krvinek do extravaskulárního prostoru, a tak nová granulační tkáň je často oteklá. Růst a proliferace endoteliálních buněk jsou podporovány hypoxií a přítomností kyseliny mléčné v ráně. Jakmile dojde ke změně tohoto stavu a tkáň je adekvátně perfundovaná, proliferace a migrace endoteliálních buněk je redukována. Nadbytečné cévy pak zanikají apoptózou. I pro optimální funkci fibroblastů je potřeba mírně kyselé prostředí v místě poranění.^{4, 5, 6}

Množství fibroblastů v ráně vrcholí první až druhý týden po vzniku poranění. Jejich proliferace dosahuje vrcholu druhý až třetí den. Do rány migrují z jejích okrajů. K pohybu využívají fibronectin, přítomný v provizorním strupu, vzniklém v předchozí fázi zánětu, a 3D uspořádaná vlákna EM. Průnik skrz EM jim umožňují secernované enzymy, jako např. t-PA a kolagenázy.

Zhruba po týdnu od vzniku poranění fibroblasty podstupují modifikaci buněčného fenotypu. Takto pozměněné buňky pak získají schopnost kontrakce a větší pohyblivost. Označujeme je jako myofibroblasty. Jsou to buňky shodné s buňkami hladké svaloviny. Tato změna je pravděpodobně způsobena stejnými působky jako migrace fibroblastů. Tedy např. PDGF, TGF- β nebo IL-4. Kontrakce rány je dostředivý pohyb okolní neponičené kůže. Je významná především u živočichů s odlišným typem kůže (tzv. loose-skinned-anglický termín), u nichž *panniculus carnosus* umožňuje snadný pohyb kůže přes fascii. U člověka je kůže méně pohyblivá kvůli přichycení k spodním strukturám, a tak má kontrakce v uzavírání rány mnohem menší význam. Její míra však závisí na hloubce rány. U ran v celé tloušťce

kůže se uplatňuje více, než u těch v částečné tloušťce kůže. Při nadměrném stahu rány může dojít až k deformaci a dysfunkci, naopak při nedostatečné kontrakci rány dochází k většímu krvácení a vyššímu riziku infekce. Zpočátku kontrakce pobíhá bez zapojení myofibroblastů. Většinou k ní nedochází symetricky.⁵

Fibroblasty v ráně produkují glykoproteiny, glykosaminoglykany, proteoglykany, fibronectin, elastin a kolagen. Zpočátku dominantně kolagen typu III. Jeho syntéza začíná druhý až třetí den a vrcholí mezi prvním a třetím týdnem po poranění. Z počátku množství kolagenu v ráně narůstá, pak však dojde k vytvoření rovnováhy mezi jeho syntézou a degradací. To je jedním ze signálů pro přechod hojení do zrací fáze. Granulace postupně ustává a fibroblasty páchají apoptózu.

Při syntéze kolagenu je významným procesem především hydroxylace prolinových a lysinových zbytků, která probíhá po sekreci prokolagenu do extracelulárního prostoru. Hydroxylovaný prolin umožňuje uspořádání molekuly kolagenu do trojšroubovicové struktury, která je poměrně stabilní. Za anaerobních podmínek, nebo při nedostatku vitamínu C pak dochází k nedostatečné hydroxylaci a vzniklá struktura velmi snadno denaturuje už za nižších teplot. Při přílišném nedostatku kyslíku je růst fibroblastů a jejich produkce EM inhibována a může dojít k nadměrné fibrotizaci a zjizvení. Pro stabilitu molekul kolagenu jsou významné i další procesy, které molekula podstupuje mimo produkující buňku. Jedná se o vyštípnutí částí řetězce a intra- i intermolekulární zesíťování struktury. Přesto v místě, v němž došlo k poranění, již kůže nikdy nedosáhne pevnosti, tak jako předtím. Fibroblasty také secernují působky, atrahující do místa poranění epitelální buňky.^{4, 5, 6}

7. 2. 3. 2. Epitelizace

Posledním krokem proliferační fáze je epitelizace. Hlavními buňkami, zodpovědnými za tuto fázi, jsou bazální keratinocyty z okrajů rány a kožních přídatných struktur, jako jsou vlasové folikuly, potní a mazové žlázy. Buňky migrují přes nově vytvořenou tkáň, aby vytvořily bariéru mezi ránou a zevním prostředím. Keratinocyty mohou migrovat, aniž by nejprve proliferovaly. Tak jejich pohyb může začít již několik málo hodin po poranění. Nicméně v případě hlubokých ran zde chybí tkáň, přes kterou by mohly postupovat, a je nutné vyčkat do vytvoření granulační tkáně. Pro zajištění dostatečného počtu buněk dochází k proliferaci druhý až třetí den po vzniku rány. Dokud není vnitřek rány vyplněn, jsou jedinými proliferujícími epitelálními buňkami ty, na jejich okrajích. Migrace keratinocytů je stimulována nedostatkem kontaktní inhibice a např. oxidem dusitým. Normálně jsou tyto buňky spojeny navzájem s EM desmosomy a hemidesmosomy. Ty musí být před započítím jejich pohybu rozpuštěny. Keratinocyty také mění svůj tvar. Zplošťují a prodlužují se a vysílají pseudopodia. Buňky migrují i přes sebe navzájem vytváří epitelální výběžky. Keratinocyty v kontaktu s bazální membránou dávají vzniknout *stratum basale*, ostatní buňky pokračují v migraci.

Pohyb keratinocytům umožňuje stejně, jako v případě fibroblastů fibronectin. Epitelální buňky se pohybují po granulační tkáni, ovšem stále pod strupem (pokud vznikl). Postupně ho

tak oddělují od spodní tkáň. Mají také schopnost ho rozpustit, podobně jako zbytky odpadu v ráně a část EM. Secernují t-PA, proteázy a kolagenázy, jako např. MMP. Činnost epitelálních buněk je snazší ve vlhkém prostředí. V opačném případě totiž vzniká větší a tužší strup. Jsou to buňky fagocytující. Buňky migrují, dokud se ty z protilehlých stran nepotkají ve středu rány. Pak dojde ke kontaktní inhibici. Migrace je ukončena a keratinocyty začnou produkovat proteiny bazální membrány a nastává opačný proces ve změně vzhledu buněk, než k jakému došlo na počátku epitelizace. Buňky bazální vrstvy se začnou dělit a diferencovat stejným způsobem jako za normálního stavu a dojde k znovuustavení jednotlivých vrstev *epidermis*.^{4, 5, 6}

7. 2. 4. Remodelace

Přechod hojení rány do zrací a remodelační fáze je signalizován rozvratem provizorní matrix, poklesem množství kyseliny hyaluronové a nárůstem koncentrace chondroitin sulfátu. To postupně snižuje migraci a proliferaci fibroblastů. Počátek zrací fáze je charakteristický i rovnováhou mezi produkcí a degradací kolagenu. Poslední část procesu hojení ran může trvat i déle než rok. Tato doba závisí na velikosti poranění a charakteru rány. Dochází k pozvolné degradaci kolagenu typu III a jeho náhradě za pevnější typ I. Původně desorganizovaná vlákna kolagenu jsou zesítena a uložena do silnějších podélných svazků. Kůže v místě poranění postupně získává větší pevnost. Ta však už nikdy není větší než 80% pevnosti neporušené kůže. Aktivita rány se snižuje, což vede k vymizení zarudnutí jizvy. Klesá počet cév i buněk v místě poranění. Ty, když již v ráně nejsou více potřeba, páchají apoptózu.^{4, 5, 6, 15, 16}

8. Cytokiny

Jako cytokiny se souhrnně označují zánětové mediátory. V užším smyslu jsou definovány jako solubilní mediátory obranné odpovědi organismu. V širším smyslu termín cytokiny zahrnuje i růstové faktory krevních řad (hemopoetické růstové faktory) a růstové faktory epitelových a mezenchymových buněk.²⁶ Cytokiny působí v organismu v koordinaci s klasickými hormony a hepatálními proteiny akutní fáze (APP) jako signální síť a regulují chování řady buněk imunitního, hemopoetického, endokrinního, kardiovaskulárního a dalších systémů. Souhrn vazeb, zajišťujících vzájemné interakce těchto buněk za fyziologických podmínek i v průběhu systémové zánětové reakce, se označuje jako cytokinová síť. Ta zahrnuje cytokiny a lokálně uvolňované hormony s podobnými vlastnostmi (např. vazopresin, kortikoliberin), membránově vázané mediátory charakteru cytokinů (např. adhezivní molekuly), buněčné receptory cytokinů, solubilní inkompletní receptory a antagonisty, inaktivující cirkulující cytokiny a některé APP vázající cytokiny v cirkulaci (např. α_2 makroglobulin) nebo vykazující některé vlastnosti cytokinů (např. C-reaktivní protein).

Jedná se o informační molekuly polypeptidové struktury s nízkou molekulární hmotností ($M_r < 80$ kDa). Působí především parakrinně a autokrinně. Některé cytokiny s výrazně prozánětovou aktivitou (IL-6, TNF- α) v průběhu syndromu systémové zánětové odpovědi (SIRS, viz níže) působí i mechanismem endokrinním. Efekty cytokinů se vzájemně překrývají, doplňují a přes řadu jednoduchých i složitých vazeb na různých úrovních vzájemně ovlivňují. Různé typy buněk produkují stejné cytokiny a také jeden typ buněk je schopen tvořit cytokiny s různými účinky.

8. 1. Receptory cytokinů

Cytokiny se podobně jako ostatní faktory mezibuněčné komunikace (hormony, neuromediátory) vážou na specifické buněčné receptory. Možná je i jejich vazba na nekompletní receptorové podjednotky, tzv. solubilní receptory cytokinů, schopné vázat v krvi a dalších tělesných tekutinách volné cytokiny. Tato vazba, kdy solubilní receptor blokuje vazebné místo cytokinu, je ve většině případů inaktivující (např. TNF α). Výjimečně je naopak vzniklý komplex solubilní receptor-cytokin navázán na další receptorové podjednotky na buněčné membráně a aktivuje postreceptorové děje (např. IL-6). Solubilní receptory cytokinů jsou nejčastěji uvolněné fragmenty membránových receptorů, vzniklé proteolytickým štěpením. Případně se jedná o přímé produkty genové transkripce, kdy vzniklý protein nemůže být inkorporován do buněčné membrány, protože postrádá transmembránovou sekvenci.²⁶

8. 2. Dělení cytokinů

Názvosloví cytokinů je složité a odráží především historické souvislosti jejich objevu. V posledních desetiletích byly zavedeny tyto skupinové názvy: interferony, kolonie stimulující faktory, interleukiny a chemokiny.

Interferony (IFN) je označení pro cytokiny s antivirovým a antiproliferačním potenciálem. Dále se dělí na IFN I. typu (zahrnující přes 20 podtypů IFN α a jediný typ IFN β), které se váží na společné receptory a jejich aktivity jsou blízké, a na IFN II. typu (IFN γ), jehož antivirový efekt je méně významný a převažuje imunomodulační působení.

Kolonie stimulující faktory (CSF) jsou růstové faktory hemopoetických kmenových buněk. Označení kolonie stimulujících faktorů je v názvu tří cytokinů (granulocytární, granulocyto-monocytární a monocytární CSF). Pro IL-3 se výjimečně používá synonymum "multi-CSF". Ostatní faktory s hemopoetickým působením si buď zachovaly původní název (erythropoetin), nebo získaly označení.

Název **chemokiny**, interkiny nebo chemoatraktanty se používá pro peptidy s chemotaktickým působením na granulocyty, makrofágy a další skupiny leukocytů. Působí také zvýšení adheze leukocytů k endoteliím, expresi leukocytárních β_2 -integrinů, tvorbu leukotrienů atd. Podle strukturální podobnosti se dosud 14 popsanych chemokinů dělí na 2 podtřídy: α -chemokiny (např. IL-8) a β -chemokiny, lišící se strukturou vazebné sekvence na N-konci molekuly a umístěním genů, které je kódují.

Interleukiny zahrnují škálu zánětových mediátorů s prozánětovým i protizánětovým působením i některé růstové faktory krevních řad.

Ani dělení popsané výše však nevystihuje funkční a vývojové vztahy mezi cytokiny. Dle místa vzniku lze využít označení: **monokiny** (cytokiny tvořené monocyty), **lymfokiny** (produkty lymfocytů) nebo **neurokiny** (peptidy cytokinové povahy ,tvořené nervovými buňkami). Podobnost jednotlivých působků na základě struktury, funkce, receptorové podobnosti a možné evoluční příbuznosti vyjadřují rodiny cytokinů. V současnosti je popsáno kolem 130 mediátorů mezibuněčné komunikace s charakteristikami cytokinů. Jen malá část z nich je využívána terapeuticky a diagnosticky.²⁶

8. 3. SIRS a CARS

V organismu vedle cytokinů s převážně prozánětovým působením, které se uplatňují především v iniciálních fázích obranné odpovědi, fungují i mechanismy opačné. Tato aktivita se označuje jako syndrom kompenzační protizánětové odpovědi (CARS), který je indukován syndromem systémové zánětové odpovědi (SIRS) a probíhá současně s ním. SIRS představuje obrannou odpověď organismu se snahou lokalizovat a eliminovat exogenní nebo endogenní patogen infekčního či neinfekčního původu. CARS je pak součástí systému negativních zpětných vazeb cytokinové a endokrinní sítě a limituje rozsah a trvání SIRS. Kompenzační protizánětová odpověď zahrnuje mimo cytokinů s protizánětovým působením (např. IL-4, IL-10) afunkční cytokiny s kompetitivně antagonistickým působením na cílovém membránovém receptoru, solubilní receptory, vyvazující cirkulující cytokiny před navázáním na membránový receptor, kompetici cytokinů na úrovni společných receptorových podjednotek, down-regulaci membránových buněčných receptorů, inhibitory zánětu mimo cytokinovou

kaskádu (např. PGE₂), aktivaci osy hypothalamus-hypofýza-nadledvinky (HPA) s hyperprodukcí kortikoidů a syntézu APP.

8. 4. Proteiny akutní fáze

Hlavními induktory syntézy APP jsou prozáněťové cytokiny. Ostatní faktory mají pouze modulační úlohu a nevedou k navození charakteristického obrazu záněťové jaterní proteosyntézy. Reakce APP tak odráží nástup, intenzitu a vzájemné antagonistické poměry cytokinové sítě. Rozhodujícím induktorem většiny pozitivních APP a inhibitorem negativních APP je IL-6. Zprostředkovaně indukcí IL-6 pak působí IL-1 a TNF α , které v experimentech *in vivo* dokážou také navodit plný rozsah reakce APP. Významná je jejich vzájemná interakce a časová návaznost. Nezbytným předpokladem plného rozvinutí syntézy APP v průběhu záněťové odpovědi je přítomnost glukokortikoidů. Účinek těchto rozhodujících faktorů je doplňován působky s podobným receptorovým a transmembránovým mechanismem účinku a naopak vyvažován vlivem cytokinů s převážně protizáněťovým nebo imunomodulačním účinkem (např. IL-4, IL-10, IL-13). Modulace syntézy APP závisí nejen na přímých účincích příslušného cytokinu na hepatocyty, ale i na jeho interakci s dalšími mediátory záněťové odpovědi. Protizáněťové působky ovlivňují stimulaci či inhibici syntézy IL-6, IL-1, nebo TNF α zprostředkovaně syntézu APP významněji, než přímým efektem na hepatocyty.

APP lze dělit na 2 skupiny. Na proteiny I. a II. typu, dle jejich regulace v průběhu záněťové odpovědi. Za APP I. typu jsou pokládány ty proteiny, jejichž syntéza je stimulována TNF α , IL-1 a IL-6 (C3 složka komplementu). Proteiny tohoto typu jsou indukovány během několika hodin po záněťovém stimulu. APP II. typu jsou proteiny, které jsou stimulovány IL-6 a glukokortikoidy, zatímco TNF α a IL-1 se na jejich stimulaci nepodílejí, nebo ji dokonce inhibují (skupina inhibitorů proteáz). Plazmatické hladiny mají pozvolnější dynamiku než APP I. typu a odrážejí lokální poměry cytokinů v jaterní tkáni. Odpověď APP II. typu je výraznější zejména u chronických zánětů, některých viróz a hematologických malignit, kde je rovnováha mezi IL-6 a IL-1 vychýlena ve prospěch IL-6.

Většina APP má protektivní vliv na tkáň a omezuje rozsah tkáňového poškození volnými leukocytárními proteázami a oxidačním stresem a připravuje podmínky pro reparační fázi zánětu (např. iniciaci angiogeneze). APP je v zásadě možné zařadit mezi mechanismy kompenzační protizáněťové odpovědi.²⁶

8. 5. Cytokiny, významné v procesu hojení

Dále bych se zaměřila na cytokiny, které mají v průběhu hojení ran největší význam, a na jejich účinky, jimiž právě tento proces ovlivňují. Výčet všech funkcí různých působků by byl mnohem větší, pro tuto práci však bez většího významu.

