

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Studium bílkovin počáteční fáze hojení kožní rány u
diabetických potkanů**

Bc. Vlasta Tkáčová

Diplomová práce

2009

University of Pardubice
Faculty of chemical technology

**The study of the proteins involved in the early phases of
skin wound repair in diabetic rats**

Bc. Vlasta Tkáčová

Thesis
2009

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd
- Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vlasta TKÁČOVÁ**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Studium bílkovin počáteční fáze hojení kožní rány u diabetických potkanů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1) Teoretická část:

- a) obecný úvod o hojení rány a o jeho jednotlivých fázích
- b) problémy vznikající u diabetických pacientů při hojení ran, zejména na dolních končetinách
- c) metody studia hojení ran na laboratorních zvířatech, především potkanech

2) Praktická část:

- a) charakterizace závažnosti onemocnění potkanů s geneticky podmíněným diabetem, stanovení plasmatického insulinu, glukosy, leptinu a fibrinogenu. Studium časových změn uvedených parametrů
- b) vytváření excisní rány v kůži potkanů, ošetření rány, vytváření varianty trvalé rány. Fotografická dokumentace hojení
- c) histologické a imunohistochemické vyšetření rány u diabetických a kontrolních potkanů v průběhu hojení - stanovení interleukinu 6 a fibrinogenu

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jiří Kanta, CSc.

Lékařská fakulta UK Hradec Králové

Konzultant diplomové práce:

Ing. Rastislav Slavkovský

Lékařská fakulta UK Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce:

1. října 2008

Termín odevzdání diplomové práce:

7. května 2009



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlášení autora

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladu, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 5. 2009

Vlasta Tkáčová

Především bych chtěla poděkovat rodičům a sestře za psychickou a finanční podporu během celé doby studia.

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Kantovi, Csc. za vedení diplomové práce, odbornému konzultantovi Ing. Rastislavu Slavkovskému za cenné rady a pomoc při experimentech během práce v laboratoři. Dále i laborantkám Dagmar Ježkové za pomoc při práci s laboratorními potkany a Haně Hollerové za řezání histologických preparátů.

Tato práce byla podpořena granty : CPN spol.s r. o (č. D11-14/32, D11-52-Z02-P01), Grantová Agentura Univerzity Karlovy č. 40207/2007, Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy č. VZ MSM 0021620820.

SOUHRN

Diabetes mellitus 2. typu je závažné metabolické onemocnění, které má za následek řadu zdravotních komplikací. Jedna z nejzávažnějších je zhoršené hojení ran, které v mnoha případech může vést až k amputacím. Jako zvířecí model diabetu 2. typu byl použit potkan Zucker Diabetic Fatty (ZDF), který má mutaci leptinového receptoru. Tento potkan je novým modelem pro studium zhoršeného hojení ran vlivem diabetu.

Naším cílem bylo zjistit metodou ELISA, jaké procesy se odehrávají v organismu potkanů během vývoje diabetu a stanovit, jak se v plazmě mění koncentrace bílkovin, které mají vliv na hojení. Dále je detekovat a lokalizovat v hojících se ranách pomocí imunohistochemie.

Byly popsány měnící se hladiny glukózy, inzulínu, leptinu a inhibitoru plazminogenového aktivátoru (PAI-1) během vývoje diabetu. Tyto hladiny byly také zvýšeny u dospělých diabetických potkanů ve srovnání s kontrolami. Nebyly nalezeny významné rozdíly v koncentracích interleukinu-6 (IL-6) a fibrinogenu. Ve tkáni hojících se ran, odebrané v desátém dni, byl sledován IL-6, PAI-1 a fibrinogen. IL-6 byl ve velkém množství detekován převážně na povrchu diabetických ran a v okolí tukových buněk. Slabě pozitivní byly také fibroblasty. Nebyly nalezeny rozdíly v množství a lokalizaci u PAI-1 v kontrolních a diabetických ranách. Na PAI-1 byl pozitivní endotel kapilár a horní vrstva epitelu. Fibrinogen byl detekován ve formě fibrinové sítě na povrchu diabetických ran a v epitelu ran diabetických i kontrolních.

Potkan ZDF je vhodný ke sledování mechanismů zhoršeného hojení ran vlivem diabetu, ale není za daných podmínek vhodný ke sledování doprovodných změn diabetu, týkajících se plazmatických změn fibrinogenu a IL-6.

Klíčové slova: potkan Zucker Diabetic Fatty, diabetes mellitus, hojení ran, imunohistochemie

SUMMARY

Type II diabetes mellitus is a serious metabolic disease that is accompanied by a number of health complications. One of the most important is impaired wound healing, which in many cases may lead to limb amputation. Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat, which has a mutation in the leptin receptor, was used as an animal model for type II diabetes mellitus. It is a new rat model for studying the impaired wound repair.

Our goal was to find out what processes take place in rats during the development of diabetes. ELISA method was used to determine plasma concentrations of selected proteins that play an important role in early wound healing. The second aim was to detect and locate the proteins in the experimental wounds using immunohistochemistry.

Elevated levels of glucose, insulin, leptin and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) have been found in diabetic rats compared to the controls. No significant differences were found in the concentrations of interleukin-6 (IL-6) and fibrinogen. Time changes in glucose, insulin, leptin and PAI-1 levels during the development of diabetes have been reported. In the tissue, collected at day 10 after wounding, the presence of IL-6, PAI-1 and fibrinogen was monitored. IL-6 was detected in a large quantity mainly at the surface of diabetic wounds and around the adipose cells. The fibroblastic cells were weakly positive. No differences have been found in the quantity and localization of PAI-1 in control and diabetic wounds. The PAI-1 was positive in capillary endothelium and in the upper layer of the epithelium. Fibrinogen was detected in a form of the provisional matrix network in diabetic and control wounds.

ZDF rat is suitable to monitor wound healing impaired due to presence of diabetes, but it is not suitable for monitoring the changes accompanying diabetes, that are related to plasma fibrinogen and IL-6 levels.

Keywords: Zucker Diabetic Fatty rat, diabetes mellitus, wound healing, immunohistochemistry

SEZNAM ZKRATEK

bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor
BMI	index tělesné hmotnosti
DM1T	diabetes mellitus prvního typu
DM2T	diabetes mellitus druhého typu
EGF	epidermální růstový faktor
ELISA	enzymo – imuno analýza
FBG	fibrinogen
FGF	růstový faktor fibroblastů
FGF7	růstový faktor fibroblastů číslo sedm
HBA1c	glykovaný hemoglobin
IL-1	interleukin jedna
IL-6	interleukin šest
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor číslo jedna
IR	inzulínová rezistence
MO	mikroorganismy
PAI-1	inhibitor plazminogenového aktivátoru typ jedna
PDGF	růstový faktor destiček
SDN	syndrom diabetické nohy
SEM	standardní chyba měření
TGF α	transformující růstový faktory alfa
TGF β	transformující růstový faktor beta
TNF α	tumor nekrotizující faktor alfa
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VEGF	cévní endoteliální růstový faktor
ZDF	potkan Zucker Diabetic Fatty

OBSAH

ÚVOD.....	13
1. TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 DIABETES MELLITUS.....	14
1.1.1 DIABETES MELLITUS 1. TYPU.....	14
1.1.2 DIABETES MELLITUS 2. TYPU.....	14
1.1.2.1 Průběh a klinický obraz DM2T	15
1.1.2.2 Obezita a DM2T	15
1.1.2.3 Komplikace diabetu	16
1.2 DIABETES MELLITUS A HOJENÍ RAN	16
1.2.1 HOJENÍ RAN.....	16
1.2.1.1 Hemostáza	16
1.2.1.2 Invaze zánětlivých buněk – zánět	17
1.2.1.3 Tvorba granulační tkáně.....	17
1.2.1.4 Kontrakce rány	18
1.2.1.5 Epitelizace rány a tvorba jizvy	18
1.2.2 ZHORŠENÉ HOJENÍ RAN V LIVEM DM2T	19
1.2.2.1 Růstové faktory.....	19
1.2.2.2 Keratinocyty, fibroblasty.....	19
1.2.2.3 Bakteriální a mykotické infekce	20
1.2.2.4 Ischemie	20
1.2.2.5 Neuropatie	20
1.2.2.6 Kompenzace diabetu	20
1.2.3 SYNDROM DIABETICKÉ NOHY	21
1.2.3.1 Klasifikace SDN	21
1.3 STUDIUM HOJENÍ RAN NA LABORATORNÍCH ZVÍŘATECH.....	22
1.3.1 POTKAN JAKO ZVÍŘECÍ MODEL	22
1.3.1.1 Lokalizace rány.....	23
1.3.1.2 Velikost rány	23
1.3.1.3 Druh a pohlaví potkanů	24