Interleukin-1 (IL-1) existuje ve dvou solubilních formách, IL-1 α a IL-1 β . Obě varianty mají stejnou molekulární hmotnost 15 kDa, vykazují strukturní podobnost, váží se na společné receptory a jejich účinky jsou totožné. Jsou však kódovány odlišnými geny. Vzniklý prekurzor molekulární hmotnosti 31 kDa je štěpen enzymem kaspázou do podoby aktivního

cytokinu. V zánětové odpovědi je dominující cirkulující formou IL-1 β . Druhá forma proteinu zůstává především navázána na buněčné membráně. Zdrojem IL-1 jsou makrofágy a polymorfonukleární leukocyty (PMN). Jak již bylo zmíněno výše, patří k hlavním prozáněťovým cytokinům časně fáze SIRS se širokým spektrem účinků. IL-1 indukuje syntézu řady APP v játrech, má chemotaktický a aktivační efekt na PMN a stimuluje jejich vyplavení z kostní dřeně v průběhu zánětové odpovědi. Je endogenním pyrogenem, hlavním aktivátorem HPA stresové osy a syntézy dalších stresových hormonů v hypofýze a hypotalamu. Ve studiích na prasatech i lidech se prokázal pozitivní vliv IL-1 na hojení ran. Tento působek zrychluje reepitelizaci, tak významnou u obou druhů.

Interleukin-6 (IL-6) je prokazatelně jediným cytokinem, který je schopný rozvinout plný obraz reakce akutní fáze. Reguluje všechny hlavní pozitivní a negativní APP. Hlavním zdrojem IL-6 jsou makrofágy, PMN a T-lymfocyty. IL-6 stimuluje proliferační a funkční aktivitu T a B lymfocytů, zvyšuje hematopoetický efekt IL-3 na pluripotentní kmenové buňky, má kostimulační efekt v procesu zrání megakaryocytů, indukuje proliferaci mezangiálních buněk, keratinocytů a indukuje tvorbu IL-2 a expresi jeho receptorů. Do tzv. cytokinové rodiny IL-6 patří nyní 9 cytokinů (např. IL-11, leptin, granulocytární kolonie stimulující faktor). Mají velmi podobné, ale ne zcela totožné funkční charakteristiky.

Faktor nekrotizující tumory α (TNF α) je produkován monocyty, fibroblasty a T lymfocyty. Jedná se o pyrogen, stimulátor imunitní odpovědi a modulátor řady metabolických funkcí. Účinky TNF α se částečně překrývají s IL-1 β . TNF α aktivuje neutrofile, B lymfocyty a endotel (se sekundárním zvýšením permeability, vazodilatací, expresí adhezivních molekul a zvýšením prokoagulační aktivity endotelu). Tento protein stimuluje proliferaci vaziva a aktivuje syntézu APP v játrech. Pro TNF existují 2 rozdílné typy receptorů. Typ TNFR-I (také typ B, nebo typ β) a typ TNFR-II (také typ A, nebo typ α). Oba typy receptorů jsou vysoce afinitní pro TNF α i TNF β . Prakticky všechny buněčné typy exprimují jeden, nebo oba typy receptorů.

Transformující růstový faktor β (TGF- β) vykazuje protizáněťové působení v průběhu zánětové odpovědi, ale i řadu účinků tkáňově specifických, stimulačních nebo inhibičních proliferaci buněk. V současné době je známo 5 izoform. TGF β ovlivňuje růst, diferenciaci i aktivity řady buněčných typů. Efekty na T lymfocyty, monocyto-makrofágy, NK buňky a hematopoetické prekurzory mají především inhibiční (protizáněťový) charakter. Na liniích krysích hepatocytů byl prokázán inhibiční vliv na stimulovanou produkci řady APP navozenou např. TNF, IL-1, IL-6 či IL-11. Na druhou stranu TGF β shodně s hlavními prozáněťovými cytokiny inhibuje syntézu některých negativních APP (albumin).

Transformující růstový faktor α (TGF- α) má účinek především na epiteliální buňky. Stimuluje mitózu, podporuje zánětlivou odpověď, inhibuje mechanismy vedoucí k apoptóze a celkově stimuluje hojení ran.²⁶

Fibroblastový růstový faktor (FGF) patří do rodiny multifunkčních proteinů, které jsou především mitogeny. Uplatňují se již během embryonálního vývoje a při hojení ran tkví jejich

význam hlavně ve stimulaci angiogeneze a proliferace fibroblastů, které dávají vznik granulační tkáni. FGF podporuje růst nových krevních cév z preexistující vaskulatury a je účinnější, než vaskulární endoteliální růstový faktor, nebo z destiček odvozený růstový faktor. FGF7 a FGF10 (neboli keratinocytový růstový faktor KGF a KGF2) stimulují proliferaci, migraci a diferenciaci epitelálních buněk. Fibroblastové růstové faktory váží heparan sulfát, proteoglykan, obsažený v extracelulární matrix, kde se také nachází.^{26, 40}

Z destiček odvozený růstový faktor (P-DGF) existuje v 5 izoformách. Má význam především ve stimulaci angiogeneze a buněčném dělení fibroblastů. PDGF zahajuje chemotaxi neutrofilů, makrofágů, fibroblastů a buněk hladké svaloviny. Má také mitogení aktivitu v případě hladkosvalových buněk a fibroblastů.⁴¹

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) je důležitým signálním proteinem vaskulogeneze (*de novo* formace embryonálního oběhového systému) i angiogeneze (tvorba krevních cév z preexistující vaskulatury). Podporuje mitózu i migraci endoteliálních buněk a působí chemotakticky na makrofágy a granulocyty. VEGF funguje také jako vasodilatátor a faktor zvyšující cévní permeabilitu. Jeho tvorba je indukována v buňkách s nedostatkem kyslíku.⁴²

Epidermální růstový faktor (EGF) hraje významnou roli v regulaci růstu, proliferace a diferenciaci buněk. Jeho účinky na hojení ran byly studovány *in vitro* u prasat i lidí. Výsledky jednotlivých studií se však rozcházejí. Některé studie prokázaly stimulační vliv EGF na reepitelizaci, jiné toto nepotvrdily. Tyto rozdílné výsledky mohou být způsobeny např. malým rozsahem studií, či subjektivní povahou hodnocení ran. EGF působí prostřednictvím receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) na povrchu buněk. Ten je ve velké míře zastoupen i na povrchu mnoha typů buněk nádorových, které se pak v přítomnosti EGF nepřiměřeně dělí.³⁸

Insulinu podobný růstový faktor (IGF) je polypeptid s vysokou sekvenční podobností insulínu. Je secernován především v játrech v odpovědi na stimulaci růstovým hormonem. Uplatňuje se v regulaci mnoha fyziologických i patologických stavů. IGF podporuje proliferaci buněk a inhibuje apoptózu. Ovlivňuje téměř všechny buňky v těle, především však buňky svalů, chrupavek, kostí, nervů, kůže, jater, ledvin a plic.^{26, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 56, 57}

8. 6. Další mediátory významné v procesu hojení

Dalšími důležitými mediátory při hojení ran jsou proteázy, enzymy štěpící bílkoviny přítomné ve všech exudátech ran. Hrají klíčovou úlohu. Klasifikují se podle struktury aktivního místa na metaloproteázy, serinové, cysteinové a aspartové proteázy. Jsou produkovány v různých buňkách (granulocytech, keratinocytech, fibroblastech) v proaktivní nebo latentní formě a pro plné působení musí být aktivovány. Tkáňové inhibitory (TIMP) naopak působení proteáz omezují. Rovnováha mezi tvorbou a degradací tkáně je dána poměrem proteáz a jejich inhibitorů. Narušení rovnováhy při nadbytku proteáz a nedostatku inhibitorů udržuje pak ránu v chronicitě. Navíc nadbytek proteáz destruuje růstové faktory.

Nejzajímavější z hlediska hojení ran jsou matrixové metaloproteázy (MMP). Jedná se o podtřídu 17 známých zinek-dependentních endopeptidáz. Přítomnost zinku v molekule je nutná pro správnou funkci enzymu. Jsou syntetizovány jako inaktivní zymogeny a aktivují se odštěpením malého fragmentu. Jejich řízená aktivace je nezbytná, jinak by docházelo k nekontrolovanému štěpení vlastních bílkovin. Optimálně fungují za fyziologického pH. Degradují 1 nebo více proteinů EM. V kapilárách degradují bazální membránu obklopující kapilární endotel, a tím vlastně usnadňují angiogenenzi. Během závěrečné fáze hojení jsou MMP produkovány myofibroblasty, napomáhají přeměně a kontrakci aktinu těchto buněk, čímž dochází ke zmenšování rány kontrakcí rané matrix. Tkáňové inhibitory jsou známy jako TIMP-1, -2, -3, -4.⁵⁵ Podrobně se vlivem MMP při hojení ran zabývala ve své diplomové práci Zuzana Prošková.⁶¹

9. Faktory ovlivňující hojení ran

Faktory ovlivňující proces hojení ran lze rozdělit na **vnitřní a vnější**. Vycházejí z poznatků o fyziologii a patologii hojení ran. Mezi vnitřní faktory patří samozřejmě celkový zdravotní stav, věk, výživový status, prokrvení tkání a charakter zánětlivé odpovědi. Faktory vnějšími jsou infekce, medikace, mechanický či chemický stres, vysychání, teplota v ráně a neodstraněné zbytky tkání.⁹

9.1. Vnitřní faktory

Co se týká celkového zdravotního stavu, tak systémovými příčinami poruch hojení ran mohou být nádorová onemocnění (včetně radio- a chemoterapie – faktory vnější) i chronická infekční onemocnění (např. AIDS, TBC, sepse).

S rostoucím věkem se pojí jednak vyšší výskyt chorob, z nichž mnohé hojení ran ovlivňují, a jednak ubývající kvalita vazivové tkáně. Dochází k ubývání elasticity, pevnosti v tahu, snižují se hydratace a nutriční kvality kůže, což všechno negativně ovlivňuje procesy hojení.

Hojení je proces extrémně energeticky i látkově náročný. Stav malnutrice různé etiologie velmi ovlivňují regenerační schopnost tkání. Pro tyto stavy je charakteristické snížení tělesné hmotnosti, množství tukových rezerv (ne u kwashiorkorového typu), koncentrace sérových proteinů (např. albumin, prealbumin, transferin), dále je přítomna imunosuprese, vyjádřená poklesem počtu lymfocytů v krvi nebo anergií. Nejrizikovějšími faktory pro zhoršení hojení ran jsou úbytek hmotnosti a deplece proteinů zvláště akutně vzniklé (v průběhu několika týdnů).

Dostatečné prokrvení tkání má význam pro přívod kyslíku, živin, buněk imunitního systému a odvod splodin metabolismu z rány. To zajišťuje krev a cévní systém. Poruchy jsou způsobeny buďto nedostatečností kardiopulmonálního systému (poruchy arteriální perfuze – ischemie, městnání ve velkém oběhu – periferní otoky), onemocněním cév (např. ateroskleróza, žilní insuficience, poruchy lymfatické drenáže, přetrvávající vazokonstrikce), či hematologickými vadami (např. poruchy hemokoagulace, anémie, nedostatek nebo nadbytek neutrofilních granulocytů). Rozmezí pO_2 , kdy tkáňové oxygenázy mohou fungovat, je 20-200 mm Hg. Běžné pO_2 v časném sekretu je asi 30-40 mm Hg, tzn. že tyto enzymy nepracují v plném rozsahu své funkční kapacity. Terapeuticky lze zvýšit pO_2 ve tkáních několika způsoby: dýcháním koncentrovaného O_2 , použitím hyperbarických komor (běžně používaný tlak je do 2-3 atm.) nebo použitím roztoků vázajících kyslík pro přímou aplikaci do rány.

Neadekvátní zánětlivá reakce způsobuje poruchy hojení. Snížená zánětlivá odpověď vede ke zpomalení hojení. Může být způsobena imunitním defektem, změnami v sekreci hormonů, působících oslabení iniciální zánětlivé fáze hojení (např. glukokortikoidy, kombinace hladin estrogenů a gestagenů, jaké se objevují v těhotenství), nebo arteficiálně medikací. Naopak zvýšená zánětlivá reakce v mírné formě vyvolá tvorbu hypertrofické jizvy. V silnější formě může dojít k takové stimulaci zánětlivých buněk, že začnou produkovat cytokiny v

cytolytických množstvích a velké množství proteáz. Nemusí dojít k tvorbě granulační tkáně, a nebo dojde k rozpuštění té již vzniklé. Prolongovaný zánět vede ke vzniku nadměrného zjizvení. Příčinou jsou obvykle infekce nebo přítomnost cizích těles.^{7, 8, 9, 10, 11, 24}

9. 2. Vnější faktory

Pro proces hojení ran jsou významné bílkoviny, tuky i cukry. Proteiny jsou ve formě aminokyselin zásadním zdrojem pro tvorbu bílkovinných struktur hojící se tkáně, tuky zdrojem energie a sacharidy zdrojem energie a stavebních látek, přičemž je nutno podotknout, že velká část sacharidových podjednotek molekul matrix vazivové tkáně je novotvořena.

Vedle těchto bazálních látek je nezbytný i dostatek vitaminů a minerálů. K jejich absenci v organismu může dojít při jejich nedostatečném příjmu potravou, ale i v období zvýšené potřeby organismu, jako jsou např. infekce, rozsáhlejší reparační procesy, chronická onemocnění, těhotenství nebo růst a vývoj organismu.

9. 2. 1. Vitaminy

Naprosto zásadní pro tvorbu kolagenu je **vitamin C** - kyselina askorbová. Působí jako kofaktor redoxních reakcí, tj. v případě kolagenu se účastní hydroxylace lyzinu a prolinu. Vznikající aminokyseliny hydroxylyzin a hydroxyprolin jsou nutné pro jejich schopnost tvořit pevné vazby mezi jednotlivými vlákny, tzn. pro tvorbu kvalitního, pevného vaziva. Z dalších účinků souvisejících s hojením ran je nutno uvést, že působí i jako ochranný protiinfekční faktor. Redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} v trávicím traktu zvyšuje biologickou dostupnost železa a zvyšuje účinnost kyseliny listové. Při nedostatku kyseliny askorbové se v různé míře projevují příznaky skorbutu, tzn. zvýšená vnímavost k infekcím, krvácení dásní a zhoršená kvalita vaziva při hojení ran.

Vitamin B1 (thiamin) je kofaktorem pyruvátdekarboxylázy, významného enzymu pentózového cyklu. Jeho deficit se projeví sníženou utilizací glukózy, což má za následek poruchu energetického metabolismu. Typickým projevem je nemoc beri-beri, která postihuje nervový a kardiovaskulární systém.

Vitamin B2 (riboflavin) je základem flavin adenin dinukleotidu (FAD) a flavin mononukleotidu (FMN), které jsou součástí řady respiračních flavoproteinů, a má vitální význam pro oxidační, tedy opět energetický metabolismus.

Vitamin B3 (niacin) je ve tkáních přeměněn na aktivní formu nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD) a ve druhém stupni na nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADP). Jedná se o koenzymy dehydrogenáz katalyzujících redoxní reakce, nezbytné pro tkáňové dýchání.

Vitamin B6 (pyridoxin) se jako koenzym účastní metabolismu aminokyselin, syntézy lipidů a hemoglobinu. Při jeho nedostatku se rozvíjí seborrhoická dermatitida, stomatitida či pyridoxin-dependentní anémie.

Kyselina listová a **vitamin B12** (kyanokobalamin) hrají roli při procesu hojení ran v tom smyslu, že anémie, vznikající při jejich deficitech, může způsobovat nedostatečný pO_2 ve tkáních.

Vitamin A spolupůsobí při tvorbě mukopolysacharidů a ovlivňuje keratinizaci a mukózní sekreci ve tkáních.

Vitamin D se podílí na růstu a vývoji epitelálních buněk. Transkutánně se využívá např. v terapii psoriázy, kdy působí antiproliferačně a stimuluje diferenciaci keratocytů. Vitamin E (tokoferol) se podává empiricky při onemocněních kůže (např. ekzémy). Má antioxidační a imunomodulační aktivitu-schopnost potlačovat lokální a chronický zánět.

Vitamin K je kofaktorem při tvorbě některých hemokoagulačních faktorů (např. II, VII, IX, X). Jeho význam je dán tím, že hemostáza stojí na počátku celého procesu hojení.

Empiricky se pro zlepšení kvality kůže a vlasů podává **vitamin H** (biotin), fungující jako kofaktor v metabolismu bazálních živin.

9. 2. 2. Minerální látky

Zinek je kofaktorem více než sta různých enzymů. Účastní se energetického metabolismu, různých procesů intermediálního metabolismu, je důležitý pro tvorbu inzulinu, spermatogenezi a syntézu testosteronu. Jeho nedostatek způsobuje retardaci růstu a vývoje, poškození kůže, adnex a zpomaluje proces hojení ran.