1.3.1.4	Váha a věk potkanů.....	24
1.3.1.5	Anestetika a analgetika	24
1.3.1.6	Analytické stanovení.....	25
1.3.2	POTKAN ZUCKER DIABETIC FATTY	25
1.4	VYBRANÉ PROTEINY POČÁTEČNÍ FÁZE HOJENÍ.....	26
1.4.1	FIBRINOGEN	26
1.4.2	INHIBITOR PLAZMINOGENOVÉHO AKTIVÁTORU TYP-1	26
1.4.3	INTERLEUKIN-6.....	27
2.	METODICKÁ ČÁST	28
2.1	PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE	28
2.2	LABORATORNÍ POTKANI.....	30
2.2.1	ANESTEZIE ZVÍŘETE.....	30
2.2.2	ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ KRVE	31
2.2.3	VYTVOŘENÍ RÁNY A ODBĚR TKÁNĚ	31
2.3	STANOVENÍ PROTEINŮ V PLAZMĚ METODOU ELISA	32
2.4	IMUNOHISTOCHEMIE.....	38
2.4.1	FIXACE TKÁNÍ	39
2.4.2	ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ.....	39
2.4.3	DEMASKOVÁNÍ EPITOPŮ.....	40
2.4.4	BLOKOVÁNÍ ENDOGENNÍ PEROXIDÁZY	40
2.4.5	BLOKOVÁNÍ POZADÍ	40
2.4.6	ŘEDĚNÍ PRIMÁRNÍ PROTILÁTKY	40
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
4.	VÝSLEDKY	46
4.1	HMOTNOST, GLYKÉMIE A PLAZMATICKÉ HLADINY VYBRANÝCH PROTEINŮ.....	46
4.1.1	SLEDOVÁNÍ ČASOVÝCH ZMĚN	46
4.1.2	PRŮMĚRNÉ HLADINY V PLAZMĚ.....	51
4.2	HOJENÍ RAN.....	55
4.3	IMUNOHISTOCHEMIE	57

5. DISKUSE.....	70
ZÁVĚR.....	75
LITERATURA.....	76

ÚVOD

Obezita je vážný problém, který přináší řadu zdravotních rizik. Mezi jedno z nich patří diabetes mellitus 2. typu. Jedná se o nejčastější metabolické onemocnění vedoucí k hyperglykémii, které má za následek i řadu dalších zdravotních komplikací. Jedna z nejdůležitějších je zhoršené hojení ran, které u pacientů způsobuje značný diskomfort a v mnoha případech může vést až k amputacím. Z tohoto důvodu je hojení ran častým předmětem výzkumu. Jelikož experimenty na lidech lze provádět omezeně, hledají se modely definující diabetes. V naší laboratoři byl zvolen jako zvířecí model pro diabetes mellitus 2. typu potkan Zucker Diabetic Fatty (ZDF). Protože je tento potkan novým modelem pro studium hojení ran, bylo třeba zjistit, jaké procesy se odehrávají v jeho organismu během vývoje diabetu a při hojení kožní rány. V případě pozitivních výsledků, by mohl být tento druh potkana dále využíván ke studiu prostředků vedoucích ke zlepšení hojení diabetických ran.

Cílem tedy bylo zjistit, jak se vyvíjejí plazmatické koncentrace glukózy, inzulínu, leptinu a PAI-1 v závislosti na věku ZDF potkanů během vývoje diabetu u kontrolních a diabetických zvířat. Dále stanovit plazmatické koncentrace fibrinogenu, IL-6 a výše uvedených proteinů u dospělých ZDF potkanů. Jelikož IL-6, PAI-1 a fibrinogen se podílejí na počáteční fázi hojení, byla dalším cílem jejich detekce a porovnání rozdílů v expresi a lokalizaci v hojících se ranách u diabetických a kontrolních zvířat.

Tyto cíle se nám podařilo splnit.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus je chronické onemocnění, které se projevuje jako porucha metabolismu glukózy. Podle příčiny vzniku rozlišujeme dva základní typy - diabetes mellitus 1. typu (DM1T) a diabetes mellitus 2. typu (DM2T).

1.1.1 DIABETES MELLITUS 1. TYPU

Diabetes mellitus 1. typu je onemocnění charakterizované různě rychle probíhajícím zánětem β -buněk pankreasu, který vede k absolutnímu nedostatku inzulínu. Dříve se tento typ diabetu označoval jako juvenilní diabetes (diabetes dětí a mladistvých). Dnes se DM1T rozděluje do dvou podskupin (Rybka 2007).

U DM1T - A se vyskytují protilátky proti ostrůvkům pankreasu, což vede k destrukci β -buněk. Jedná se o imunitně zprostředkovanou formu. U DM1T - B se jedná o těžký inzulínový deficit bez přítomnosti autoimunity.

Příčina autoimunitní formy je dána vlivem několika faktorů: faktory zevního prostředí, virové infekce, faktory genetické, nízká obranyschopnost β -buněk proti destrukci. Tento typ mnohdy doprovází i jiné imunologicky podmíněné choroby např. Addisonova choroba, celiakie, autoimunitní tyreoiditida, perniciózní anémie (Rybka 2007).

1.1.2 DIABETES MELLITUS 2. TYPU

Diabetes mellitus 2. typu je nejčastější metabolickou chorobou vyznačující se relativním nedostatkem inzulínu. Ten vede v organismu k nedostatečnému využití glukózy, což se projeví hyperglykemií. DM2T je charakterizován kombinací tkáňové inzulínové rezistence a porušené sekrece inzulínu. Kvantitativní podíl obou poruch může být rozdílný. Není zcela jasné, která odchylka hraje ve vývoji onemocnění

primární úlohu, ale nezbytným předpokladem ke vzniku onemocnění je přítomnost obou poruch (Rybka 2007).

1.1.2.1 Průběh a klinický obraz DM2T

Na vzniku DM2T se podílí jak faktory genetické, tak i faktory exogenní. Mezi nejčastější exogenní faktory patří nedostatečná fyzická aktivita, obezita, nevhodná potrava, kouření a jiné civilizační návyky.

Jednou z hlavních příčin poruchy účinku inzulínu v cílových tkáních je inzulínová rezistence (IR). Jedná se o stav, kdy orgány a tkáně nejsou schopny dostatečně reagovat na inzulín. Příčinou je porucha inzulínových receptorů a postreceptorových pochodů.

V důsledku IR dochází k vyšším nárokům na sekreci inzulínu. To způsobí, že β -buňky nejsou schopny produkovat inzulín v potřebné míře. Dojde k poruše glukózové homeostázy a k rozvoji DM2T (Rybka 2007).

K manifestaci diabetu dochází nejčastěji ve 40ti až 50ti letech, ale může probíhat dlouho skrytě. Hlavním příznakem je hyperglykémie. Mezi další klinické příznaky patří také polyurie (časté močení), polydipsie (nadměrná žízeň), hubnutí, slabost a velká únava, bolesti nebo křeče ve svalech, poruchy vidění (Rybka 2007).

1.1.2.2 Obezita a DM2T

Obezita je onemocněním charakterizované zvýšeným nahromaděním tukové tkáně. U pacientů trpících diabetem přináší řadu komplikací. Hlavní příčinou rozvoje obezity je nadměrný příjem a nedostatečný výdej energie. Velkou úlohu zde hrají také genetické faktory.

Množství obézních diabetiků rok od roku stoupá. Nadváhou nebo obezitou trpí 80-90 % nemocných s DM2T. Na každý 1 kg nárůstu tělesné váhy stoupá prevalence diabetu průměrně o 9 % (Rybka 2007). Přítomnost obezity má vliv na inzulínovou rezistenci, což vede ke zvyšování sekrece inzulínu.

Tuková tkáň neslouží pouze jako energetická zásobárna s termoregulační funkcí, ale produkuje také řadu proteinů. Tyto proteiny se nazývají adipokiny a působí

na inzulinovou senzitivitu. Patří mezi ně interleukin-6 (IL-6), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF α), leptin, atd. (Škrha et al. 2005).

1.1.2.3 Komplikace diabetu

Diabetes je závažné onemocnění zvláště pro komplikace, které způsobuje. Během diabetu dochází v organismu ke změnám metabolických drah sacharidů, lipidů a proteinů. To vede k řadě akutním a chronickým komplikacím týkajících se celého organismu. Mezi nejběžnější patří kardiovaskulární komplikace, oční komplikace, diabetická nefropatie, diabetická neuropatie a v neposlední řadě zhoršené hojení ran (syndrom diabetické nohy).

1.2 DIABETES MELLITUS A HOJENÍ RAN

Hojení ran je komplexní proces probíhající v několika stádiích, která na sebe navazují a překrývají se. Celý proces je ovlivňován lokálně a systémově. Vyžaduje řadu faktorů a fyziologických procesů, které se odehrávají v organismu. Diabetes může tyto pochody ovlivňovat nebo narušovat. Hojení ran může u diabetických pacientů komplikovat změna koncentrace růstových faktorů, enzymů, odlišná buněčná aktivita i tvorba granulační tkáně, mykotické i bakteriální infekce a zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (Fajferová 2007).

1.2.1 HOJENÍ RAN

Hojení ran je charakterizováno několika fázemi:

1.2.1.1 Hemostáza

V místě poranění je koagulačním systémem zahájen proces srážení krve. Dochází k vazokonstrikci (účinkem tromboxanu A₂ a serotoninu) a k aktivaci trombocytů. Jejich agregace a degranulace je zdrojem dalších důležitých látek pro vytvoření provizorní matrix pro migraci buněk. Součástí matrix jsou glykoproteiny uvolněné

z destiček, vlákna fibrinu, plazmatický fibronectin a další komponenty. Z destiček se také uvolní růstový faktor destiček (PDGF), transformující růstový faktor alfa ($TGF\alpha$) a transformující růstový faktor beta ($TGF\beta$). Ty stimulují buněčné dělení a tvorbu chemoatraktantů, které chemotakticky přitahují do sraženiny neutrofilní granulocyty a tkáňové makrofágy (Nečas et al. 2005) .

1.2.1.2 Invaze zánětlivých buněk – zánět

Tato fáze hojení se projevuje zarudnutím, lokálním zvýšením teploty, otokem a bolestivostí v místě poranění. Prvním typem buněk, které se podílejí na lokální zánětlivé odpovědi jsou neutrofilní granulocyty, které se do místa poranění dostávají během několika hodin diapedézou a jsou přítomny asi sedm dnů. Díky schopnosti fagocytózy a tvorby kyslíkových intermediátů odstraňují cizorodé částice a bakterie. Další jejich funkcí v procesu hojení je také uvolňování proteolytických enzymů (např. kolagenázy, elastázy), chemokinů a růstových hormonů.

Dalším typem imunitních buněk, které se objevují v místě poranění asi po jednom až dvou dnech, jsou tkáňové makrofágy. Ty mají za úkol eradikaci bakterií a odstranění nekrotické tkáně. Vedle schopnosti fagocytózy, jsou také zdrojem růstových faktorů $TGF\beta$, bazického fibroblastového růstového faktoru (bFGF) a fibronectinu.

Během této fáze dochází ke změně složení provizorní matrix, kdy původní krevní sraženina (ta je rozkládaná fibrinolýzou) se mění ve hmotu obsahující tenascin, osteopontin, osteonektin, glykosaminoglykany, hyaluronan a buněčnou formu fibronectinu. Takto změněné složení iniciuje migraci fibroblastů. Tím se zahajuje proces fibroplazie a prorůstání endotelií (angiogeneze) do místa poranění (Nečas et al. 2005).

1.2.1.3 Tvorba granulační tkáně

Ke změně provizorní matrix v granulační tkáň dochází za tři až čtyři dny po vzniku poranění a vrcholí mezi sedmým a desátým dnem.

Do provizorní matrix migrují mesenchymální buňky charakteru fibroblastů, které jsou zdrojem kolagenních vláken typu III a typu I. Tím je zahájena fibroplazie.

Fibroblasty produkovaný fibronektin poskytuje oporu pro ukládání kolagenních fibril a iniciuje tvorbu granulační tkáně.

V důsledku hypoxie dochází prostřednictvím růstových faktorů bFGF a cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) také k angiogenezi. Nejdříve probíhá prorůstání kompaktních endoteliálních provazců do primitivní matrix a poté vznik kapilár s vnitřním průsvitem (Nečas et al. 2005).

1.2.1.4 Kontrakce rány

V průběhu hojení rány se značná část fibroblastů přemění vlivem PDGF a TGF β na myofibroblasty, které exprimují α -hladkosvalový aktin a stimulují kontrakci rány. Dochází k vytváření spojů mezi myofibroblasty a extracelulární matrix a jejich uspořádání podél linie kontrakce (Clark 1993).

1.2.1.5 Epitelizace rány a tvorba jizvy

Současně s tvorbou granulační tkáně dochází k epitelizaci rány v místech, kde byla porušena bazální membrána epitelu a rána zasahuje do pojivových struktur. Zdrojem reepitalizace při poranění kůže jsou bazální keratinocyty. Tyto buňky jsou dále zdrojem metaloproteináz. Rozrušují také fibrinová vlákna aktivací plazminu dvěma typy aktivátoru plazminogenu (tkáňovým a urokinázovým), které začnou ve zvýšené míře exprimovat na své membráně.

V procesu reepitelizace rány jsou důležité růstové faktory TGF α , epidermální růstový faktor (EGF) a fibroblastový růstový faktor číslo sedm (FGF7). Epitelizace povrchové rány závisí také na tvaru poranění. Čtvercová rána se bude hojit lépe, než stejně velká kruhová rána. Ta se ve svém středu špatně epitelizuje, protože množící se a centripetálně migrující buňky mají nedostatek místa (Nečas et al. 2005).

1.2.2 ZHORŠENÉ HOJENÍ RAN VLIVEM DM2T

U diabetických pacientů může docházet k poruše hojení ran působením krátkodobých, ale i dlouhodobých změn glykémie a sérových koncentrací inzulínu (Fejfarová 2007). Byla prokázána porucha migrace a proliferace keratinocytů a fibroblastů, snížení množství epidermálních nervů (Brem et Tornic-Canic 2007). Mohou se vyskytovat abnormality v koncentraci růstových faktorů a aktivitě proteolytických enzymů. Chronické rány bývají také infikovány bakteriálními a mykotickými infekcemi (Fejfarová 2008a). Komplikace způsobuje také ischemie a špatná kompenzace diabetu (Fejfarová 2008b).

1.2.2.1 Růstové faktory

K důležitým růstovým faktorům, které ovlivňují hojení ran patří PDGF, který zvyšuje migraci makrofágů, syntézu kolagenu, tvorbu granulační tkáně a urychluje epitelizaci (Köveker 2000), růstový faktor fibroblastů (bFGF) podporující proliferaci fibroblastů a angiogenezi a inzulínu podobný růstový faktor číslo jedna (IGF-1) zvyšující epitelizaci, syntézu kolagenu a proliferaci fibroblastů. Byla popsána snížená exprese IGF-1 u diabetických jedinců, což vedlo ke zpomalení hojení (Blakytny et al. 2000). Růstové faktory u diabetických pacientů mohou být méně exprimovány nebo proteázami ve zvýšené míře destruovány. V chronických ranách diabetiků byla nalezena zvýšená aktivita tkáňových metaloproteáz (Burrow et al. 2007).

1.2.2.2 Keratinocyty, fibroblasty

Pro reepitelizační stádium hojení je charakteristická migrace keratinocytů podél kolagenních a fibronektinových vláken (Fejfarová 2007). Ovšem v chronických ranách diabetických pacientů dochází k inhibici migrace keratinocytů a omezení migrace a proliferace fibroblastů (Brem et Tomic-Canic 2007).

1.2.2.3 Bakteriální a mykotické infekce

Infekce je invaze a multiplikace mikroorganismů (MO) v tkáni. Ve většině případů jde o méně závažné komplikace. Ovšem v některých případech může docházet k velkému šíření infekce vedoucí až ke vzniku septických gangrén, což nakonec končí amputací. Diabetické ulcerace bývají většinou infikovány větším počtem patogenních MO než rány nediabetických pacientů (Hunt 1992, Lavery et al. 1995). Z chronických diabetických ran bývá nejčastěji vykultivována bakterie *Staphylococcus aureus* (Armstrong et Lipsky 2004).

Diabetické rány mohou být infikované také mykotickými agens. Jejich výskyt se zvyšuje i vlivem užívání velkého množství antibiotik, což vede k vymýcení fyziologické bakteriální flóry a umožňuje růst oportunních MO (Bross et al. 1989).

1.2.2.4 Ischémie

Cévní zásobenění tkání slouží k zásobenění kyslíkem a nutricí tkání. Hypoxie způsobená ischemií působí negativně na hojení ran. Ke tkáňové ischemii dochází vlivem poruchy periferního prokrvení. U diabetiků je také většinou poškozena mikrocirkulace (Fejfarová 2008a).

1.2.2.5 Neuropatie

Neuropatie je nejčastější chronickou komplikací diabetu. Špatná kompenzace diabetu vede u pacientů také k ischemii nervů, což přispívá k rozvoji diabetické neuropatie.

Ta se projevuje silnými bolestmi, svalovou slabostí, parézami nervů a velmi výrazně se podílí na etiopatogenezi syndromu diabetické nohy (SDN) (Piaggese 2004).

1.2.2.6 Kompenzace diabetu

Při glykemiích vyšších než 11 mmol/l dochází k problémům při hojení ran a imunologickým poruchám (Fajferová 2008b). Dekompenzace diabetu může vést k poruše hojení a vzniku SDN. To omezí u pacientů pohybovou aktivitu a zvýší

stresovou reakci na daný problém, což vede ke zhoršení kompenzace diabetu (Lilley et Levine 1998). Tím se pacienti ocitají v začarovaném kruhu.

1.2.3 SYNDROM DIABETICKÉ NOHY

Syndrom diabetické nohy je jednou z nejzávažnějších komplikací diabetu a je hlavní příčinou amputací. Podle mezinárodního konsensu je definován jako ulcerace, ale také jako poškození hlubokých tkání nohy spojené s neuropatií, angiopatií a infekcí. Diabetická ulcerace na nohou je rána penetrující celou vrstvou kůže (Jirkovská et al. 2006).