Základní funkce **železa** je dána přítomností v molekulách hemoglobinu a myoglobinu, kde váže kyslík. Je součástí cytochromů, které se podílí na transportu elektronů v oxidačním metabolismu. Jeho nedostatek vede k normocytární anémii a dochází k potlačení funkce myeloperoxidázy lymfocytů a neutrofilů, tedy k potlačení jejich schopnosti tvořit oxidované halogenové sloučeniny, důležité pro ničení bakterií. Zdánlivě paradoxním účinkem je snížení schopnosti množení bakterií při sepsi.

Měď katalyzuje vstup železa do porfyrinového jádra, je nezbytná pro zdravé nehty a vlasy, podílí se na extracelulární modifikaci kolagenu.^{7, 8, 9, 10, 11, 24}

10. Ošetřování ran

Kůže má významnou funkci ochranné bariéry organismu proti fyzikálním, chemickým i biologickým vlivům. Její narušení tak s sebou nese mnohé komplikace. Proto je snaha její funkci po dobu hojení rány alespoň částečně nahradit a podpořit, usnadnit a urychlit proces obnovy kůže. K tomu se využívají různé prostředky farmakologické (masti, krémy, pasty, gely, tinktury) a vhodné krycí materiály. Jejich výběr závisí na aktuálním stavu rány a fázi hojení, v níž se defekt právě nachází.

Krycí materiály se dělí dle skladby a fyzikálních vlastností na primární a sekundární. Primární krytí je přímo ve styku s ránou, absorbuje sekret, zabraňuje vysušení a vstupu infekce do rány a podporuje její reepitelizaci. Sekundární krytí je umístěno až na primárním a jeho funkcí je další ochrana rány, komprese, adheze a podpora absorpce.¹¹

10. 1. Typy terapie

V tzv. **klasické terapii** se využívá kombinace farmakologické léčby se sekundárním krytím (např. vata, výrobky z gázy). Jedná se o tzv. suché hojení, kdy je zabráněno kontaktu rány s okolím. Použití této techniky však vede v ráně k vytvoření nepřírodných podmínek zpomalujících hojení a je spojeno i se značným dyskomfortem pro pacienty.

V současné době se však stále více uplatňuje tzv. **terapie vlhká**, využívající přirozeného fyziologického hojení za vlhkých podmínek. V takové situaci dochází k ideálním podmínkám pro růst granulační tkáně i epitelia. Kromě samotného vlhkého prostředí v ráně zde hraje důležitou úlohu i teplota- ideální je kolem 37 °C. Tyto podmínky zajišťují tzv. terapeutické materiály a dodržení určitých postupů (např. převazy ran za delší časový úsek 2–7 dnů). Při snižování teploty v ráně se hojení zpomaluje. Moderní krytí je nepropustné pro mikroorganismy a mělo by vyloučit další kontaminaci rány. Většina obvazů je vyráběna z materiálů, které mají minimální riziko senzibilizace a iritace. Pro pacienty s chronickými ranami mnohdy tyto materiály přinášejí komfort v léčbě vzhledem ke snadné manipulaci, snímatelnosti a možnosti prodloužení intervalu převazů. Některé mají i částečný analgetický účinek a mohou pohlcovat nepříjemný zápach. Jednotlivé typy moderního krytí rozdělujeme do skupin dle mechanismu účinku.^{11, 17}

10. 2. Druhy krycích materiálů

Absorpční krytí (např. Sterilux ES[®], Zetuvit[®]) jsou vyráběna z netkaného materiálu viskóзовého, bavlněného, nebo polyesterového s vysokou absorpční schopností. Vzhledem k výrazné sací kapacitě mají široké spektrum použití. Používají se buď jako primární krytí (tzv. klasická terapie), nebo jako sekundární krytí na rány středně až silně secernující.

Hydrokoloidní krytí (např. Aquacel[®], Tegaserb[®]) jsou okluzivní dvojrstevná krytí. Zevní vrstvu tvoří pěnová, pro vodu nepropustná polyuretanová hmota. Vnitřní absorpční vrstva obsahuje hydrokoloidní polymerový komplex želatiny, pektinu a

karboxymethylcelulózy. Hydrokoloidní partikule reagují se sekretem z rány a vytvářejí tak gelovou hmotu, která zajišťuje příznivé klima pro hojení rány s vlhkostí kolem 90 % a požadovanou teplotou. Tento druh krytí je vhodný pro granulující rány, mírně až středně secernující. Všechna hydrokoloidní krytí však nemají zcela totožné složení, takže i terapeutické použití se mírně liší. Na celulózovém základě je postavena také technologie vysoce absorpčních vláken Hydrofiber®. Toto krytí zadržuje bakterie mnohem efektivněji než gáza nebo algináty, a tím minimalizuje riziko zkřížené infekce. Jeho absorpce je 25 krát vyšší než jeho vlastní hmotnost. Má vysokou schopnost zadržovat exudát uvnitř vláknů, a to i pod kompresí. Tím je prakticky vyloučena macerace okolní zdravé tkáně.

Hydropolymer (např. Tielle®) jsou obvazy podobné hydrokoloidům. Mechanicky působí na spodinu rány a absorbují přebytečný exudát. Jsou vhodné u defektů mírně secernujících, neinfikovaných, k podpoře granulace a epitelizace. Hydropolymery jsou buď nepartikulované polymery, nebo mixtury polymerů s hydrofilním účinkem. U některých polymerů je udáván obsah vody až 96 %. Forma gelu zajišťuje dobré vyplnění ran. Používají se u ran, které vyžadují hydrataci, změkčení a odloučení nekrotické tkáně při dodržení podmínek vlhkého hojení ran. Po aplikaci chladí, a tím snižují bolest. Výměna se řídí velikostí sekrece (asi za 3 až 7 dnů). Při vyčerpání kapacity dochází ke vzniku puchýře, sekundární krytí není nutné.

Hydrogely (např. Hydrosorb®) jsou transparentní materiály z polyuretanů s vysokým podílem vody, jež poskytují dobré monitorování rány bez převazu. Jsou na jedné straně schopny rehydratovat suchou tkáň a na druhé straně absorbovat sekret exudativních ran. Jsou vyráběny ve formě kompaktní a amorfní. Kombinují se s filmovými obvazy a neadherentními obvazy.

Algináty (např. Sorbalgon®, Kaltostat®) jsou výtažky z hnědých mořských řas. Léčebný efekt těchto řas je znám po staletí. Alginát, polysacharid, je složen z kyseliny guluronové a manuronové. Vlastnosti jednotlivých alginátů jsou odvozeny z poměru těchto dvou látek v produktu. Tento druh krytí má vysokou schopnost absorpce, proto se algináty používají u silně secernujících ran. Při kontaktu se sekretem rány se mění v nedráždivou a nepřilnavou gelovou hmotu, připomínající vodní řasy. Sodné ionty z rány jsou alginátem přijímány, vápenaté ionty z alginátu jsou odevzdávány. Se sekretem rány jsou pohlcovány i choroboplodné zárodky.

Kolageny jsou schopné absorbovat sekret, podporovat proces hojení a povzbuzovat novotvorbu vlastních kolagenních vláken ve tkáni. V ráně se kolagen vstřebává a doplňuje se po dvou až třech dnech. Hodí se pro rány čisté, mírně až středně secernující. **Chitosan s kolagenem** lze aplikovat na rány bez známek masivní infekce, středně až silně secernující, povrchové i hluboké. Výhodou je hemostatický efekt. Pro rány vlhké a silně secernující, zapáchající je možné použít **maltodextrin**.^{11, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25}

Pěnová polyuretanová (PermaFoam®, Allevyn®) krytí jsou jednoduchá nebo vícevrstevná krytí, vyráběná z měkkých polyuretanových materiálů, propustných pro vodní páry a plyny. Kontaktní vrstva umožňuje absorpci do vrstvy, jež v přítomnosti sekretu nabobtnává. Vnější

vrstva bývá semipermeabilní. Jsou to hydrofilní prostředky, které podle druhu výrobku mají různou drenážní schopnost a absorpční kapacitu. Optimální poměr mezi absorpcí a redukcí přebytečného sekretu udržuje ránu přiměřeně vlhkou. Společně s exudátem jsou pojímány i bakterie a zbytky odumřelých buněk. Tím se pěnové obvazy podílejí na čištění rány.

Filmy (např. Mefilm[®], Suprasorb F[®]) jsou složeny z polyuretanu a jsou přilnavé po celé ploše. Na jedné straně jsou opatřeny adhezivním akrylátem se samolepicí schopností. Filmy jsou semipermeabilní. Nejsou schopny absorbovat ani sebemenší množství exudátu. Jsou však průhledné, což může mít za jistých podmínek výhodu pro ošetřovatele. Tvoří bariéru proti infekci a používají se u povrchových defektů, jako sekundární krytí či k fixaci kanyl. Filmy existují i ve formě spreje.

Krytí s aktivním uhlím (např. Actisorb plus[®]) jsou složena z tkaniny obsahující aktivní uhlí, jež absorbuje pach. Proto jsou používány u povleklých a zapáchajících defektů. Protože většinou nemají savou vrstvu, je nutné použít sekundární absorpční krytí. Toto krytí je vhodné pro silně a středně secernující rány a pro rány s příznaky infekce.

Enzymatické prostředky obsahují 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.

Moderní **mokrý interaktivní krytí** (např. TenderWet[®]), reprezentované polyakrylátovým polštářkem v polypropylenové nepřilnavé síťce se superabsorpčním jádrem aktivovaným Ringerovým roztokem, je klasickým představitelem bioaktivní terapie. Ta 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 a choroboplodné zárodky (osmolytický debridement). Užívá se u ran smíšených, infikovaných, povrchových, hlubokých i povleklých.

Hydrobalanční krytí lze s výhodou použít pro rány s malou až střední sekrecí, které potřebují udržet rovnováhu vlhkosti (bércové vředy a jiné chronické rány). Tento materiál by měl bez potřeby výměny reagovat na změny vlhkosti. V případě kolonizace rány jej lze kombinovat s antimikrobními látkami.

Síťová krytí (např. Atrauman[®], Bactigras[®]) jsou tkaniny s většími, či menšími oky z bavlněného materiálu, viskózy, nebo polyesterových vláken. Textilní materiály jsou impregnovány nedráždivými mastnými základy s neutrálním účinkem na kůži a mnohé z nich jsou doplněny účinnými látkami, které jim dodávají aditivní vlastnosti. Jsou permeabilní a používají se převážně u povrchových ran, abrazí, ran chirurgických a popálenin. K ráně neadherují.^{11, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25}

Pro granulující a epitelizující suché rány lze s výhodou použít **silikon**. Nepřilne k ráně, snižuje trauma při převazu a lze ho ponechat v ráně několik dní. Pro rány secernující je dostupné adherentní absorpční krytí potažené silikonovou vrstvou. Speciální adhezivní krytí pro keloidní a hypertrofické rány se užívá k ošetření jizev, aplikuje se na zhojenou kůži.

Působením silikonového plátku dochází po určité době ke změkčení jizvy, k vylepšení její textury a změně zabarvení. Je však nutná dlouhodobá aplikace (2-9 měsíců).

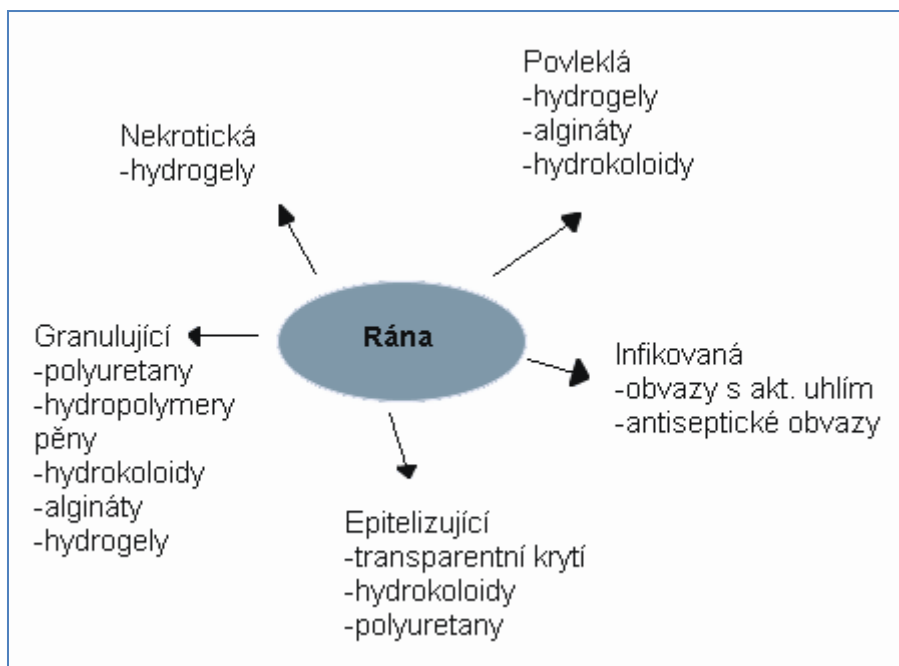
Biomechanický obvaz (např. Promogran[®]) představuje krytí složené z oxidované celulózy s kolagenem, které je schopno inaktivovat činnost proteáz v chronické ráně a zároveň chránit růstové faktory. Proteázy na sebe váže. Je určen pro chronické středně secernující granulující a epitelizující rány. Je plně vstřebatelný.

Antiseptické krycí materiály jsou neadhezivní krytí impregnovaná antiseptickou složkou. Takové látky zneškodňují patogenní mikroorganismy, vyskytující se v prostředí živých tkání, na ranách, sliznicích a kůži. Používají se k prevenci vzniku sekundární infekce a k dezinfekci. Působí nespecificky a většinou se vyznačují velmi širokým spektrem účinku. V současnosti se v praxi používají především materiály, které obsahují jód, nebo stříbro.

Stříbro (např. Acticoat[®], Atrauman Ag[®]) působí jako těžký kov poškození transportního systému elektronů v buňce bakterie a poškozuje také syntézu bakteriální DNA. Bakterie usmrcuje již během třiceti minut po aplikaci. Minimalizace dráždivosti stříbra bylo dosaženo jeho esterifikací se sulfonamidem, či kombinací s aktivním uhlím. Toto krytí má výjimečný duální účinek. Ránu výrazně čistí, neboť aktivní uhlí absorbuje mikroby, tkáňový detrit a tekutinu, a obsažené stříbro svým baktericidním účinkem ničí bakterie absorbované na aktivní uhlí. Sloučeniny stříbra se buď kombinují s algináty, nebo s hydrofíbovým krytím. Ionty stříbra účinkují jen, když se uvolní směrem do rány. K tomu dochází pouze ve vlhkém prostředí.

Jódovidon (léčivo ze skupiny jódoforů) je komplexem jódu s polyvinylpyrrolidonem (např. Inadine[®]). V přípravcích je obsažen ve formě vodných, vodně alkoholických, vodně glycerolových roztoků, nebo v makrogolovém mast'ovém základu. Představuje jódové depot, z něhož se protrahovaně uvolňuje volný jód. Přípravky, které obsahují jód navázaný na organický nosič, se oproti prostým roztokům jódu vyznačují lepší lokální tolerancí. Zde je nutné dávat pozor na možnou přecitlivělost na jód.^{11, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25}

Speciální přípravek s obsahem kyseliny hyaluronové (Hyiodine[®]) a vápenato-sodná sůl kyseliny polyanhydroglukuronové (M-DOC[®]) budou popsány v experimentální části této práce. Jedná se totiž o materiály, které byly v pokusu použity.



Obrázek 9: Výběr vhodného terapeutického obvazu ¹¹

10. 3. Další způsoby ošetřování ran

Z dalších možností ošetřování ran lze zmínit některé využívané fyzikální metody a transplantace.

Laser se uplatňuje v podpoře hojení, čištění rány a oživení spodiny ulcerací. Obecně je jeho účinnost analgetická, protizánětlivá a biostimulační. Využívají se především nízkofrekvenční lasery (např. diodový, galium arzenidový).

Biolampy vydávají viditelné a infračervené spektrum světla. Mají účinek analgetický, podporují granulaci, aktivují fibroblasty, kapiláry a epitelie. Užívají se lokálně.

Hyperbarická oxygenoterapie je prováděna ve speciálních tlakových komorách. Zlepšuje stav ischemizovaných tkání, protože v důsledku vysokého parciálního tlaku difunduje kyslík snáze do tkání. Dále oxygenoterapie podporuje tvorbu kapilár, stimuluje fibroblasty, působí preventivně proti edému a má částečný antimikrobní účinek. Podobně pracují i **pneumatické přístroje** (např. Vasotrain[®]), využívající podtlaku a přetlaku. Tento druh terapie je užíván např. u mikro- a makroangiopatií a nebo dekubitů. **Manžetová pneumatická komprese** vytváří cyklicky se opakující tlaky, postupující od periferie k centru, s následnou dekompresí. Užívá se v prevenci trombóz, terapii bércových vředů a k lymfodrenáži.