Hlavním patogenetickým faktorem k rozvoji SDN je diabetická neuropatie (Rybka 2007). Velmi nebezpečná je také přítomnost infekce, což bývá nejčastější důvod hospitalizace pacientů (Jirkovská et al. 2004).

1.2.3.1 Klasifikace SDN

Liverpoolská klasifikace SDN

Podle etiologie se syndrom diabetické nohy dělí na primární a sekundární. Primární se rozděluje podle příčiny na neuropatickou, ischemickou a neuroischemickou ulceraci, sekundární pak na nekomplikovanou a komplikovanou ulceraci (absces, flegmóna).

Klasifikace podle Wagnera

Tato klinická klasifikace je založena na posouzení hloubky ulcerace a přítomnosti infekce. Mnozí tuto klasifikaci považují za standardní. Dělí se na:

Stupeň 0 – bez porušení kožního krytu, přítomnosti otlaků, deformit a osteopatie

Stupeň 1 – objevují se povrchové ulcerace nezasahující do podkoží

Stupeň 2 – nalézáme hlubší ulcerace zasahující do podkoží s postižením kloubních pouzder a šlachových pouzder

Stupeň 3 – jsou přítomné hluboké ulcerace s abscesy a flegmonou

Stupeň 4 – objevuje se gangréna lokalizovaná na část nohy

Stupeň 5 – gangréna celé nohy (Charvát 2001)

Texaská klasifikace SDN

Tato klasifikace léze hodnotí podle hloubky ulcerace stupněm 0-III. Každý stupeň má stádium A (bez infekce a ischémie), B (s infekcí), C (s ischémií) a D (s infekcí a ischémií) (Jirkovská 2004).

1.3 STUDIUM HOJENÍ RAN NA LABORATORNÍCH ZVÍŘATECH

Mnoho vědeckých a medicínských pracovníků se zabývá studiem hojení ran. Z etických důvodů je možné tento problém studovat na lidech pouze omezeně. V takovém případě je jedna z možností použít laboratorní zvířata. To s sebou přináší řadu výhod. Jedna z nich je, že proces hojení je rychlejší. Je tedy možné sledovat změny na kožní ráně v rámci dnů. To je poměrně přesnější než u lidí, kdy se jedná o týdny (Cross et al. 1995).

Při volbě vhodného zvířecího modelu je důležité, aby v hojící se ráně docházelo k biologickým procesům, které se vyskytují v lidské hojící se ráně (Gottrup et al. 2000). Při patologických podmínkách dochází ke zhoršenému hojení a k chronickým problémům. V takovém případě musí být tyto podmínky pečlivě simulovány také na zvířatech (Lindbland 2000).

1.3.1 POTKAN JAKO ZVÍŘECÍ MODEL

Pro porozumění procesům probíhajících při hojení rány je důležitá znalost anatomie kůže (Kirsner et Bogensberger 2002). Velmi často bývají ke studiu kožní rány používáni potkani. Potkaní kožní rána však dokonale nenapodobuje lidskou kožní ránu, protože morfologie kůže potkanů a člověka je rozdílná (Marx et Mou 2002). Potkani jsou popisováni jako zvířata s volnou kůží. Tato vlastnost umožňuje kontrakci rány a hraje důležitou roli v uzavření kožní rány (Mogford et Mustoe 2001). Kontrakce rány, která je obvykle rychlejší než epitelizace, způsobí zkrácení

času hojení potkaní rány. Lidé mají kůži pevnou, a proto bývá interpretace experimentálních dat sporná (Davidson 1998).

Ačkoli existují rozdíly mezi potkaním a lidským hojením ran, jsou potkani častým a vyhledávaným modelem těchto studií. Hlavně díky snadné dostupnosti, nízké ceně a malé velikosti. Dalším důvodem je krátká délka života, krátká gravidita, poddajné chování, dobře definovaný zdravotní stav a genetický původ (Dorsett-Martin 2004).

1.3.1.1 Lokalizace rány

Lokalizace rány je velice významná, protože důležitým faktorem rychlosti kontrakce je, jak pevně je kůže adherentní ke spodní tkáni. Ve většině studií jsou rány umístěny dorzálně (78,18 %), dále bývají rány ještě lokalizovány na břicho (18,18 %), krku (1,82 %), boku (1,82 %), noze (1,82 %) a chodidle (1,82 %) (Dorsett-Martin 2004). V některých případech informace o přesné lokalizaci a hloubce rány nebývá dostupná (Nagappa et Cheriyan 2001).

1.3.1.2 Velikost rány

V pokusech se používají rány různých velikostí a tvarů. Nelze říct, že by existoval nějaký standard. Může se jednat o kruhové rány o průměru 6 mm (Pirila et al. 2002), 15 mm (Toyokawa 2003, Hirano 2002) a 2 cm (Nagappa et Cheriyan 2001). Nebo o incizní rány a řezy mohou být dlouhé od 5 mm (Liu et al. 2000) až po 8 cm (Yaron et al. 1995). Tvar rány je důležitý pro následnou epitelizaci a kontrakci. Pro studium hojení ran některé studie doporučují čtvercový tvar o velikosti ne menší než 4 cm². Tím se docílí dobré kontrakce a epitelizace (Montandon et al. 1977). Na druhou stranu, čím je rána větší, tím dochází k většímu metabolickému a psychickému stresu organismu. Jiní autoři uvádí, že je lepší volit rány velikosti 15 x 15 mm než 20 x 20 mm na dospělé potkaní samici Hooded Lister o hmotnosti 200 až 350 gramů (Cross et al. 1995).

1.3.1.3 Druh a pohlaví potkanů

Pro studium hojení kožní rány jsou nejčastěji používány druhy Sprague–Dawley a Wistar. Z dalších druhů se dále uvádí Nude/Hairless, Lewis, Dark Agouti, Fischer/Norway a Brown ACI (Dorsett-Martin 2004). Při výběru vhodného druhu a pohlaví je třeba dobře zvážit také výdaje. Samci jsou obvykle levnější než samice stejné velikosti (Dorsett-Martin 2004). Některé studie používají k výzkumu pouze samce nebo samice. V jiných je použito obojího pohlaví. Hojení ran je u rozdílného pohlaví odlišné. Je třeba zvážit názor, zda je možný hormonální vliv na hojení. Uvádí se, že deficit estrogenu je spojený se zhoršeným hojením kožní rány (Pirala et al. 2002). Tenčí kůže samic umožňuje rychlejší hojení vlivem kontrakce, zatímco samčí rána má větší tendenci hojit se pomocí epitelizace (Cross et al. 1995).

1.3.1.4 Váha a věk potkanů

Většina studií používá potkany s váhou od 250 do 300 gramů. Věk se volí podle druhu výzkumu. Bývají používáni právě narození až 24 měsíců staří potkani. Věk a váha spolu korelují a mohou být dalším faktorem ovlivňujícím hojení. Potkani, kteří jsou staří 3 – 6 měsíců, mohou být porovnatelní s mladými lidmi (Mogford et Mustoe 2001). Starší mají sníženou schopnost zvládat tlak prostředí a jsou náchylnější k mnohočetným zdravotním problémům, což může být příčinou sníženého prokrvení kůže (Mogford et Mustoe 2001).

1.3.1.5 Anestetika a analgetika

Při volbě anestetika hraje roli cena a dostupnost. Zaměstnanci a ústav musí dodržovat platné předpisy související s prací s narkotiky. Anestetikum může být podáváno injekčně (pentobarbital sodný, ketamin a xylazin) nebo inhalačně (ether). Lze použít také kombinaci injekce a inhalace při použití ketaminu s methoxyfuranem. Nejčastěji se používá pentobarbital sodný (30,9 %), ether (20 %), ketamin a xylazin (18,18 %) (Dorsett-Martin 2004).

1.3.1.6 Analytické stanovení

Hlavní výhodou požití zvířecího modelu je možnost získat velké množství vzorků. Hojící ránu lze sledovat jak makroskopicky, tak histologicky (vývoj nového epitelu, struktura granulační tkáně, zánět, tloušťku kůže). Markery hojení se stanovují biochemicky, často v kombinaci s buněčnými a imunologickými analýzami. U zvířecího modelu je možné zjistit pevnost jizvy pomocí tenzimetru. Výsledky analytických stanovení mohou být ovlivňovány pohlavím, velikostí a stářím potkanů, vlivem prostředí, zacházení se zvířaty a technikou použitou při vytváření kožní rány (Dorsett-Martin 2004).

1.3.2 POTKAN ZUCKER DIABETIC FATTY

Potkan Zucker Diabetic Fatty (ZDF) je zvířecím modelem pro DM2T (Leonard et al. 2005) a byl vybrán jako nový model pro studium zhoršeného hojení kožní rány vlivem diabetu. Tento druh vznikl příbuzenským křížením hyperglykémických obézních Zucker potkanů (Peterson et al. 1990). Potkan má *fa/fa* mutaci leptinového receptoru (Pickavance et al. 1998). Leptin je produkován tukovými buňkami a jako protein sytosti se podílí na udržování energetické homeostázy. Po jeho navázání na příslušné receptory dochází k pocitu nasycení. U ZDF potkanů k tomuto nedochází (Terrettaz et Jeanrenaud 1983). Stále konzumují potravu a stávají se obézní. Jestliže jim je podávána speciální strava s vysokým obsahem tuků, vyvine se u nich DM2T.

ZDF potkani se vyznačují obezitou, hyperglykemií, zvýšenou hladinou plazmatického cholesterolu a triacylglycerolů (Peterson et al. 1990), polyurií a polydipsií (Finegood et al. 2001). Hyperglykémie se vyvíjí mezi 7 a 12 týdnem (Peterson et al. 1990, Kuhlmann et al. 2003) a předchází ji, stejně jako u lidí, obezita a inzulinová rezistence. To je spojeno s poruchou struktury a zvýšenou smrtí β -buněk, ke které dochází před vývojem hyperglykémie (Finegood 2001).

1.4 VYBRANÉ PROTEINY POČÁTEČNÍ FÁZE HOJENÍ

1.4.1 FIBRINOGEN

Fibrinogen (FBG) je glykoprotein, který se skládá ze tří párů polypeptidových řetězců α , β a γ spojených mezi sebou disulfidickými můstky. Hraje důležitou roli při hemostáze, kdy dochází k jeho přeměně na polymerující nerozpustný fibrin, což vede k zástavě krvácení. Běžně se vyskytuje rozpuštěný v krevní plazmě. Je tvořen v játrech, ale vyskytuje se také v α -granulech krevních destiček. Hlavním induktorem syntézy FBG v játrech je IL-6, který indukuje produkci všech tří řetězců FBG. Při DM2T se zvyšuje syntéza FBG. Souvisí to se systémovou zánětlivou odpovědí a nadprodukcí IL-6, jelikož hladiny FBG korelují s hladinou IL-6. Špatná metabolická kompenzace vede také ke zvyšování FBG v korelaci s hladinami glukagonu, glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) a fruktozaminu. Po zlepšení glykemické kontroly dochází k poklesu hladiny FBG (Galajda et Mokáň 2001).

1.4.2 INHIBITOR PLAZMINOGENOVÉHO AKTIVÁTORU TYP-1

Inhibitor plazminogenového aktivátoru typ-1 (PAI-1) je jednořetězcový glykoprotein. Je hlavním regulátorem cévního fibrinolytického systému. Vytváří ekvimolární komplex s tkáňovým aktivátorem plazminogenu (tPA) v poměru 1 : 1, čímž ho inaktivuje. Nedochozí k aktivaci plazminu, který štěpí fibrin. PAI-1 funguje jako inhibitor fibrinolýzy. Cirkulující PAI-1 v plazmě může být vaskulárního (endotelového) nebo extravaskulárního (adipocytového, hepatocytového) původu. Do cirkulace se uvolňuje hlavně z endotelu. Krevní destičky jsou jedinými buňkami v organismu, ve kterých je PAI-1 uskladněn. Nachází se ho v nich až čtyřnásobně více než v plazmě, ale destičky nijak významně neovlivňují jeho plazmatické hladiny. Mají spíše význam při lokální kumulaci inhibitoru. Zvýšené hladiny při obezitě souvisí spíše s množstvím viscerálního než podkožního tuku. Celkově však podkožní tuk tvoří většinu (80-90 %) tělesného tuku, proto se může podílet na celkových hladinách PAI-1. Důležitým induktorem endotelové syntézy PAI-1 jsou zánětlivé cytokiny: tumor nekrotizující faktor alfa (TNF α), interleukin-1 (IL-1) a

interleukin-6 (IL-6). Leptin, hormon adipocytů, má některé účinky podobné cytokinům; a byl prokázán jeho vliv na produkci PAI-1. U nemocných s DM2T byla prokázána zvýšená hladina PAI-1, která koreluje s hladinou inzulinu, triacylglycerolu a s indexem tělesné hmotnosti (BMI) (Galajda et Mokáň 2001).

1.4.3 INTERLEUKIN-6

Interleukin-6 je glykopeptid produkovaný především makrofágy, TH2 lymfocyty, fibroblasty, adipocyty a endoteliálními buňkami (Heinrich et al. 1990). Receptory pro IL-6 na svém povrchu exprimují T-lymfocyty, hepatocyty a aktivované B-lymfocyty (Ferenčík et al. 2002). V hepatocytech stimuluje IL-6 tvorbu proteinů akutní fáze včetně fibrinogenu a C-reaktivního proteinů. Hladiny FBG korelují s hladinou IL-6. Při obezitě se jeho hladiny zvyšují v důsledku jeho zvýšené tvorby v podkožním tuku. Nadprodukce IL-6 při DM2T souvisí s obezitou (Kern et al. 2001) a se systémovou zánětlivou odpovědí (Galajda et Mokáň 2001). IL-6 hraje klíčovou roli při hojení ran. Pravděpodobně také v regulaci angiogeneze, infiltraci leukocytů a hromadění kolagenu (Lin et al. 2003).

2. METODICKÁ ČÁST

2.1 PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

Přístroje

centrifuga Universal 16 (Hettich)

spektrofotometrická čtečka mikrotitračních deštiček TECAN Infinite M200

inkubátor (Binder)

mikroskop (Nikon)

mikrovlnná trouba (Daewoo)

pH metr (WTW)

glukometr AccuChek Go (Roche)

fotoaparát Canon D350

vortex (Scientific Industries)

Nástroje a materiál

pinzeta, zahnuté pinzety, chirurgické zahnuté nůžky, Luerovy kleště, injekční stříkačka s jehlou

zkumavky Microvette 500 – Plasma/Lithium Heparin Gel (Sarstedt)

podložní sklíčka SUPERFROST Plus (Thermo Scientific)

krycí sklíčka 50 x 24 mm, 22 x 22 mm (Menzel – Glaser)

Chemikálie použité při odběru a zpracování plazmy

Ether (Lachema)

Heparin (Zentiva)

rat Insulin ELISA kit (Merckodia, 10-1124-01)

rat Insulin ELISA kit (BioVendor, RSHAKRINO10TR)

mouse/rat Leptin ELISA kit (BioVendor, RD291001200R)

rat PAI-1 ELISA kit (Imclone, 601)

rat Fibrinogen ELISA kit (Assaypro, ERF2040-1)

rat IL-6 EIA kit (ALPCO Diagnostics)

Chemikálie použité při histologickém a imunohistochemickém zpracování

xylen (P-Lab)

ajatin (Lach-Ner)

pepsin (Sigma)

peroxid vodíku (Riedel-de Haën)

bovinní fetální sérum (PAA)

kyselina citrónová (Lach-Ner)

citrát sodný (Lach-Ner)

kyselina chlorovodíková (Penta)

chlorid sodný (Fluka)

hydrogenfosforečnan sodný (Fluka)

dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema)

polyklonální králičí protilátka IgG proti IL-6 (Abcam, ab6672)

polyklonální králičí protilátka IgG proti PAI-1 (Santa – Cruz, sc-8978)

polyklonální králičí protilátka IgG proti fibrinogenu (Santa – Cruz, sc-33581)

DakoCytomation LSAB+ System – HRP; Biotinylated link universal, Streptavidin-HRP (DakoCytomation, K0690)

DAB Substrate – Chromogen system; DAB chromogen, DAB substrate buffer (DakoCytomation – K3466)

DPX mountant for histology (Fluka)

Mayerův hematoxylin (Merck)

formaldehyd (Sigma)

2.2 LABORATORNÍ POTKANI

Projekt pokusů byl schválen odbornou komisí Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Veškeré práce se zvířaty byly prováděny ve viváriu LF HK. Zvířata byla chována v klimatizovaných místnostech s teplotou 22 °C. Pro experiment byli použiti potomci potkanů ZDF (Anlab, Praha) původem z Charles River, USA. Pro rychlejší vývoj DM2T, jim byla od osmého týdne života, podávána speciální strava s vysokým obsahem tuků. Samcům LabDiet PURINA 5008 obsahující 17% kcal tuku (IPS, Londýn, Velká Británie) a samicím C13004 s obsahem 48% kcal tuku (Research Diets, USA).

Zvířata byla rozdělena do čtyř skupin po třech: kontrolní samci, diabetičtí samci, kontrolní samice a diabetické samice. Od věku osm týdnů byli jednou za dva týdny zváženi, byl jim odebrán vzorek krve, který byl zpracován na plazmu, a byla jim změřena glykémie. To probíhalo až do věku dvacet dva týdnů.