Při **transplantacích** lze využít allotransplantace, což znamená, že dochází k přenosu např. tkáně mezi geneticky odlišnými jedinci, ale stejného živočišného druhu. Xenotransplantace obecně označuje transplantaci do jiného druhu - konkrétně zvířecích orgánů, tkání či buněk do lidských pacientů. K této nové metodě se přistoupilo proto, aby byl překonán nedostatek

lidských orgánů dostupných pro transplantace. Možností je zde i využití kmenových buněk. Jedná se o velice zvláštní buňky navazující na embryonální vývoj. V dospělosti slouží jako druh opravného systému a mají potenciál vyvinout se v mnoho různých typů buněk v těle. Teoreticky se mohou buď nekonečně dělit a obnovovat samy sebe, nebo se dělit a diferencovat se ve specializované buňky (např. svalové buňky). Kmenové buňky mají schopnost vytvářet různé typy tkání a orgánů a vyskytují se ve všech dospělých jedincích i v embryích.^{19, 58}

10. 4. Ošetřování infikovaných ran

Ošetřování infikovaných ran vyžaduje především kultivační vyšetření z rány, které umožňuje cílenou antibiotickou léčbu. Kromě antibiotické terapie je vhodný materiál, který nezadržuje infikovaný sekret v ráně. V první fázi jsou proto vhodné výplachy nebo obklady s dezinfekčními roztoky (např.: Betadine[®], Dermacyn[®], chlorhexidin). Po regresi známek zánětu, ale s přetrvávající sekrecí přikládáme krytí s aktivním uhlím. Na rány bez sekrece volíme další antiseptická krytí (např. s obsahem jódu). Za nevhodný materiál při lokální terapii infekční rány považujeme polyuretany, hydrokoloidy nebo algináty.

Komplikovanější průběh mají rány infikované bakteriemi rezistentními na perorální antibiotika, například *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo *Pseudomonas aureginosa*. Rány s touto infekcí lze léčit lokálně. Na MRSA infekci jsou účinné materiály obsahující stříbro v kombinaci s dezinfekčními roztoky. Pseudomonádová infekce dobře reaguje na radikály kyslíku, proto lze ránu čistit peroxidem vodíku (3%) a přikládat antiseptická krytí v kombinaci s Dermacynem[®].

V případě infekce rány anaerobními druhy mikroorganismů se využívá především odstranění neživé tkáně z rány a zajištění adekvátní drenáže. Tím dojde k narušení prostředí, vhodného pro přežívání daných skupin patogenů. Při likvidaci gram-negativních mikroorganismů v ráně je nutné použít metody, které nejenom zničí živé bakterie, ale i odstraní z nich uvolněné endotoxiny.^{48, 55}

11. Experimentální část

Pokus byl povolen etickou komisí a se zvířaty bylo nakládáno v souladu s § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Vlastní operační zákrok, odběry, makroskopické a mikrobiologické hodnocení provedli MUDr. Michal Plodr, Ph.D. a MUDr. Petr Lochman, Ph.D. v chovném zařízení Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Já jsem provedla mikroskopické histologické hodnocení odebraných vzorků tkáně.

11. 1. Modely hojení ran

Lékařská literatura popisuje spoustu in vitro a in vivo modelů hojení ran. Mnohé jsou navrženy pouze pro určitou fázi hojení, kterou chceme právě studovat, s jinými lze pracovat při studiu celého průběhu tohoto procesu. Každý model je však hodnocen podle míry své schopnosti předpovědět, jak bude na danou terapii reagovat lidská rána. Studie s lidskými dobrovolníky jsou samozřejmě nejlepším způsobem, jak toto zjistit, ale jsou s nimi spjaté mnohé problémy. Je těžké zajistit dostatečný počet dobrovolníků se stejnými, či podobnými ranami pro randomizaci studie. Objektivní hodnocení hojení ran u lidí je omezeno pouze na histologické stanovení, které vyžaduje provádění četných biopsií během procesu hojení a nelze opominout ani etické aspekty, které nám velí vyvarovat se skupin dobrovolníků léčených pouze kontrolní látkou, nebo vůbec. Z těchto a dalších důvodů se v praxi pracuje převážně se zvířecími modely i pro predikci účinnosti potenciálního způsobu terapie u člověka.

Výběr zvířecího modelu pak závisí na mnoha faktorech, zahrnujících převážně dostupnost, cenu, snadnost manipulace a anatomicko-funkční podobnost člověku. Často se pracuje s malými savci, jako jsou například králíci, morčata, krysy a myši. Mezi jejich výhody patří nízká cena a lehká manipulace. Nevýhody při jejich použití jako modelů pro hodnocení potenciální účinnosti hojení ran u lidí zde však převažují. Jedná se především o velkou odlišnost v mnoha anatomických a fyziologických aspektech. Tito savci mají například husté osrstění, tenkou epidermis a dermis a hlavně se u nich kožní poranění hojí převážně kontrakcí rány a význam reepitelizace je zde nízký.

Mnohem podobnější lidské kůži, a to i co se týká procesu jejího hojení, je kůže prasete domácího, *Sus scrofa*. Prase poskytuje nejvhodnější model pro všechny typy dermatologických i chirurgických studií zabývajících se kožními poraněními. Prasečí i lidská kožní poranění se hojí fyziologicky podobnými procesy. Hlavním rozdílem oproti hojení u malých zvířat je uzavření části rány pomocí reepitelizace, nikoli kontrakcí. A konečně vůbec celá fyziologie prasete je velmi blízká té lidské. Základní orgánové systémy se podobají z hlediska struktury i funkce. U lidí i prasat dochází k obdobné fyzické a molekulární odpovědi na různé růstové faktory. Podrobněji bude podobnost lidské a prasečí kůže popsána v diskuzi.

Prasečí model má ale i své nevýhody. Jedná se především o vyšší náklady, než při použití menších savců, rychlý růst, obtížnou manipulaci a nutnost dodržování standardních procesů vzhledem k tomu, že rány na různých částech těla se liší mírou kontrakce.^{1, 2, 3}

11. 1. 1. Použitý zvířecí model

Pro experiment byla použita hospodářská zvířata, prasata domácí ve váhové kategorii 40-50 kg. Byla dodána ze zemědělského závodu Jásenná. Celkem bylo použito 12 zvířat. Každé zvíře bylo individuálně označeno ušní známkou. Prasata byla umístěna jednotlivě v samostatných ustájecích boxech ve viváriu Fakulty vojenského zdravotnictví UO v Hradci Králové.

Taxonomické zařazení pokusných zvířat:

Říše: živočichové (*Animalia*)

Kmen: strunatci (*Chordata*)

Třída: savci (*Mammalia*)

Řád: sudokopytníci (*Artiodactyla*)

Čeleď: prasatovití (*Suidae*)

Rod: prase (*Sus*)

Druh: prase domácí (*Sus scrofa domesticus* Linnaeus, 1758)⁵⁹

11. 2. Metodika práce

11. 2. 1. Operace

Ve vlastním experimentu byla pokusná zvířata premedikována směsí ketaminu (NARKAMON, Zentiva, Česká republika) v dávce 2 ml/5 kg, azaperonu (STRESNIL, Janssen, Belgie) v dávce 0,5 ml/10 kg a atropinu (ATROPIN, Biotika, Slovensko) v dávce 0,5 ml intramuskulárně. Byla provedena kanylace ušní žíly. Operační pole bylo připraveno oholením štětín, omytím mýdlovým roztokem, desinfekcí jódovým roztokem a zarouškováním.

Bylo vytvořeno 8 paravertebrálních hlubokých kožních ran (trzně-zhmožděných) jdoucích na úroveň fascie. Vždy 4 na každé straně. Velikost ran byla 5x2x0,5 cm. Na spodinu ran bylo aplikováno 0,5 ml infekčního agens v denzitě 10^8 CFU/ml. 1 rána zůstala bez přítomnosti infekčního agens. Každé infekční agens- *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli* bylo testováno samostatně na různých jedincích. Pro testování jednoho infekčního agens byla vždy použita 4 zvířata.

Za 30-60 minut byl aplikován biodegradabilní nosič (vápenato-sodná sůl kyseliny 1,4 β -D-polyanhydroglukuronové ve formě nanovláknů se sorbční vrstvou, krytou polyuretanovou fólií) s navázaným léčivem (gentamycin v koncentraci 0,65 mg/cm²), nebo Garamycin Schwann[®]. Námi testovaný přípravek byl pracovně nazván Nanogenta a připravil ho Ing. Briestenský (Alltracell). Účinnost každého přípravku byla vždy testována zvlášť. Pro každé infekční agens byla tak pokaždé 2 prasata použita pro aplikaci Nanogenty a 2 pro aplikaci Garamycinu Schwann[®]. Nanogenta/Garamycin Schwann[®] nebyly vloženy vždy do jedné rány s infektem a do čisté rány. Z 8 ran tak 2 sloužily jako kontrolní- rána zcela čistá (fyziologická)

a rána pouze s infektem. Nosič v ráně byl fixován několika stehy, rány překryty obvazem a celá vertebrální krajina zvířete rouškou, která byla uchycena několika stehy.

Po 24 a 48 hodinách byla zvířata opět uvedena do krátkodobé celkové anestezie a byly odebrány vzorky ke kulturnímu vyšetření a odebrána krev na hladinu gentamycinu. Rány byly makroskopicky zhodnoceny a byla pořízena fotodokumentace. To bylo provedeno i den 7. (po 168 hodinách) , kdy byly navíc odebrány vzorky tkáně z okrajů ran pro histopatologické vyšetření. Poté byl experiment ukončen a zvířata utracena.

11. 2. 2. Zpracování vzorků

11. 2. 2. 1. Fixace

Zpracování vzorků tkáně z okrajů ran bylo provedeno na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové. Odebrané vzorky tkáně byly fixovány. Cílem fixace je zabránit samovolnému rozkladu tkáně působením enzymů. Fixační prostředky způsobí denaturaci bílkovin protoplazmy buněk a tkání. Fixace musí být šetrná, aby zůstaly zachovány struktury tkáně jako za živa, musí zachovávat barvitelnost tkáně a musí do ní rychle pronikat. Odebraná tkáň musí být fixována co nejrychleji a po dobu minimálně 24 hodin. Fixace byla provedena Bouinovou fixační tekutinou a 4% paraformaldehydem.

Bouinova fixační tekutina se skládá z 300 ml nasyceného roztoku kyseliny pikrové a 100 ml neutrálního formolu. Před použitím této směsi bylo na každých 100 ml roztoku přidáno 3-5 ml ledové kyseliny octové.

4% roztok paraformaldehydu byl připraven ze 4 g této sloučeniny a 100 ml pufru, který obsahoval 0,4 g KCl, 16,0 g NaCl, 0,4 g KHPO₄ a 5,8 g Na₂HPO₄.12 H₂O.

11. 2. 2. 2. Odvodnění a projasnění

K odvodnění vzorků byla použita vzestupná alkoholová řada. Samotný proces trvá 6-24 hodin. Poté bylo provedeno projasnění (odstranění etanolu ze tkáně) xylenem. Délka trvání tohoto procesu je 1-6 hodin. Všechny tyto činnosti byly provedeny dle standardních postupů Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

odvodnění-projasnění:

80 96 96 96 A A-X X-A X

(X=xylen, A=aceton, V=voda, 96-70=etanol [%])

11. 2. 2. 3. Prosycení a zalití do parafínu

Zalití do parafínu předcházelo prosycení vzorků. Při prosycování nesmí teplota parafínu překročit teplotu 58 °C. Byl použit zkvalitněný přefiltrovaný parafín. Ten se získá přidáním 3-5 g včelího vosku na 100 g přetaveného parafínu. Fixovaná tkáň byla vložena do kovové

komůrky, zalita parafinem a na její horní část byla přiložena plastová destička. Po ztuhnutí byl bloček oříznut tak, aby okolní vrstva parafínu nepřesahovala 3-5 mm. Bločky byly poté uchovávány v lednici.

11. 2. 2. 4. Krájení a lepení na podložní sklíčka

Z parafinových bločků byly na sáňkových mikrotonech (Reichert, Leitz-Wetzlar) krájeny tenké řezy tkáně (cca 7 μm). Ukrojený řez musí být vždy opatrně přenesen na podložní sklíčko, na které byla předtím rozetřena malá kapka glycerín bílku a kápnuta větší kapka destilované vody. Řez byl poté roztažen na ploténce a přebytečná voda slita.

11. 2. 2. 5. Odparafínování a barvení

Jelikož byly k barvení řezů používány vodné roztoky barviv, bylo nutné nejprve řezy zbavit parafínu odparafínováním. K tomu bylo použito několik lázní xylenu. Protože se ani xylen ve vodě nerozpouští, musely být po rozpuštění parafínu přeneseny preparáty sestupnou řadou etanolů (96, 80, 70%) do vody. V každé lázni byly preparáty ponořeny 5 minut.

odparafínování-odvodnění:

X X X A 96 96 96 80 70 V

(X=xylen, A=aceton, V=voda, 96-70=etanol [%])

Řezy byly barveny zeleným trichromem (ZT) a hematoxylinem-eozinem (H-E) podle standardních laboratorních postupů Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Výsledkem barvení zeleným trichromem jsou jádra buněk obarvená modře až hnědočerně, svalstvo červeně, erytrocyty oranžově a kolagenní vazivo zeleně. Po nabarvení hematoxylinem-eozinem jsou jádra buněk a chrupavka zbarveny modře, kolagenní vazivo růžově a svalstvo červeně.

11. 2. 2. 6. Zamontování

Obarvené řezy byly uzavřeny mezi podložní a krycí sklíčko do uzavíracího média. Médium musí být látka dokonale průhledná, s vysokým indexem lomu a nesmí poškozovat zbarvení tkáně. Byl použit Kanadský balzám. Tato látka se nemísí s vodou, proto do ní nemohly být obarvené řezy uzavírány přímo, ale až po odvodnění vzestupnou řadou etanolů a prosycení xylenem (postup viz. výše).

11. 3. Aplikovaný materiál

11. 3. 1. M-DOC®

11. 3. 1. 1. Charakteristika M-DOC®

Mikrodisperzní oxidovaná celulóza (M-DOC®), označovaná někdy také jen jako jako oxidovaná celulóza, patří mezi deriváty celulózy. Chemicky se jedná o vápenato-sodnou sůl kyseliny 1,4 β-D-polyanhydroglukuronové (PAGA). V molekule obsahuje 3-15% vody. Molekulová hmotnost sloučeniny je 50-200 kD. Objem po stlačení se pohybuje od 0,5 do 30 ml na gram a měrný povrch od 0,3 do 200 m² na gram. Stabilní mikrodisperzní PAGA a její soli mohou obsahovat v polymerním řetězci 8-30% karboxylových skupin, z toho nejméně 80% těch uronového typu a nejvýše 5% skupin karbonylových.

Glukuronoglukany se připravují především metodami relativně specifické oxidace primárních alkoholických skupin na uhlíku číslo 6 glukopyranosových jednotek přírodních polysacharidů. Nejčastěji se k jejich přípravě využívají nativní, nebo regenerovaná celulóza a škrob. Jako oxidační činidla jsou používány především oxidy dusíku. Mikrodisperzní produkty vznikají podrobením materiálu obsahujícího PAGA částečné nebo kompletní hydrolyze a neutralizaci v oxidačním prostředí. Hydrolyzát pak podstoupí částečnou koagulaci za vzniku stabilního mikrodisperzního produktu. M-DOC® musí být během skladování chráněna před přímým světlem a vhodné je uchovávat ji při teplotách nepřekračujících 25°C (ideálně pod 10 °C). Při nedodržení těchto podmínek dojde snadno k její degradaci a snížení tkáňové tolerance během použití materiálu.

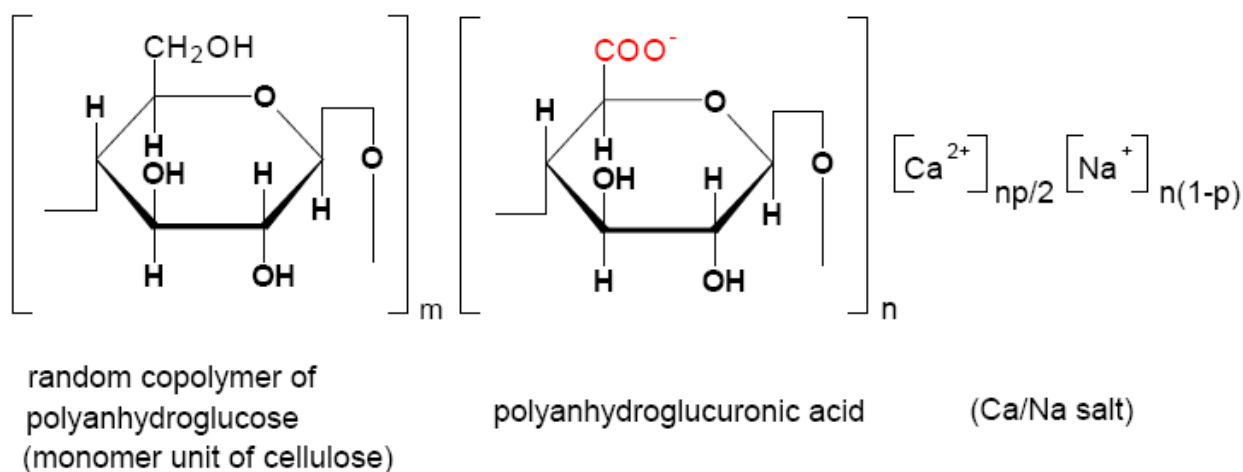
11. 3. 1. 2. Využití M-DOC®

Produkty PAGA se v současnosti využívají v medicíně, farmacii i kosmetice. M-DOC® se uplatňuje v přípravcích na zastavení krvácení po běžných poraněních i při chirurgických výkonech. Má zde význam především v ochraně rány před infekcí a zabránění vzniku pooperačních adhezí. Důležitými vlastnostmi pro toto použití jsou: její přírodní charakter, biokompatibilita, nulová toxicita a potenciál alergizovat, schopnost resorpce a možnost zastavení krvácení nejen na povrchu těla, ale i např. v parenchymatózních orgánech. Produkty s M-DOC® je známa především britská firma Alltracell, která přípravky pro zastavení krvácení vyrábí např. i ve formě spreje, nosních tamponů, pudru, či náplastí.

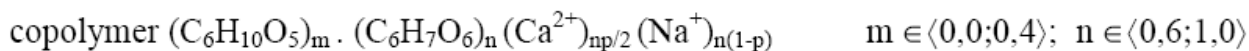
Alltracell se zabývá také využitím derivátů celulózy v ochraně kardiovaskulárního zdraví. Právě ve spolupráci s touto firmou byla provedena na Farmaceutické fakultě v Hradci králové preklinická studie s velmi pozitivními výsledky. Ukázalo se, že M-DOC® podávaná myším v dietě, má schopnost snižovat hladinu celkového cholesterolu v séru, a to aniž by zasáhla množství prospěšného HDL cholesterolu. Jejím vlivem dochází v tlustém střevě ve vyšší míře k fermentaci a tvorbě mastných kyselin s krátkým řetězcem, což přispívá k vytvoření příznivého prostředí v tomto orgánu. Mimo to také po její aplikaci dochází ke snížení koncentrace glukózy v séru a zvýšenému vylučování žlučových kyselin. Pozitivní vliv M-DOC® na hladiny cholesterolu a glukózy v séru byl již prokázán i ve studiích klinických,

z nichž jedna byla provedena ve Fakultní nemocnici v Hradci králové. Při studiích na lidech nebyly zatím prokázány žádné vedlejší účinky M-DOC[®].

Deriváty mikrod disperzní-oxidované celulózy mají také prokazatelné imunomodulační účinky. Bylo zjištěno především zvýšení produkce TNF- α *in vitro* a spontánní proliferace myších splenocytů a lidských leukocytů v periferní krvi *in vitro*. Dále také zvýšení hematopoezi v kostní dřeni *in vivo*. Tyto výsledky ukazují na budoucí možnosti využití M-DOC[®] jako adjuvantní terapie např. při maligních, imunodeficientních (např. AIDS) a virových onemocněních.^{27, 28, 29, 30, 31, 32}



Obrázek 10: Strukturální vzorec M-DOC[®]²⁹



Obrázek 11: Sumární vzorec M-DOC[®]²⁹

11. 3. 2. Gentamicin

V experimentu byl na vápenato-sodnou sůl kyseliny polyanhydroglukuronové navázán antimikrobně účinný gentamicin. Byl zjišťován vliv tohoto materiálu na hojení ran, které byly sekundárně infikovány. Pro srovnání byl použit i hromadně vyráběný léčivý přípravek Garamycin Schwann[®]. Lékovou formou je houba - sterilní hmota tvořená kolagenem a napuštěná gentamicinsulfátem.

Gentamicin je aminoglykosid se širokým spektrem účinku proti většině gram-negativních bakterií, včetně pseudomonád, proteů a stafylokoků. Neúčinkuje na enterokoky, mykobakterie a anaerobní bakterie. Je produkován mikroorganismem *Micromonospora purpurea* ze skupiny gram-pozitivních bakterií. Účinek gentamicinu je baktericidní na klidovou i proliferační fázi bakterie. Látka inhibuje syntézu proteinů bakterií vazbou na 30S podjednotku ribozomů. Postantibiotický účinek dovoluje prodloužit dávkovací interval bez ztráty účinnosti proti většině gram-negativních bakterií. Rezistence může být následkem selhání průniku látky do

bakteriální buňky, nízké afinity bakteriálních ribozomů, nebo inaktivace gentamicinu mikrobiálními enzymy.

Užívá se intravenózně, intramuskulárně či topicky. Při perorální aplikaci se nevstřebává v rozsahu dostatečném pro systémový účinek. Gentamicin je jedním z mála teplotně stabilních antibiotik, odolává i podmínkám při autoklávování. Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky patří ototoxicita a nefrotoxicita.^{35, 36, 37}

11. 3. 3. Hyiodine®

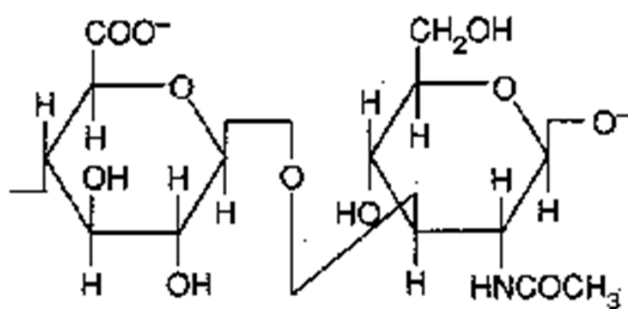
11. 3. 3. 1. Charakteristika Hyiodine®

V přípravku Hyiodine® firmy Contipro je obsažen komplex hyaluronátu sodného, jodidu draselného a jódu. Komplex jódu a jodidu draselného zabraňuje rozkladu kyseliny hyaluronové a zároveň působí jako dezinfekční prostředek, který bezpečným způsobem dekontaminuje ránu. Hyaluronát sodný, chemicky poly(β -D-glukuronát-[1-3]-acetyl-D-glukosamin-[1-4])sodný, je lineární, negativně nabitý polysacharid, který je přirozenou součástí organismu, a tudíž není vůči němu toxický, ani nezpůsobuje alergické a jiné nežádoucí reakce. V současnosti nejsou známy kontraindikace pro lokální použití hyaluronátu sodného. Jód, obsažený v prostředku, může u přecitlivělých jedinců vyvolat alergickou reakci. Hyiodine® má vynikající regenerativní a antiadhezivní účinky a zlepšuje podmínky pro granulaci a epitelizaci rány. Významně zkracuje dobu terapie a zlepšuje kvalitu životapacientů s kožními defekty.

11. 3. 3. 2. Využití Hyiodine®

Přípravky s kyselinou hyaluronovou nahrazují její přirozený deficit v ráně. Kyselina hyaluronová je důležitou komponentou kůže, zejména extracelulární matrix. Sehrává významnou roli při regeneraci tkání, aktivuje buňky, které se zúčastňují procesu regenerace, a ránu přirozeným způsobem hydratuje a současně zajišťuje odvod exudátu. Využívá se i její vysoká afinita k vodě. Kyselina hyaluronová navíc významným způsobem eliminuje tvorbu jizev. Díky jedinečným hydratačním a elastickým vlastnostem nachází řadu uplatnění v oční chirurgii, při léčbě kloubů a některých druhů rakoviny i v kosmetice. Jeví se i jako ideální nosič léčiv. Během procesu stárnutí kůže dochází ke snížené schopnosti hojení, což souvisí se sníženou koncentrací kyseliny hyaluronové v kůži.

Hyiodine® je vhodný pro léčbu všech typů ran. Aplikuje se dvojitým způsobem. U malých defektů se aplikuje přímo na ránu (nejlépe pomocí sterilní stříkačky) a rána se poté překryje sterilní gázou. Pokud jde o léčbu větších defektů (více než 3 cm²), gáza se preparátem Hyiodine® maximálně nasytí a dostatečně prosycená se přiloží na ránu tak, aby ji pokryla v celém rozsahu. Na takto ošetřenou ránu jsou pak nanášeny další vrstvy sterilní gázy, které absorbují případný sekret. Převas je vhodné provádět po jednom, maximálně dvou dnech, v závislosti na sekreci a charakteru rány. Čím vyšší je sekrece, tím déle je možné gázu nasycenou Hyiodine® na ráně ponechat. Vrchní vrstvy gázy (krytí) je však nutné vyměňovat vždy při jejich úplném promočení tkáňovým sekretem.^{21, 33, 34}



D-glukuronová k. + GlcNAc

Obrázek 12: Strukturální vzorec kyseliny hyaluronové⁴⁸

12. Výsledky

12. 1. Mikrobiologické hodnocení

Pro mikrobiologické hodnocení byla provedena kultivace vzorků ze spodiny ran. (primokultivace a pomnožení). Zjišťoval se počet ran negativních na přítomnost mikroorganismů ku celkovému počtu ran. Pro každé infekční agens a typ rány (čistá, jen s infektem, s infektem a aplikací Nanogenty, s infektem a aplikací Garamycinu Schwann®) byly tyto počty stanoveny zvlášť a hodnoty byly zaneseny do tabulek. Výsledky primokultivace u ran infikovaných a léčených Nanogentou a Garamycinem Schwann® byly poté zpracovány do grafu.

12. 1. 1. Tabulky k mikrobiologickému hodnocení

KULTIVACE – PRIMOKULTIVACE (rány negativní/celkový počet ran)

INF. – K. = kontrolní rána jen s infektem

ČIS. – K. = kontrolní rána čistá

INF. – LÉČBA = infikovaná rána léčená

Pseudomonas aeruginosa

	NANOGENTA				GARAMYCIN		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
INF. – K.	0/2	0/2	0/2		1/2	2/2	2/2
ČIS. – K.	1/2	1/2	0/2		2/2	2/2	2/2
INF. - LÉČBA	8/12	3/12	0/12		12/12	12/12	8/12

Tabulka 1

Staphylococcus aureus

	NANOGENTA				GARAMYCIN		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
INF. – K.	0/2	0/2	0/2		2/2	0/2	0/2
ČIS. – K.	0/2	0/2	0/2		2/2	1/2	0/2
INF. - LÉČBA	10/12	6/12	0/12		12/12	0/12	1/12

Tabulka 2

Escherichia coli

	NANOGENTA				GARAMYCIN		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
INF. – K.	2/2	2/2	1/2		2/2	2/2	2/2
ČIS. – K.	1/2	2/2	2/2		2/2	2/2	2/2
INF. - LÉČBA	6/12	10/12	12/12		12/12	12/12	12/12

Tabulka 3

KULTIVACE – POMNOŽENÍ
(rány negativní/celkový počet ran)

Pseudomonas aeruginosa

	NANOGENTA				GARAMYCIN		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
INF. – K.	0/2	0/2	0/2		1/2	1/2	1/2
ČIS. – K.	1/2	0/2	0/2		2/2	2/2	2/2
INF. - LÉČBA	4/12	0/12	0/12		12/12	12/12	8/12

Tabulka 4

Staphylococcus aureus

	NANOGENTA				GARAMYCIN		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
INF. – K.	0/2	0/2	0/2		1/2	0/2	0/2
ČIS. – K.	0/2	0/2	0/2		2/2	0/2	0/2
INF. - LÉČBA	10/12	6/12	0/12		12/12	0/12	1/12

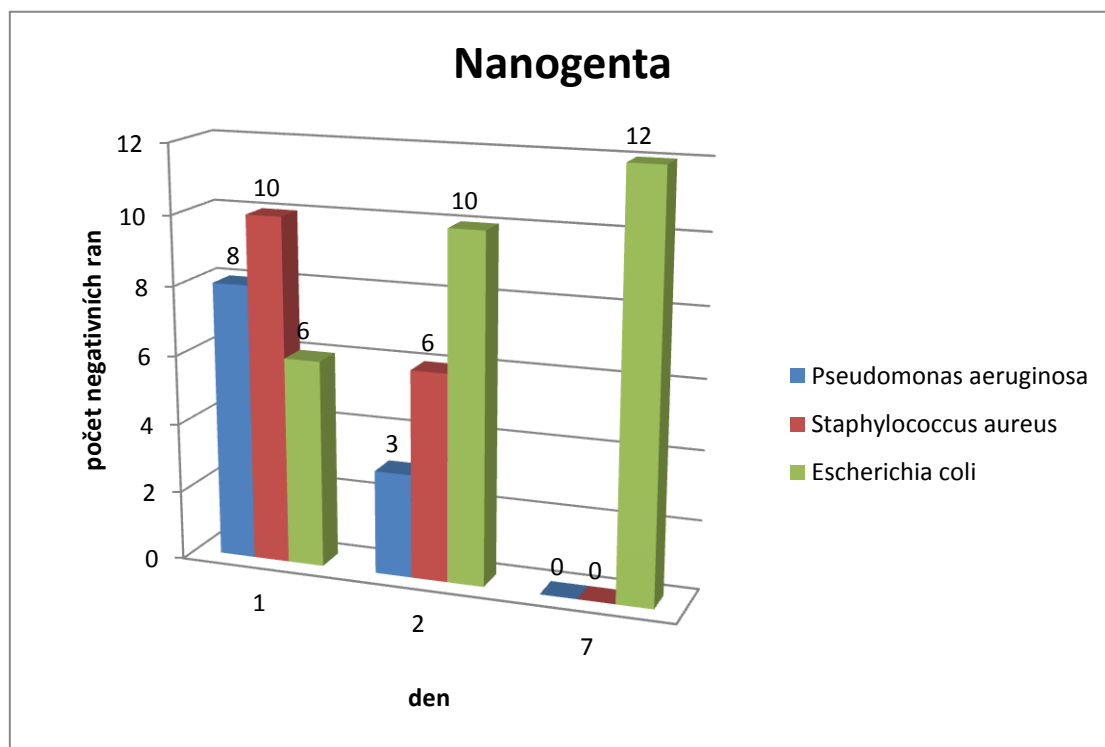
Tabulka 5

Escherichia coli

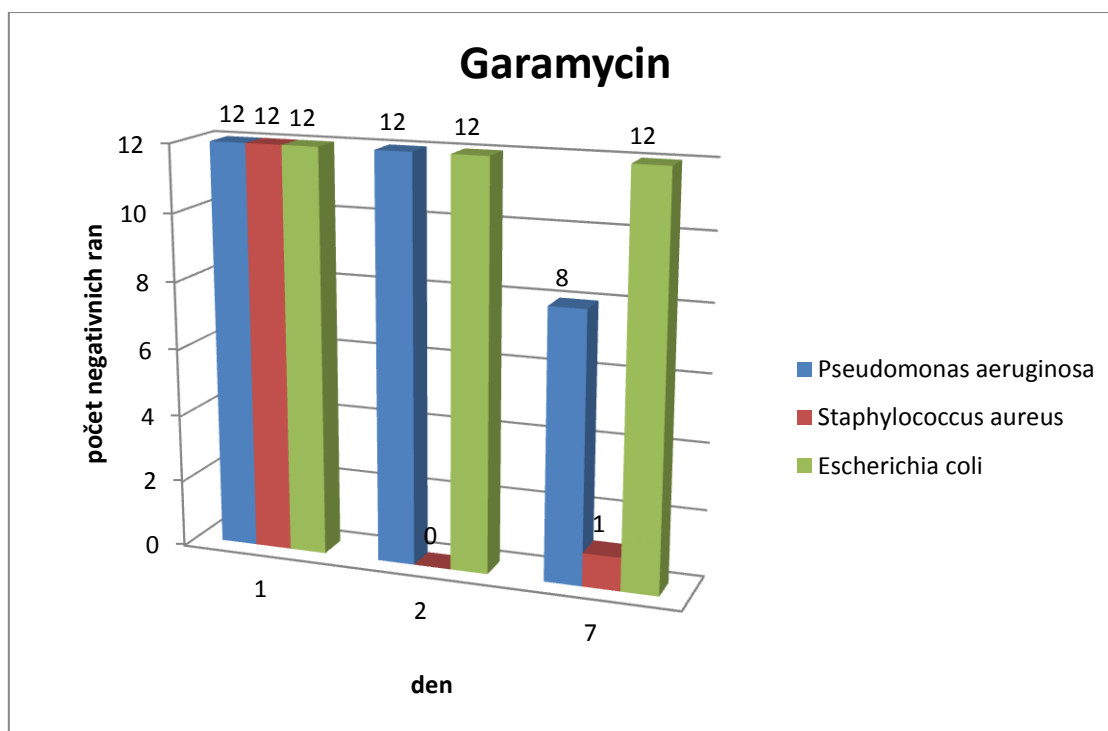
	NANOGENTA				GARAMYCIN		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
INF. – K.	2/2	1/2	1/2		1/2	2/2	2/2
ČIS. – K.	1/2	2/2	2/2		2/2	2/2	2/2
INF. - LÉČBA	1/12	4/12	8/12		12/12	12/12	12/12

Tabulka 6

12. 1. 2. Grafy k mikrobiologickému hodnocení



Graf 1



Graf 2

12. 2. Makroskopické hodnocení

U makroskopického hodnocení byly sledovány: vzhled rány a jejího okolí, přítomnost krvácení, vzhled popř. zbarvení krusty, míra vstřebání preparátu, uzavírání rány, přítomnost exudátu a sekrece z rány. Byl zjišťován počet ran čistých s kompletně vstřebaným preparátem (v tabulce označeny I), ran čistých s patrným preparátem (II) a ran se známkami infekce (zánětlivý exudát, povlak na spodině rány) s patrným preparátem (III) ku celkovému počtu ran. Pro každé infekční agens a aplikovaný typ preparátu byly tyto počty stanoveny zvlášť. Do výsledků nejsou zahrnuty rány kontrolní bez přítomnosti zkoušených preparátů. Výsledky byly zaneseny do tabulek a zpracovány do grafu.