V druhé části experimentu byly opět vytvořeny čtyři skupiny potkanů (kontrolní samci, diabetičtí samci, kontrolní samice a diabetické samice), každá byla tvořena asi jedenácti zvířaty starými asi dvacet dva týdnů. V narkóze jim byla odebrána krev, změřena glykémie a vytvořena excizní kruhová rána o průměru 2 cm. Poté bylo sledováno hojení až do desátého dne. Rány byly fotografovány s milimetrovým pravítkem fotoaparátem Canon. V desátém dni byla granulační tkáň odebrána, fixována ve 4 % formaldehydu, zalita do parafínových bločků a nakrájena na tloušťku 6 μm .

2.2.1 ANESTEZIE ZVÍŘETE

Před odběrem krve nebo tkáně byl potkan umístěn do skleněné nádoby nasycené párami etheru.

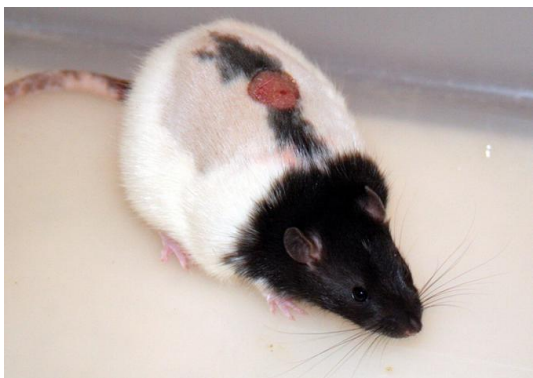
2.2.2 ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ KRVE

Potkan byl položen na bok a skleněnou kapilárou mu byla odebrána krev z plexus orbital do zkumavek Microvette 500 – Plasma/Lithium Heparin Gel (Sarstedt) s přídatkem 50 μ l heparinu. Po vytažení kapiláry byla na oko přitisknuta gáza, aby bylo zastaveno krvácení. Z kapky krve byla pomocí glykometru změřena hladina glykémie. Krev byla stočena na plazmu v centrifuze (3 min při 3 tis/ot.). Přehledně popsané zkumavky se vzorky plazmy byly uskladněny při mínus 20 °C.

2.2.3 VYTVOŘENÍ RÁNY A ODBĚR TKÁNĚ

Potkan byl fixován k podložce v poloze na břiše, jeho záda byla oholena a vydezinfikována 1 % ajatinem.

Uprostřed zad ve vzdálenosti 6 cm pod ušima byla Luerovými kleštěmi a zahnutými chirurgickými nůžkami vytvořena kruhová excizní rána o průměru 2 cm (obr. 1, 2). Po vyfotografování s milimetrovým pravítkem byl potkan uložen do boxu vystlaného filtračním papírem. Hojení bylo sledováno a fotograficky dokumentováno až do desátého dne. Po deseti dnech byla zahnutými chirurgickými nůžkami rána s okolní kůží vystřižena a pomocí pinzety přesunuta do lahvičky s 4 % formaldehydem.



Obr. 1: ZDF potkan s kruhovou ránou.

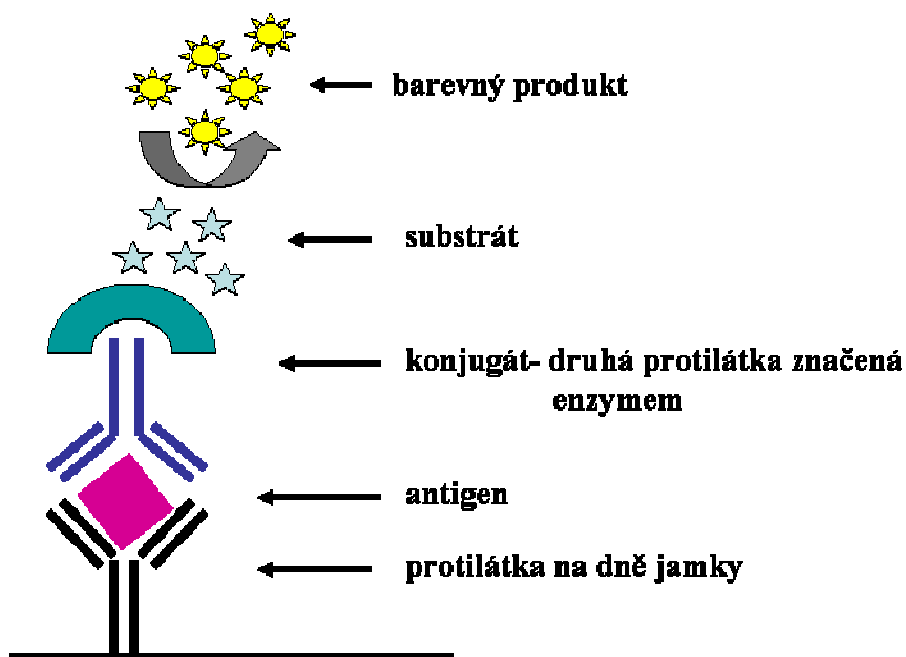


Obr. 2: Kruhová rána o průměru 2 cm.

2.3 STANOVENÍ PROTEINŮ V PLAZMĚ METODOU ELISA

ELISA je metoda, která pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožní stanovit koncentraci antigenu ve vyšetřovaném vzorku. Rozděluje se na heterogenní nekompetitivní (tzv. sandwich) a heterogenní kompetitivní.

Praktický princip je takový, že na stěny jamek mikrotitrační destičky je navázána protilátka proti vyšetřovanému antigenu. V našem případě se jednalo o inzulín, leptin, PAI-1, IL-6 a fibrinogen. Do jamky se přidá naředěný roztok obsahující antigen a inkubuje se určitou dobu. Poté se nenavázané složky odmyjí a přidá se tzv. druhá protilátka s navázaným enzymem (konjugát). Po další inkubaci a promytí se přidá substrát, který je štěpen enzymem navázaným na druhou protilátku a dojde ke vzniku barevného produktu (obr. 3). Vzniklá barevná reakce se měří fotometricky. Podrobný návod bývá součástí ELISA kitu. Výhodou metody ELISA je dostatečná citlivost, specifčnost a reprodukovatelnost.



Obr. 3: Schéma metody ELISA.

Postup stanovení inzulínu metodou ELISA

Příprava reagensí:

- 11 x naředit enzymový konjugát
- 10 x naředit plazmu diabetických potkanů
- 20 x naředit promývací roztok

Do každé jamky byl přidán:

- kalibrační roztok nebo vzorek
- konjugát (protilátka značená peroxidázou HRP)
- inkubace 2 h ve tmě při pokojové teplotě za stálého třepání
- promytí promývacím roztokem
- substrát
- inkubace 15 min ve tmě při pokojové teplotě
- stop roztok
- proměření absorbance při 450 nm

Podrobný návod přikládá výrobce k ELISA kitu.

Postup stanovení PAI-1 metodou ELISA

Příprava reagensí:

- 2 x naředit plazmu diabetických i kontrolních potkanů
- 20 x naředit promývací roztok

Do každé jamky byl přidán:

- kalibrační roztok nebo vzorek
- konjugát (protilátka značená peroxidázou HRP)
- inkubace 2 h ve tmě při pokojové teplotě
- promytí promývacím roztokem
- substrát
- inkubace 5 min ve tmě při pokojové teplotě
- stop roztok
- proměření absorbance při 450 nm

Podrobný návod přikládá výrobce k ELISA kitu.

Postup stanovení leptinu metodou ELISA

Příprava reagensí:

- 20 x naředit plazmu diabetických potkanů
- 5 x naředit plazmu kontrolních potkanů
- 10 x naředit promývací roztok
- 10 x naředit biotinem značenou protilátku

Do každé jamky byl přidán:

- kalibrační roztok nebo vzorek
- inkubace 1 h ve tmě při pokojové teplotě a za stálého třepání
- promytí promývacím roztokem
- biotinem značená protilátka
- inkubace 1 h ve tmě při pokojové teplotě a za stálého třepání
- promytí promývacím roztokem
- streptavidin- HRP konjugát
- inkubace 30 min ve tmě při pokojové teplotě a za stálého třepání
- promytí promývacím roztokem
- substrát
- inkubace 10 min
- stop roztok
- proměření absorbance při 450 nm

Podrobný návod přikládá výrobce k ELISA kitu.

Postup stanovení fibrinogenu metodou ELISA

Příprava reagensí:

- 10 x ředící roztok
- 6400 x naředit plazmu diabetických a kontrolních potkanů
- 10 x naředit promývací roztok
- 100 x naředit biotinem značenou protilátku
- 100 x naředit streptavidin - peroxidáza konjugát

Do každé jamky byl přidán:

- kalibrační roztok nebo vzorek
- inkubace 2 h ve tmě při pokojové teplotě
- promytí promývacím roztokem
- biotinem značená protilátka
- inkubace 1 h ve tmě při pokojové teplotě
- promytí promývacím roztokem
- streptavidin - peroxidáza konjugát
- inkubace 30 min ve tmě při pokojové teplotě
- promytí promývacím roztokem
- substrát
- inkubace 10 min
- stop roztok
- proměření absorbance při 450 nm

Podrobný návod přikládá výrobce k ELISA kitu.