Makroskopické hodnocení ran bylo provedeno 1. den, 2. den a 7. den. Rány byly označeny L1-4 a P1-4 (vzestupně kranio-sakrálním směrem):

L1	rána jen s infektem
L2 – L4	rána s infektem a aplikací preparátu
P1 – P3	rána s infektem a aplikací preparátu
P4	čistá rána

12. 2. 1. Obrazová příloha k makroskopickému hodnocení



Fotografie 1: P4 – P1, 0. den, vytvořené rány



Fotografie 2: P3 – P1, 0. den, aplikace preparátu



Fotografie 3: L4 – L1, 1. den



Fotografie 4: P4 – P1, 2. den



Fotografie 1: P4 – P1, 7. den

12. 2. 2. Tabulky k makroskopickému hodnocení

MAKROSKOPICKÝ VZHLED (počet ran/celkový počet ran)

Pseudomonas aeruginosa + *Staphylococcus aureus* + *Escherichia coli*

	NANOGENTA				GARAMYCIN		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
I	13/36	18/36	29/36		0/36	0/36	5/36
II	12/36	15/36	5/36		7/36	17/36	0/36
III	11/36	3/36	2/36		29/36	19/36	31/36

Tabulka 7

Pseudomonas aeruginosa

	NANOGENTA				GARAMYCIN		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
I	12/12	7/12	9/12		0/12	0/12	2/12
II	0/12	4/12	2/12		5/12	8/12	0/12
III	0/12	1/12	1/12		7/12	4/12	10/12

Tabulka 8

Staphylococcus aureus

	NANOGENTA				GARAMYCIN		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
I	1/12	10/12	11/12		0/12	0/12	3/12
II	4/12	2/12	0/12		2/12	9/12	0/12
III	7/12	0/12	1/12		10/12	3/12	9/12

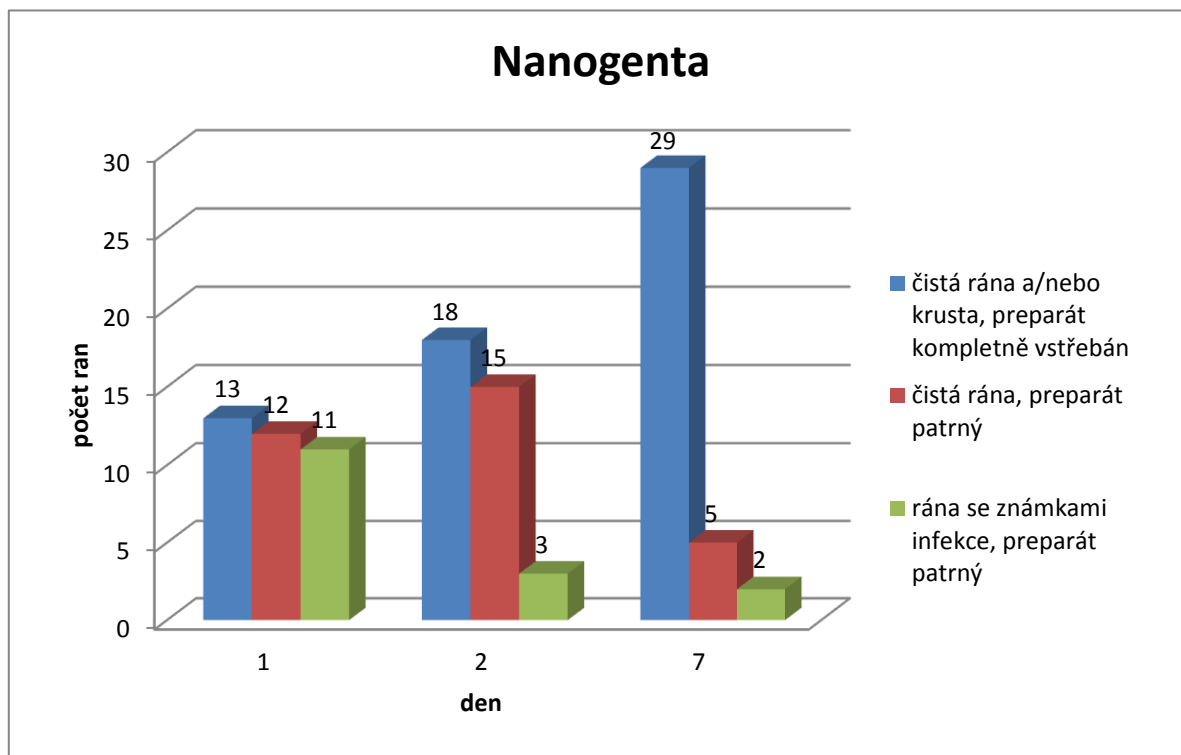
Tabulka 9

Escherichia coli

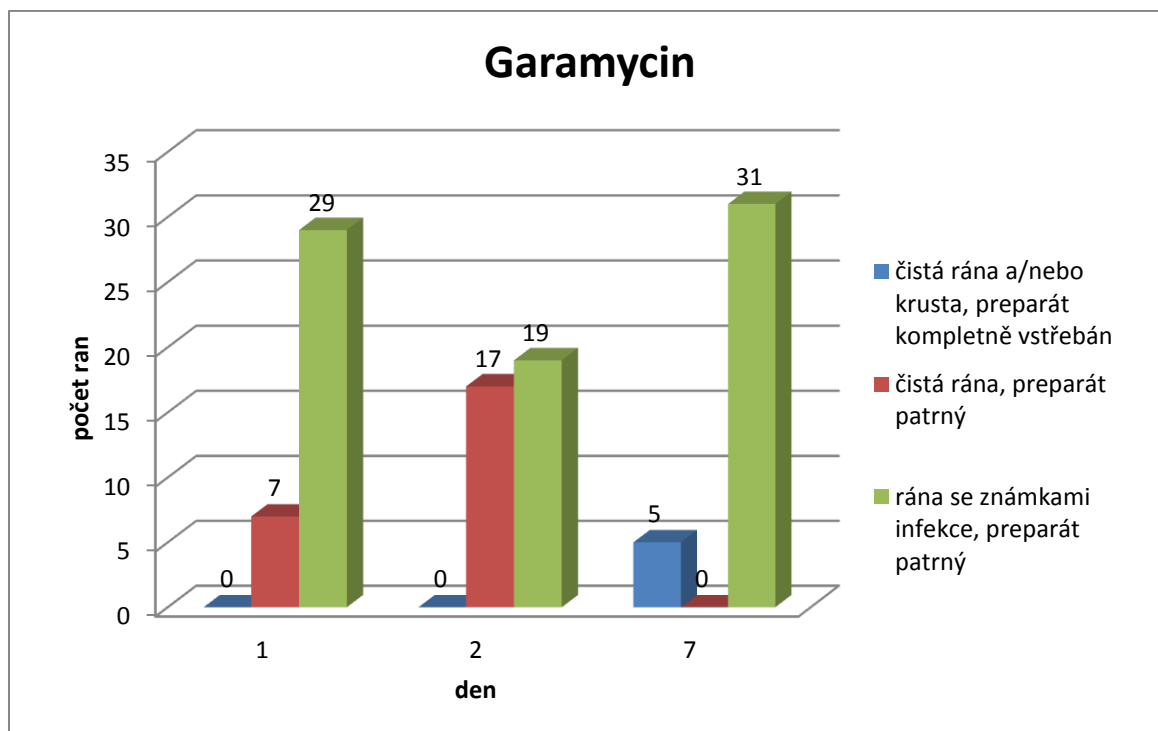
	NANOGENTA				GARAMYCIN		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
I	0/12	1/12	9/12		0/12	0/12	0/12
II	8/12	9/12	3/12		0/12	0/12	0/12
III	4/12	2/12	0/12		12/12	12/12	12/12

Tabulka 10

12. 2. 3. Grafy k makroskopickému hodnocení



Graf 3

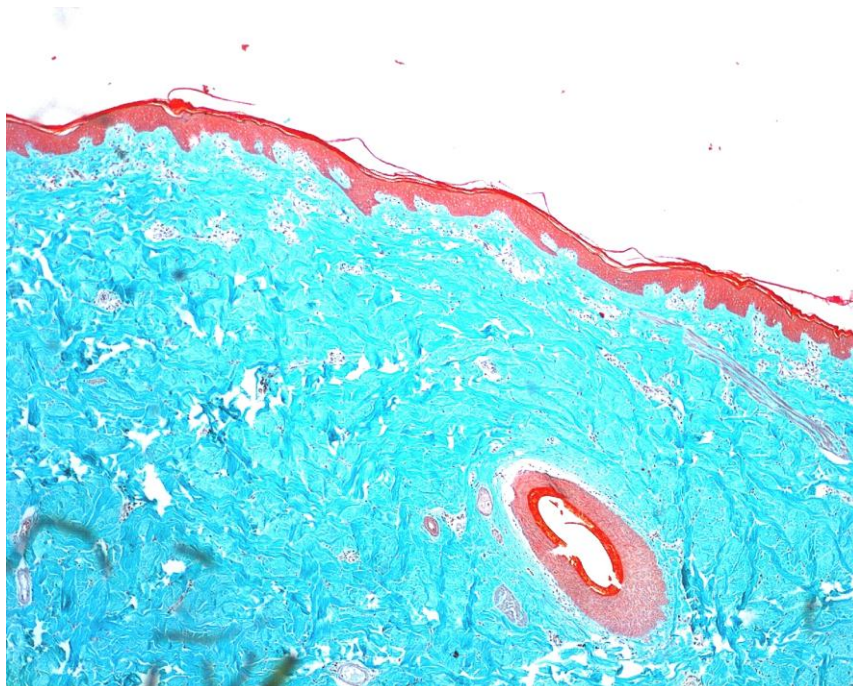


Graf 4

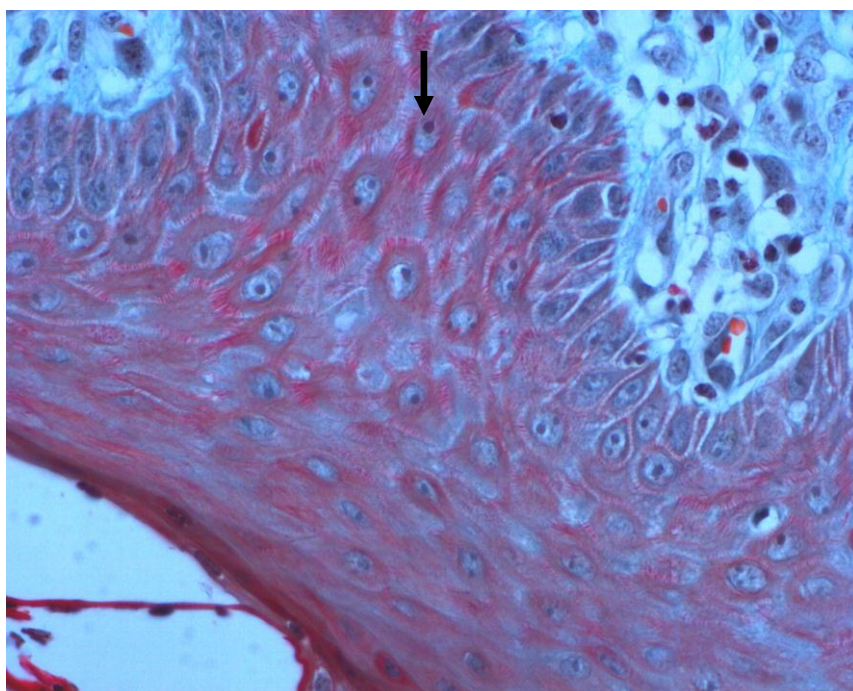
12. 3. Mikroskopické hodnocení

Vzorky pro mikroskopické histologické hodnocení byly odebrány 7. den po začátku pokusu. Odběr byl proveden z okrajů ran. Při mikroskopickém hodnocení vzorků tkáně jsem se zaměřila na sledování kvality granulační tkáně. Hodnotila jsem buněčnou kolonizaci (přítomnost fibroblastů, makrofágů, granulocytů), tvorbu EM a nových cév. Sledovala jsem i stupeň epitelizace, přítomnost krusty a zánětlivého exudátu. Reprezentativní preparáty tvoří obrazovou přílohu.

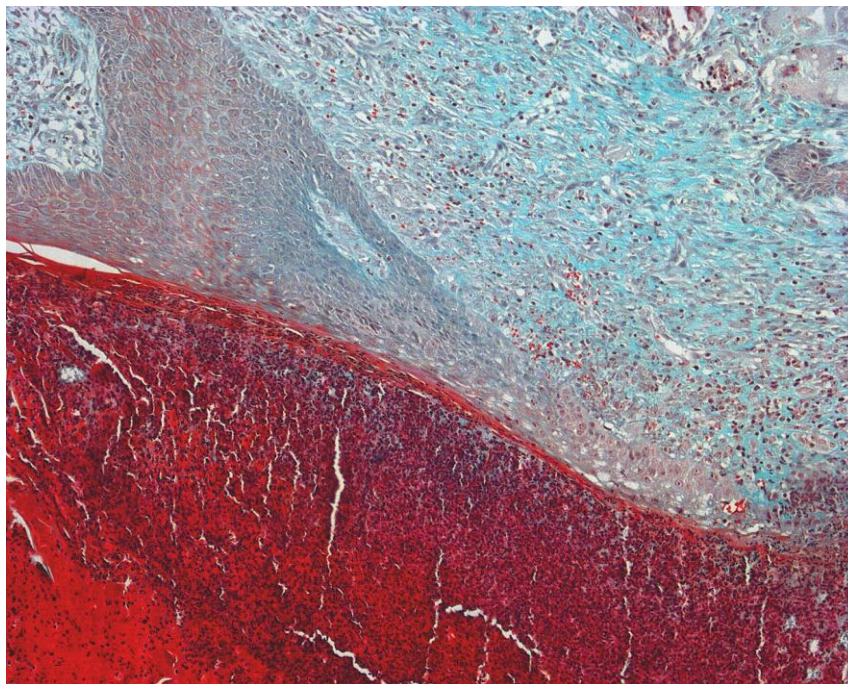
12. 3. 1. Obrazová příloha k mikroskopickému hodnocení



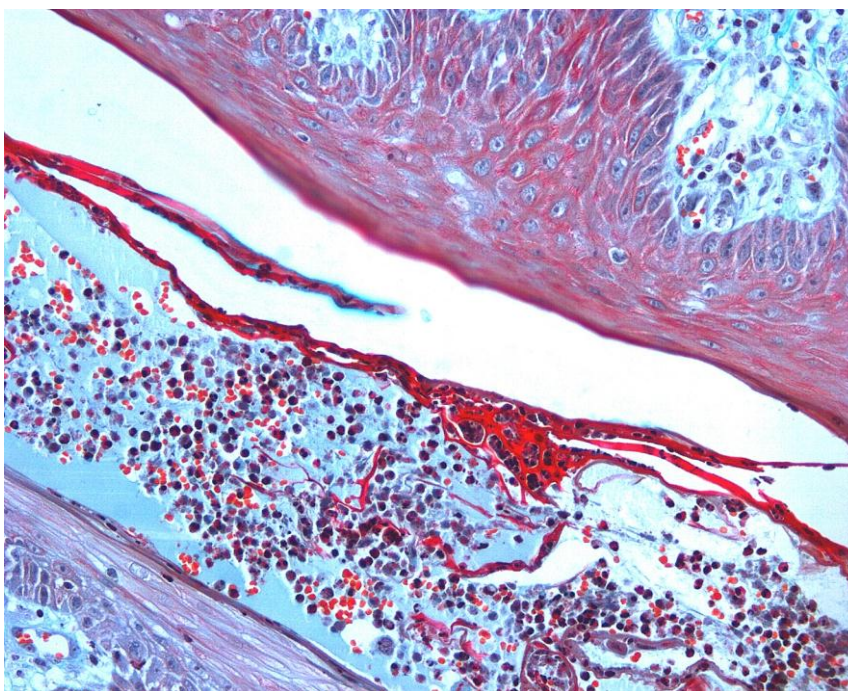
Fotografie 6: Intaktní, ale podrážděná kůže v okolí rány (*epidermis* a *dermis* s chlupovým folikulem a mírnou zánětlivou infiltrací); barvení ZT, 40x



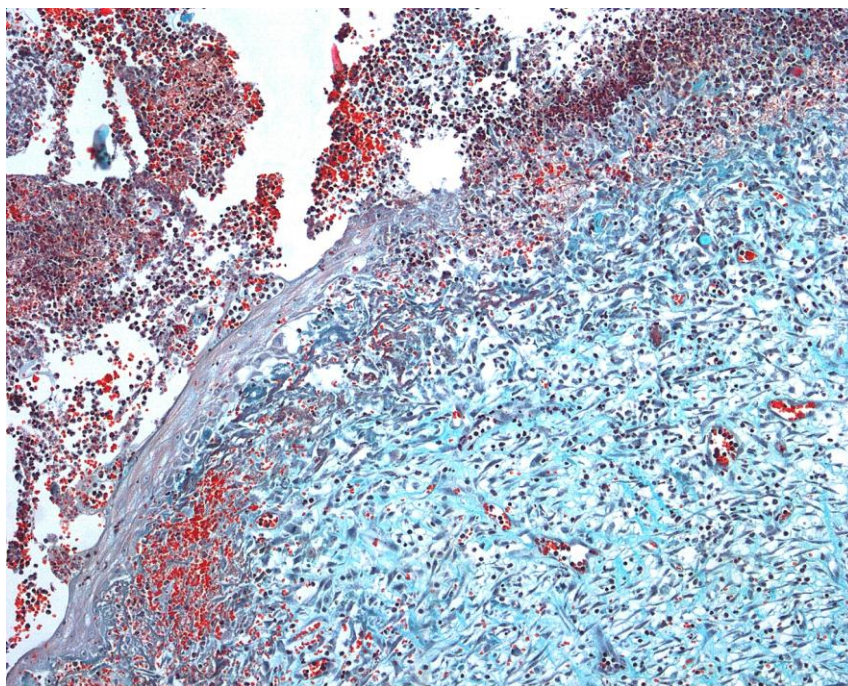
Fotografie 7: Detail intaktní *epidermis* v okolí rány s charakteristickou strukturou (zvláště patrné jsou buňky *stratum spinosum* s tonofibrilami), ve škáře mírná infiltrace leukocytů; barvení ZT, 400x



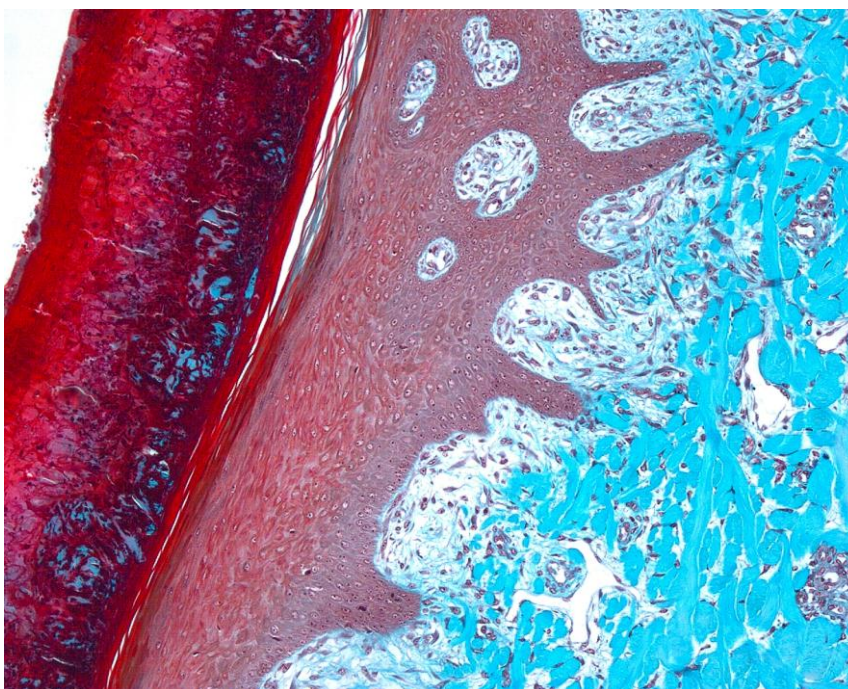
Fotografie 2: Čistá kontrolní rána bez infektu (dole krusta, nahoře epiteliální výběžek a granulační tkáň – obsahuje méně kulatobuněčného infiltrátu než rány infikované); barvení ZT, 100x



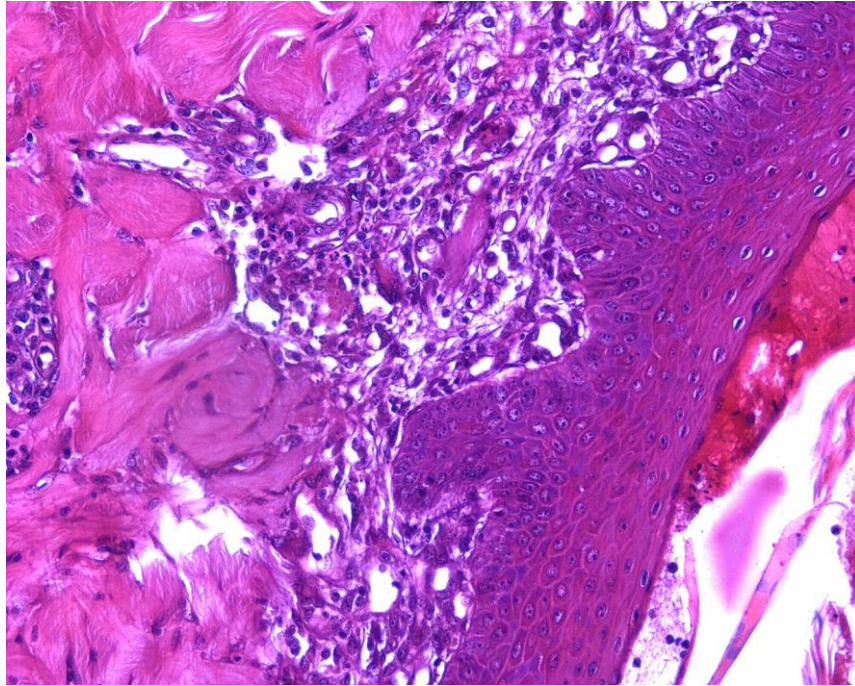
Fotografie 3: Rána s infektem a aplikací Nanogenty (vprostřed exudát bohatý na zánětlivý kulatobuněčný infiltrát, erythrocyty a fibrinová vlákna, dole ještě ne zcela diferencovaná *epidermis*, nahoře normální *epidermis*); barvení ZT, 200x



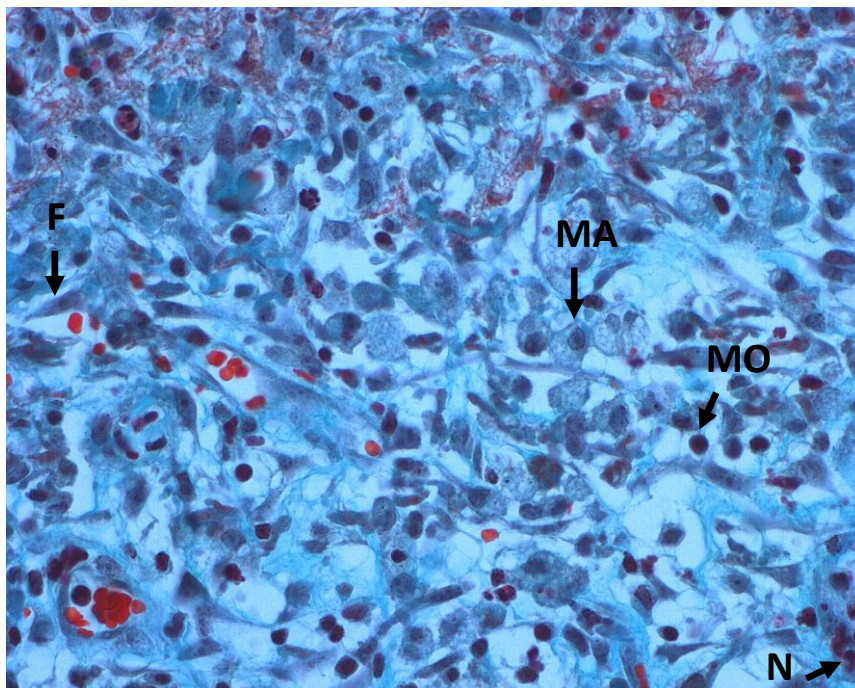
Fotografie 4: Rána s infektem a aplikací Nanogenty (okraj defektu - vlevo krusta, novotvořená *epidermis*, vpravo granulační tkáň); barvení ZT, 100x



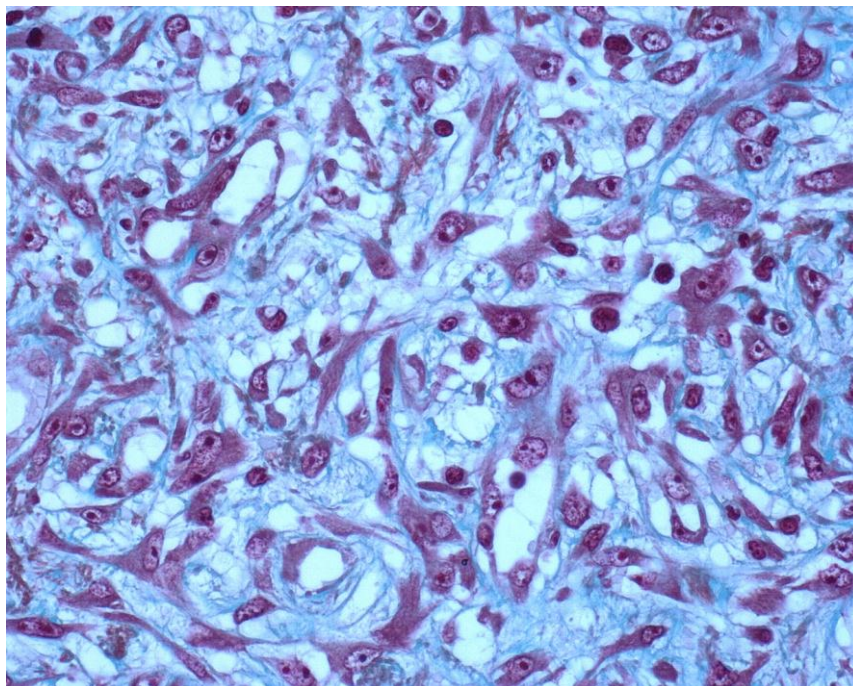
Fotografie 5: Rána s infektem a aplikací Hyiodine® (vlevo krusta, pod ní *epidermis* a granulační tkáň – dobře formovaná hlavně v hlubších vrstvách); barvení ZT, 100x



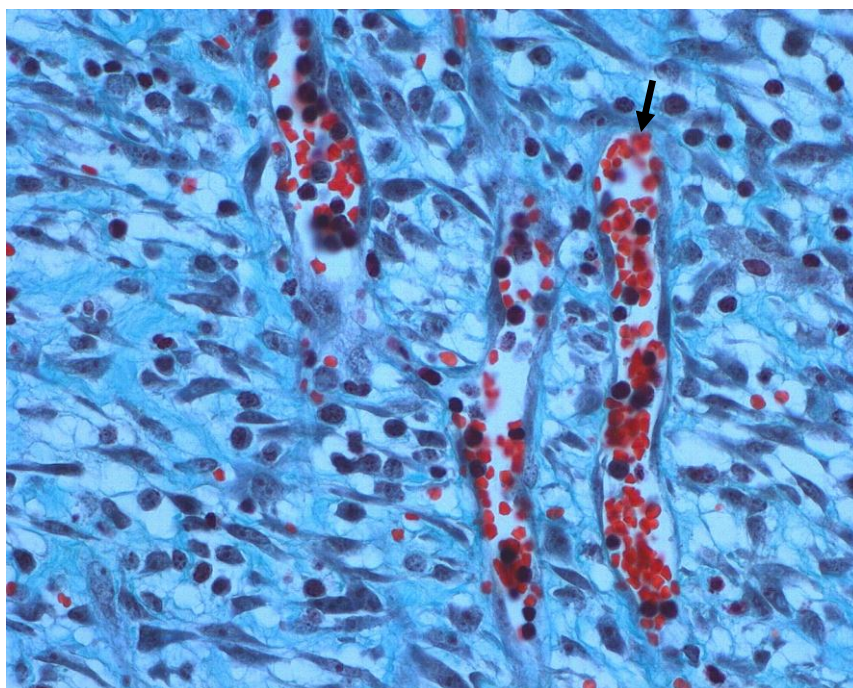
Fotografie 6: Rána s infektem a aplikací Hyiodine® (vpravo krusta, novotvořená *epidermis*, vlevo granulační tkáň s hutnými kolagenními vlákny); barvení H-E, 200x



Fotografie 7: Rána s infektem a aplikací Nanogenty (detail granulační tkáňe v kontaktu s krustou - fibroblasty, četné makrofágy, monocyty, neutrofil); barvení ZT, 400x



Fotografie 8: Rána s infektem a aplikací Hyiodine® (detail granulační tkáně); barvení H-E, 400x



Fotografie 9: Rána s infektem a aplikací Nanogenty (detail granulační tkáně s bohatou vaskulaturou a erytrocyty); barvení ZT, 400x

13. Diskuze

Pro zdůvodnění výběru prasete domácího jako vhodného experimentálního modelu zde popíšu prasečí kůži a porovnáám ji s kůží lidskou. Člověk i prase mají řídce ochlupený povrch těla a silnou *epidermis*. Tloušťka lidské *epidermis* se v závislosti na místě na těle pohybuje v rozmezí 50-120 μm (Meyer et al., 1978), u prasete dle autorů 30-100 μm (Morris a Hopewell, 1990), či 70-140 μm (Meyer et al., 1978). Lépe je však používat poměr tloušťky *dermis-epidermis*, který je v obou případech v rozmezí 10 : 1 až 13 : 1. Kůže je u lidí i prasat silnější na dorzální straně těla, než na straně ventrální.

Téměř stejná je doba obnovy epidermální vrstvy. U člověka 27-28 dní a u prasete 30 dní. Stejně tak se podobá kinetika epidermální proliferace. Přechod epidermálních buněk z bazální vrstvy do funkční horní vrstvy *epidermis* trvá u člověka 14 dní, u prasete dnů 13.

U prasete se *epidermis* skládá ze 4 vrstev: *stratum germinativum*, *stratum granulosum*, *stratum corneum* a *stratum spinosum*. *Stratum lucidum*, přítomná u lidí, chybí. V prasečí *epidermis* se obdobně jako v lidské nachází početné Langerhansovy buňky, které obsahují typická Birbekova granula, jejichž počet se zvyšujícím se věkem zvířete stoupá. V *epidermis* bílého kříženeho hospodářského prasete se nenachází melanocyty. Nalézají se zde pouze neurčitě bazální buňky, které by mohly být jejich prekurzory, či ekvivalenty. Prase je jediným zvířetem, u něhož byl popsán proces opálení podobně, jako u člověka. Typ keratinových proteinů a lipidové složení *stratum corneum* se blíží lidskému.

Lipidový film na povrchu kůže je tvořen převážně triglyceridy a volnými mastnými kyselinami. Protože se prasečí dermální kolagen podobá biochemicky tomu přítomnému u člověka, je možné použít prasečí kůži, nebo její produkty při transplantacích, aniž by došlo k výrazné imunitní odpovědi.

Zastoupení enzymů v *epidermis* je u obou druhů obdobné. Aktivita oxidačních enzymů, účastnících se produkce energie, je vysoká ve všech vrstvách *epidermis*, kromě *stratum corneum*. U prasat je vysoká aktivita alkalické fosfatázy v bazálních částech dermálních papil a aktivita acetylcholinesterázy ve *stratum spinosum* a *stratum granulosum epidermis*. U člověka je výrazná aktivita alkalické fosfatázy v subepidermálním kapilárním plexu.^{1, 2, 3}

V porovnání s ostatními savci má prasečí *dermis* sice relativně vysokou pružnost, ne však tolik, jako lidská kožní vrstva. U člověka i prasete je dobře vyvinuta mechanická deformace schopná síť vrásek a dermální papily. *Dermis* je u prasete rozdělena na dvě vrstvy, které spolu splývají bez zřetelného ohraničení. Horní papilární vrstva se skládá z množství kónických prokrvených vyvýšenin (papil), vystupujících z povrchu *dermis*. Pod ní ležící vrstva retikulární, tvořená silně provázanými pruhy fibrózní tkáně, je hlavní částí *dermis*.