Postup stanovení IL-6 metodou ELISA

Příprava reagensí:

- 2 x naředit plazmu diabetických a kontrolních potkanů
- 25 x naředit promývací roztok
- 100 x naředit streptavidin- HRP konjugát

Do každé jamky byl přidán:

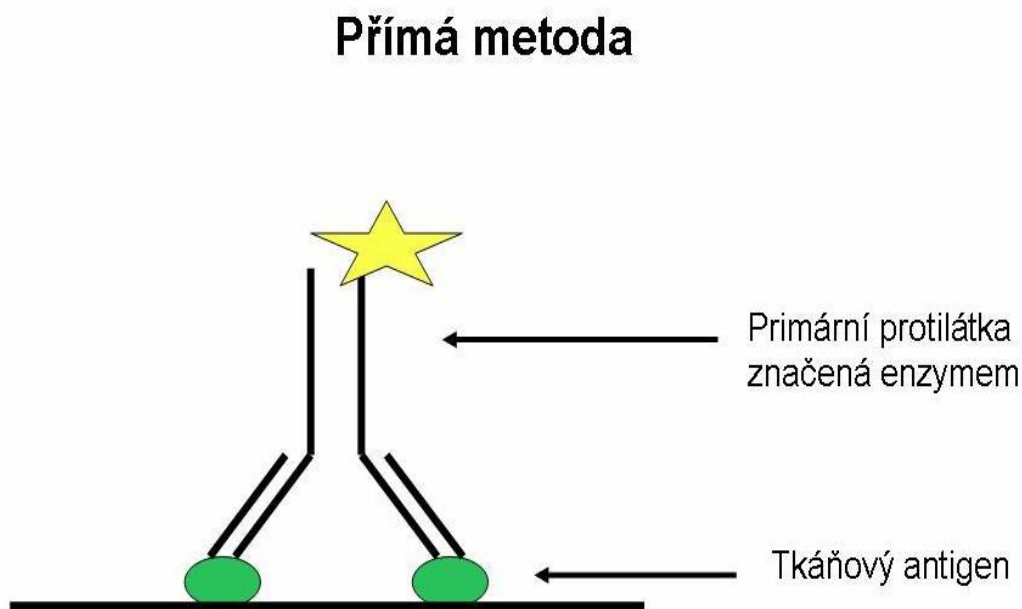
- kalibrační roztok nebo vzorek
- inkubace 2 h ve tmě při 37 °C
- promytí promývacím roztokem
- biotinem značená protilátka (kromě jamky obsahující blank)
- inkubace 1 h ve tmě při pokojové teplotě
- promytí promývacím roztokem
- streptavidin – HRP konjugát (kromě jamky obsahující blank)
- inkubace 30 min ve tmě při pokojové teplotě
- promytí promývacím roztokem
- chromogen
- inkubace 30 min ve tmě při pokojové teplotě
- stop roztok
- proměření absorbance při 450 nm

Podrobný návod přikládá výrobce k ELISA kitu.

2.4 IMUNOHISTOCHEMIE

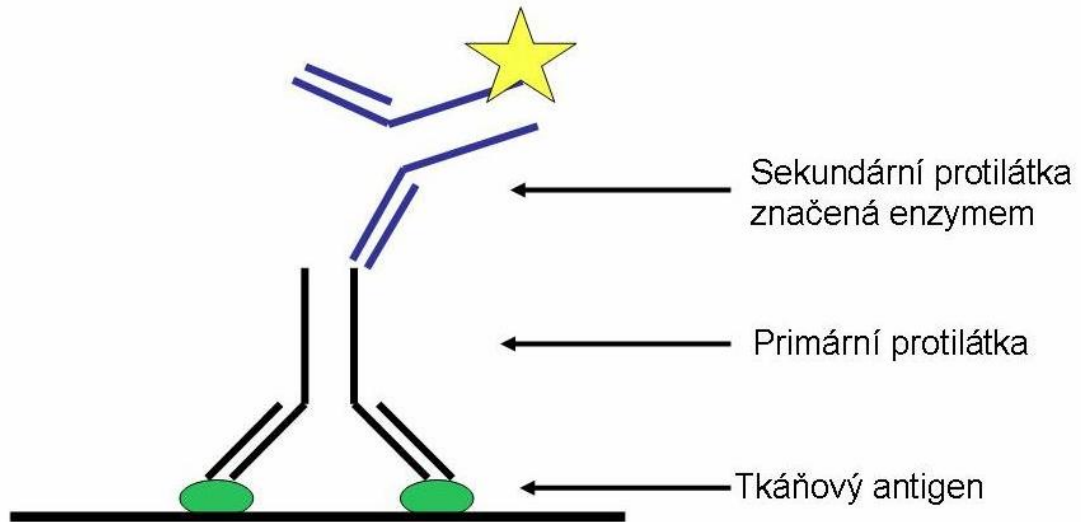
Cílem imunohistochemie je detekce konkrétního antigenu v buňkách a tkáních pomocí specifických protilátek. Metoda je založena na principu vazby antigenu a protilátky. Můžou být použity jak monoklonální, tak polyklonální protilátky. Polyklonální protilátky jsou tvořeny skupinou imunoglobulinů, které reagují s mnoha epitopy na jednom konkrétním antigenu. Většinou se jedná o sérum imunizovaného zvířete. Mají vysokou senzitivitu, ale nízkou specifitu. Monoklonální protilátky jsou tvořeny kopiemi jednoho klonu. Vyznačují se vysokou specifitou, ale nízkou senzitivitou.

Imunohistochemické stanovení se dělí na přímé (obr. 4) a nepřímé (obr. 5). U přímé metody je specifická protilátka, která reaguje s antigenem, označena enzymem. Nepřímá metoda je rozdělena do dvou kroků. V prvním reaguje primární protilátka s antigenem. Poté se použije značená sekundární protilátka, která reaguje s Fc fragmentem primární protilátky. Častěji se používá metoda nepřímá.



Obr. 4: Schématické znázornění přímé metody.

Nepřímá metoda



Obr. 5: Schématické znázornění nepřímé metody.

2.4.1 FIXACE TKÁNÍ

Fixace umožňuje uchovat vzhled analyzované tkáně. Běžně používané fixativum je 4 % roztok formaldehydu.

2.4.2 ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ

Běžně se používá zalití do parafinových bločků. Struktury některých protilátek nebo antigenů jsou však tak citlivé, že tento způsob není možný. V takovém případě se používají tkáně zmrazené, například v kapalném N₂.

2.4.3 DEMASKOVÁNÍ EPITOPŮ

Během zpracování tkání a fixace může docházet k zablokování antigenních epitopů. To může vést k falešně negativním výsledkům. K demaskování epitopů lze použít proteolytické enzymy nebo teplem indukované demaskování antigenních epitopů (HIAR- heat induced antigen recovery) v mikrovlnné troubě.

2.4.4 BLOKOVÁNÍ ENDOGENNÍ PEROXIDÁZY

Sekundární protilátky bývají značeny enzymem alkalickou fosfatázou nebo peroxidázou. Reakce enzymu se substrátem vede ke vzniku barevného produktu. Takovým způsobem dochází k detekci sledovaného antigenu. Řada buněk má vlastní endogenní aktivitu výše uvedených enzymů, což je nevýhodou tohoto značení. Může docházet k falešně pozitivním výsledkům. Proto musí být endogenní enzymatická aktivita blokována. V našem případě byl použit 3 % vodní roztok peroxidu vodíku.

2.4.5 BLOKOVÁNÍ POZADÍ

Kromě specifické interakce může mnoho primárních protilátek reagovat s buňkami a tkáněmi nespecificky. To vede k falešně pozitivním výsledkům. Důvodem jsou hydrofobní nebo iontové interakce. K zabránění takových interakcí je nutná blokáce. Jako blokační činidlo bylo použito 5 % neimunní sérum.

2.4.6 ŘEDĚNÍ PRIMÁRNÍ PROTILÁTKY

Pro správné provedení imunohistochemické reakce je důležité dobře naředit primární protilátku. V některých případech správné ředění doporučuje výrobce. Jindy musí být vyzkoušeno několik ředění a nakonec zvoleno to správné. Při vysoké koncentraci protilátky dochází ke zvýšení nespecifického signálu pozadí, ovšem při příliš nízké koncentraci je reakce antigen-protilátka špatně detekovatelná.

Bylo vyzkoušeno ředění 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:500, 1:1000 a 1:2000.
Nakonec bylo použito 1:100 pro PAI-1, 1:400 pro IL-6 a 1:500 pro FBG.

dest. H₂O.....2 min
dobarvení jader hematoxylinem.....5 min
tekoucí H₂O.....10min

odvodnění:

inkubace vzorku v:

75 % ethanol.....10 min
80 % ethanol.....10 min
96 % ethanol.....10 min
100 % ethanol.....10 min
xylen.....3 x 10 min

monitorování

mikroskop: Nikon eclipse 80i

snímací zařízení: Nikon DS-Fi1

program: Nis – Elements AR 3.0

ovladač snímacího zařízení: Nikon DS-U2/L2 USB, verze 5.03

nastavení kamery: kontrast – vysoký

vyvážení bílé

autoexpozice

rozlišení: rychlé (Fokus) 1280 x 960

kvalitní (snímání) 2560 x 1920 (5 MPix)

Při mikroskopování a zhotovování barevných fotek bylo použito převážně zvětšení 4x, 20x a 60x.