Síť elastických vláken je u prasete chudší, než u člověka, ale je vyvinutější, než jak ji lze nalézt u ostatních prozkoumaných savců. V závislosti na autorovi se uvádí, že síť elastických vláken je hustší buď na dorzální, nebo na ventrální straně. Rozdíl plyne zřejmě z odlišných preparačních metod kůže použitých při výzkumu. 3D uspořádání, distribuce, tvar i tloušťka elastinových struktur jsou obdobné u prasete i u člověka. Kolagen v prasečí kůži je přítomen

také v 3D síti vláken a jejich svazků, která se prolínají ve dvou hlavních směrech. Menší svazky vláken pak svým uspořádáním dokreslují strukturu síťoviny.

Pro prasata je charakteristická velmi rychlá a intenzivní odpověď na stres, kdy dochází k aktivaci žírných buněk a eosinofilů, jichž se v *dermis* nachází větší množství, než u člověka. Eosinofily se vyskytují převážně ve vrstvě retikulární, žírné buňky pak ve vrstvě papilární ve spojení s krevními cévami.

Podkožní tuková vrstva u prasete je mnohem zřetelnější, než je u člověka. Její tloušťka je přibližně 12 mm (Winter, 1972). Obdobné je uložení adipocytů v tzv. tukových komůrkách tvořených elastinem a kolagenem. Skrz vrstvu podkožního tuku prochází (především kolmo) vlákna spojovací tkáně z retikulární vrstvy *dermis* k povrchu kůže. Oběma chybí *panniculus carnosus*, přítomný u malých zvířat s odlišným průběhem hojení kožních poranění (anglický výraz = loose skinned animals).^{1, 2, 3}

Uspořádání cév v kůži prasete je podobné, jako u člověka. Kožní vaskulatura zahrnuje spodní, střední dermální a subepidermální cévní plexy. Subepidermální plexy, vyživující kožní adnexa, jsou u prasete vyvinuty v menší míře, i když počet a rozmístění kožních připojených orgánů je podobné.

Prasečí kůže neobsahuje ekkrinní žlázy a na rozdíl od člověka jsou apokrinní žlázy (zde = pachové, velké aromatické žlázy) rozmístěné po celém povrchu těla. V termoregulaci tak zde hraje mnohem významnější roli, než u člověka, regulace periferního toku krve dermálním vaskulárním plexem. Apokrinní žlázy přiléhají k chlupovým folikulům a jejich výrazně stočená sekreční část leží na přechodu *dermis* a tukové podkožní vrstvy. Podobně stočené apokrinní žlázy se u člověka nachází pouze v podpaží, pubické a anální oblasti. Apokrinní žlázy, stejně jako žlázy mazové, ústí na povrch těla v blízkosti chlupového kanálu.

Holokrinní mazové žlázy se v prasečí kůži vyskytují rovněž sdruženě s chlupovými folikuly. Leží na povrchu retikulární vrstvy *dermis*. Strukturou se mazové žlázy prasete podobají těm lidským, ačkoliv jsou menší. U prasat se nachází velké mnohobuňkaté mazové žlázy na nártách, které nejsou asociovány s chlupovými folikuly.

Prase je jediným savcem s řídkým ochlupením, podobně jako člověk. Hustota chlupových folikulů v prasečí kůži je zhruba 25 na cm² (Winter, 1972). Chlupy vyrůstají buď po jednom, nebo ve skupinách po 2 až 3, stejně jako u člověka. U prasat není zjevná odlišná hustota chlupových folikulů na různých částech těla, jako u člověka, kde jsou některé oblasti zcela neochlupené (např. dlaně) a největší hustota chlupů se nachází v oblasti kštiny a obličeje. Prasečí chlupové folikuly prochází obdobími růstu a nečinnosti nezávisle na sobě, zatímco u člověka probíhá výměna chlupů a vlasů podle mozaikovitého vzorce.

Imunohistochemické barvení kůže prasete i člověka ukazuje shodné vzory pro množství antigenů, zahrnujících keratin 16 a 10, filagrin, kolagen IV, fibronektin, α -hladkosvalový aktin a vimentin.^{1, 2, 3}

Dále zde zhodnotím vliv přípravků aplikovaných v experimentu na hojení ran. Akutní rány hodnocené v experimentu byly infikované, aby bylo možné zhodnotit účinnost testovaného preparátu (Nanogenta). Infekce v ráně je významným faktorem, prodlužujícím trvání zánětlivé fáze hojení, což je často spojeno s přechodem rány do chronicity. Proto je žádoucí vyvarovat se rozvoje infekce v ráně, nebo již vzniklou infekci potlačit vhodnými antimikrobiálně účinnými přípravky.

Účinnost preparátu Hyiodine[®] byla již potvrzena v klinické praxi. Hyiodine[®] se však do širokého použití dostává jen pomalu. Je to dáno především jeho vysokou cenou. V našem experimentu byl přípravek použit jako kontrola pouze při mikroskopickém histologickém hodnocení vzorků tkáně, vzhledem k jeho prokázanému klinickému účinku v podpoře hojení ran různé etiologie (např. subakutní chirurgické rány, rány komplikované krvácením, diabetické defekty, dekubity).⁶⁰ Jako srovnání v hodnocení mikrobiologickém a makroskopickém byl použit pouze hromadně vyráběný léčivý přípravek Garamycin Schwann[®].

Důležité je zmínit, že rány ošetřované Hyiodine[®] jsou převazovány každý den. Oproti tomu aplikace Nanogenty a Garamycinu Schwann[®] byla jednorázová, takže rány byly v neustálém kontaktu s tkáňovým sekretem.

Mikroskopické histologické hodnocení ukázalo, že u ran, na něž byly aplikovány kontrolní přípravky Hyiodine[®] a Garamycin Schwann[®], se průběh hojení v porovnání s ranami, kde byla aplikována Nanogenta, významně nelišil. Ve všech případech byl hojivý proces optimální. To prokázalo účinnost námi testovaného přípravku při podpoře hojení akutních kožních poranění, včetně ran infikovaných. Jediným patrným rozdílem při mikroskopickém hodnocení tkáně byl v případě aplikace Hyiodine[®] vznik hutnější granulační tkáně (viz. obrazová příloha k mikroskopickému hodnocení). To potvrzuje, že kyselina hyaluronová výrazně podporuje tvorbu extracelulární matrix.

Pro mikroskopické histologické hodnocení byly vhodnější preparáty barvené zeleným trichromem. Ty byly mnohem přehlednější a se zřetelnějším barevným rozlišením jednotlivých struktur – zvláště zánětlivých elementů, než jak tomu bylo u preparátů barvených hematoxylinem - eosinem. Také granulační tkáň byla u barvení H-E lépe diferencovaná.

Mikrobiologické hodnocení sice prokázalo vyšší antibakteriální účinnost přípravku Garamycin Schwann[®] (efekt baktericidní), ale i Nanogenta vykázala schopnost potlačení infekce v ráně s následným pozitivním ovlivněním procesu hojení. To spočívá především ve zkrácení trvání zánětlivé fáze, a tím i rychlejšímu přechodu rány do fáze proliferativní s tvorbou granulační tkáně. Její efekt byl však pouze bakteriostatický.

Pro mikrobiologické hodnocení účinnosti preparátů byly rozhodující výsledky primokultivace ze 7. dne. Z nich vyplývá, že v případě ran infikovaných *Pseudomonas aeruginosa* vykázal vyšší účinnost Garamycin Schwann[®]. U ran infikovaných mikroorganismem *Staphylococcus aureus* neprokázaly Nanogenta ani Garamycin Schwann[®] dostatečný účinek pro potlačení infekce v ráně. Na rány infikované *Escherichia coli* (fakultativní anaerob) působily oba preparáty výborně (viz. grafy 1 a 2). Zde je nutné podotknout, že výsledky mikrobiologického hodnocení mohou být zkresleny např.

nedostatečnými rozestupy mezi jednotlivými ranami, kdy mohlo snadno docházet k přenosu infekce z jedné rány do druhé. U prasat je také proces hojení specifický obrovskou účinností, takže v mnoha případech se infikované rány hojí paradoxně dokonce lépe než rány čisté.

V makroskopickém hodnocení se výrazně projevily hlavní pozitivní vlastnosti M-DOC[®]. A sice její biokompatibilita a schopnost kompletní resorpce. M-DOC[®] se také ukázala jako schopný nosič léčiv. M-DOC[®] při aplikaci na ránu také podporuje proliferaci a ránu účinně kryje a chrání před infekcí. Zatímco Garamycin Schwann[®], aplikovaný ve formě kolagenní houby, působil zpočátku v ráně spíše jako cizí těleso a jeho resorpce trvala delší dobu než v případě Nanogenty. V případě infikovaných ran (nezávisle na typu infekčního agens) s aplikací Nanogenty byl přípravek 7. den ve většině případů vstřebán a rány byly čisté. U infikovaných ran s aplikací Garamycinu Schwann[®] byl ve většine případů ještě 7. den preparát patrný a v ranách byly známky infekce - exudát, povlak spodiny (viz. grafy 3 a 4).

14. Závěr

Hojení kožních poranění je často sledovaným procesem. Je možné zde pozorovat jak regeneraci, tak i reparaci a navíc je kůže velmi snadno dostupná. Ke kožním poraněním také dochází s velmi vysokou frekvencí, proto hledání vhodných způsobů, jak jejich hojení podpořit, usnadnit a urychlit, je v současnosti cílem mnoha experimentátorů.

V této práci jsem se pokusila shrnout obecné informace o průběhu hojení kožních poranění a jejich ošetřování. Při popisu procesu hojení jsem se zaměřila na zánětové mediátory (cytokiny). V experimentu jsme zhodnotili vliv M-DOC[®] s navázaným gentamycinem (NANOGENA) na proces hojení akutních kožních poranění. Pro prokázání účinnosti zkoušeného preparátu byly rány infikovány. Účinnost testovaného přípravku byla porovnávána s hromadně vyráběnými přípravky, jejichž účinek již byl v klinické praxi prokázán.

U přípravku Nanogenta byla potvrzena dostatečná účinnost na zkvalitnění procesu hojení kožních poranění, srovnatelná s účinností preparátů, které byly použity jako kontrola. Její účinek byl dostačující i pro potlačení infekce v ráně, což vedlo k zlepšení procesu hojení ran. Potvrdilo se, že M-DOC[®] je látka zcela biokompatibilní a kompletně resorbovatelná. M-DOC[®] má prokazatelně obrovský potenciál do budoucna. Experimenty s ní v mnoha různých oblastech pokračují a dá se předpokládat, že její využití bude ještě širší.

15. Použité zdroje

1. Sullivan T. P. , Eaglstein W. H. , Davis S. C. , Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Rep Reg* 2001;9:66-76
2. Vardaxis N. J. , Brans T. A. , Boon M. E. , Kreis R. W. , Marres L. M. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies. *J Anat* 1997;190:601-611
3. Perez R. , Davis S. C. Relevance of animal models for wound healing. *Wounds* 2008;20 (1):3-8
4. <<http://www.answers.com/topic/wound-healing>> (citováno 20.8.2008)
5. Calvin M. Cutaneous wound repair. *Wounds* 1998;10 (1):12-32.
6. Diegelmann R. F. , Evans M. C. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosc.* 2004; 9:283-289
7. <<http://cz.hartmann.info/CZ/76666.htm>> (citováno 21.8.2008)
8. <<http://www.zdravotnickenoviny.cz/scripts/detail.php?id=311980>> (citováno 21.8.2008)
9. <<http://sweb.cz/jak.cerny/texty/podmhojran.html>> (citováno 21.8.2008)
10. <<http://www.cslr.cz/download/hojeni-ran-standard.pdf>> (citováno 21.8.2008)
11. <<http://www.medon-solutio.cz/online2006/index.php?linkID=txt14>> (citováno 21.8.2008)
12. <<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/87819-rana>> (citováno 21.8.2008)
13. J. Mačák, J. Mačáková. *Patologie*. Grada Publishing, a.s., Praha, 2004, 347 s.
14. <<http://cs.wikipedia.org/wiki/K%C5%AF%C5%BEE#Poko.C5.BEka>> (citováno 21.8.2008)
15. Silbernagl S. , Lang F. *Atlas patofyziologie člověka*. Grada Publishing, spol.s.r.o. , Praha, 2001, 390 s.
16. Fendrich Z. a kol. *Farmakologie pro farmaceuty I*. Univerzita Karlova v Praze- Nakladatelství Karolinum, Praha, 2002, 207 s.
17. <<http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=164>> (citováno 28.8.2008)
18. <<http://www.convatec.cz/cz/index.php?SH=Art&ID=186>> (citováno 28.8.2008)
19. <http://www.edukafarm.cz/clanek_tisk.php?id=546> (citováno 28.8.2008)
20. <<http://www.cslr.cz/kongresy/litvik.php>> (citováno 29.8.2008)
21. <https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/INT2006_04_06.pdf> (citováno 4.9.2008)
22. <http://www.mou.cz/mou/upload/Rubriky/Nase_tymy/prezentace_oddeleni_ustavni_lekarna/prezentace3/hojeni.pdf> (citováno 4.9.2008)
23. <<http://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2003/05/07.pdf>> (citováno 4.9.2008)
24. Pourová J. přednáška ze speciální farmakologie-vitamíny, 2008. (ústní sdělení)
25. Číselníky VZP, zdravotnické prostředky předepisované na poukaz, verze 630
26. P. Maruna: *Proteiny akutní fáze*. Maxdorf, Praha, 2004, 282 s.
27. <<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2007026341&IA=IE2006000093&DISPLAY=DESC>> (citováno 16.1.2009)

28. <http://www.mdoc.com/mdoc/Technical_information/Material_safety_data_sheets/M_SDS_MDOC.pdf> (citováno 16.1.2009)
29. <<http://www.wikipatents.com/ca/2279649.html>> (citováno 20.1.2009)
30. <www.m-doc.com> (citováno 20.1.2009)
31. <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TB0-4T1SFMP-3&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=914febb67202765db2d809b267c57> (citováno 20.1.2009)
32. <<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=IE2003000023&DISPLAY=DESC>> (citováno 20.1.2009)
33. <<http://www.contipro-group.cz/cz/o-nas/o-kyseline-hyaluronove/>> (citováno 20.1.2009)
34. <<http://www.hyiodine.cz/>> (citováno 20.1.2009)
35. <<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0144327>> (citováno 20.1.2009)
36. <<http://en.wikipedia.org/wiki/Gentamicin>> (citováno 20.1.2009)
37. <<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/129596-gentamicin>> (citováno 20.1.2009)
38. <http://en.wikipedia.org/wiki/Epidermal_growth_factor> (citováno 22.1.2009)
39. <http://www.cancer.gov/Templates/db_alpha.aspx?CdrID=45680> (citováno 22.1.2009)
40. <http://en.wikipedia.org/wiki/Fibroblast_growth_factor> (citováno 24.1.2009)
41. <http://en.wikipedia.org/wiki/Platelet-derived_growth_factor> (citováno 24.1.2009)
42. <http://en.wikipedia.org/wiki/Vascular_endothelial_growth_factor> (citováno 24.1.2009)
43. <http://en.wikipedia.org/wiki/Insulin-like_growth_factor> (citováno 24.1.2009)
44. <<http://web.telecom.cz/dotdiag/dokument/patobio/em.pdf>> (citováno 25.1.2009)
45. <https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1409.html> (citováno 25.1.2009)
46. <http://www.laboranti.ic.cz/Biochemie_2/14_Pojivo_06.ppt> (citováno 25.1.2009)
47. <<http://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/ProteinyECM.ppt>> (citováno 25.1.2009)
48. <<http://www.hpb.cz/index.php?pId=06-4-10>> (citováno 26.1.2009)
49. <<http://www.studuj-jinak.cz/referaty/nahled/06b-lidske-smysly>> (citováno 14.3.2009)
50. <<http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/horsta/pdf/kuze.pdf>> (citováno 14.3.2009)
51. <https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_713.html> (citováno 14.3.2009)
52. <http://www.healthatoz.com/healthatoz/Atoz/common/standard/transform.jsp?request_URI=/healthatoz/Atoz/ency/pseudomonas_infections.jsp> (citováno 15.3.2009)
53. <http://www.medicinenet.com/staph_infection/article.htm> (citováno 15.3.2009)
54. <<http://www.o-wm.com/article/1841>> (citováno 15.3.2009)
55. Grofová, Z. Biologie rány. Čes ger rev 2006; 4 (3). Dostupné z <http://www.geriatrickarevue.cz/pdf/gr_06_03_05.pdf> (citováno 16.3.2009)
56. <www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/bc-p-001/prezentace.ppt> (citováno 16.3.2009)

57. <<http://www.hpb.cz/index.php?pId=04-3-06>> (citováno 16.3.2009)
58. <<http://www.biotrin.cz/czpages/inf051303g.htm>> (citováno 17.3.2009)
59. <<http://www.biolib.cz/cz/taxon/id125230/>> (citováno 18.3.2009)
60. Vokurka M. , Hugo J. a kol. Velký lékařský slovník, 4. vydání. Maxdorf s. r. o., Praha, 2004, 966 s.
61. Prosková, Z. Expres a aktivace metaloproteináz v extracelulární matrix v modelu kožní experimentální rány u potkana. Diplomová práce, Hradec Králové, 2008, 68 s.