Pufry

PBS pufr

NaCl.....9,0 g

KH₂PO₄.....0,144 g

Na₂HPO₄·2H₂O.....0,528 g

rozpustíme v destilované vodě, doplníme do 1 litru a upravíme pH na 7,4

Citrátový pufr

roztok A: 0,63 g kyseliny citrónové rozpustit ve 30 ml destilované vody

roztok B: 1,32 g citrátu sodného rozpustit ve 45 ml destilované vody

V čase potřeby smícháme 9 ml roztoku A + 41 ml roztoku B + 450 ml destilované vody, upravíme pH na 6,0.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V první části experimentu bylo použito dvanáct ZDF potkanů, kterým byla od osmého týdne života podávána speciální strava s vysokým obsahem tuků. Potkani byli rozděleni do čtyř skupin po třech: kontrolní samci, diabetičtí samci, kontrolní samice a diabetické samice. Jednou za dva týdny byli zváženi, byla jim odebrána krev (ve spolupráci s paní laborantkou Ježkovou) a změřena glykémie, až do věku dvacet dva týdnů. Poté byl z naměřených hodnot stanoven časový vývoj hmotností a glykemií a z odebraných vzorků stanoveny časové závislosti inzulínu, leptinu a PAI-1.

V druhé části experimentu byly opět vytvořeny čtyři skupiny potkanů (kontrolní samci, diabetičtí samci, kontrolní samice a diabetické samice); každá skupina byla tvořena jedenácti zvířaty starými dvacet dva týdnů. Byla jim odebrána krev, změřena glykémie a vytvořena excizní kruhová rána. Hojení rány, které bylo sledováno až do desátého dne, bylo fotograficky dokumentováno. Velikosti plochy ran byly zpracovány v programu ImageJ. Tato část experimentu probíhala ve spolupráci s Ing. Slavkovským.

V desátém dni byla granulační tkáň odebrána, fixována ve 4 % formaldehydu, zalita do parafínových bločků a nakrájena na tloušťku 6 μm na ústavu histologie paní laborantkou Hollerovou.

Ze vzorků krve dospělých potkanů, odebrané těsně před vytvořením excizní rány, byly metodou ELISA stanoveny průměrné plazmatické hladiny inzulínu, leptinu, PAI-1, fibrinogen a IL-6.

V histologických řezech byl detekován IL-6, PAI-1 a fibrinogen imunohistochemickou metodou. Byly hodnoceny rozdíly v množství a lokalizaci uvedených proteinů u kontrolních a diabetických potkanů.

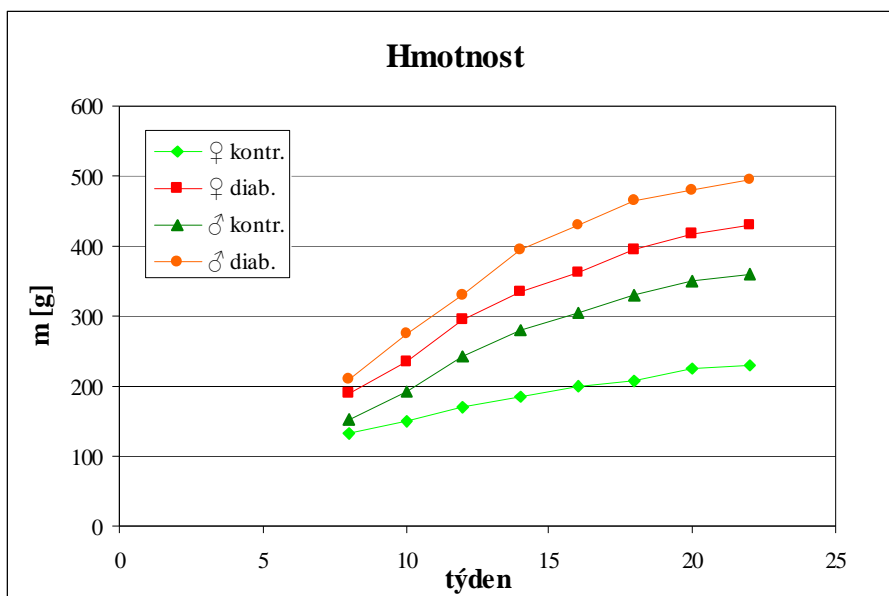
4. VÝSLEDKY

4.1 HMOTNOST, GLYKÉMIE A PLAZMATICKÉ HLADINY VYBRANÝCH PROTEINŮ

4.1.1 SLEDOVÁNÍ ČASOVÝCH ZMĚN

Hmotnost

Graf č. 1 znázorňuje postupné narůstání hmotnosti v závislosti na věku. Je vidět velký rozdíl hmotností mezi kontrolními a diabetickými zvířaty. Dospělé diabetické samice dosahují hmotnosti až 400 gramů, což je dvojnásobek váhy kontrolních samic. U samců není rozdíl tak výrazný. Diabetičtí váží kolem 500 g a kontrolní kolem 350 g.

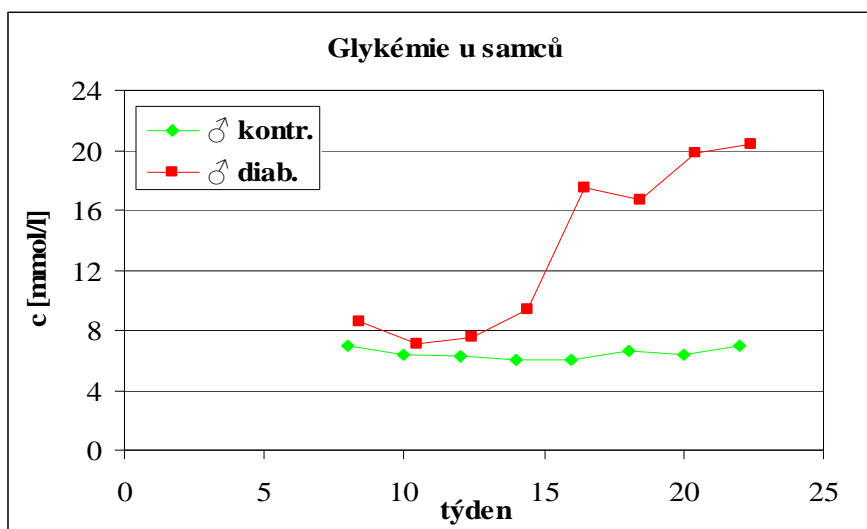


Graf 1. Sledování vývoje hmotnosti v závislosti na věku, n= 3.

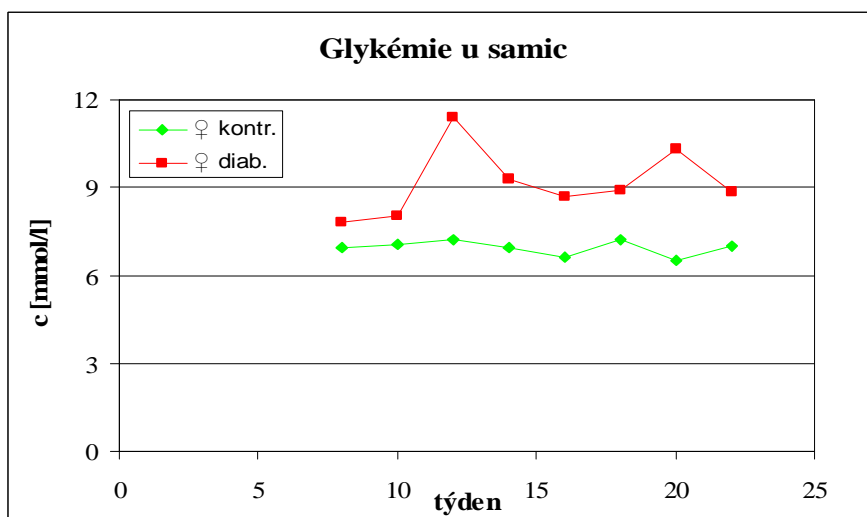
Glykémie

Na grafu č. 2 můžeme vidět postupné zvyšování hladiny glykémie u diabetických samců až do hodnoty 20 mmol/l. Od tohoto bodu zůstává hladina zvýšená. U kontrolních samců se hladina glykémie pohybuje stále kolem hodnot 6,5 mmol/l.

U závislosti glykémie na věku u samic (graf č. 3) nevidíme tak výrazný rozdíl mezi diabetickými a kontrolními zvířaty, jako u glykémie samců. U diabetických samic nedochází k výraznému zvýšení hladiny glukózy, její koncentrace kolísá kolem 11 mmol/l.



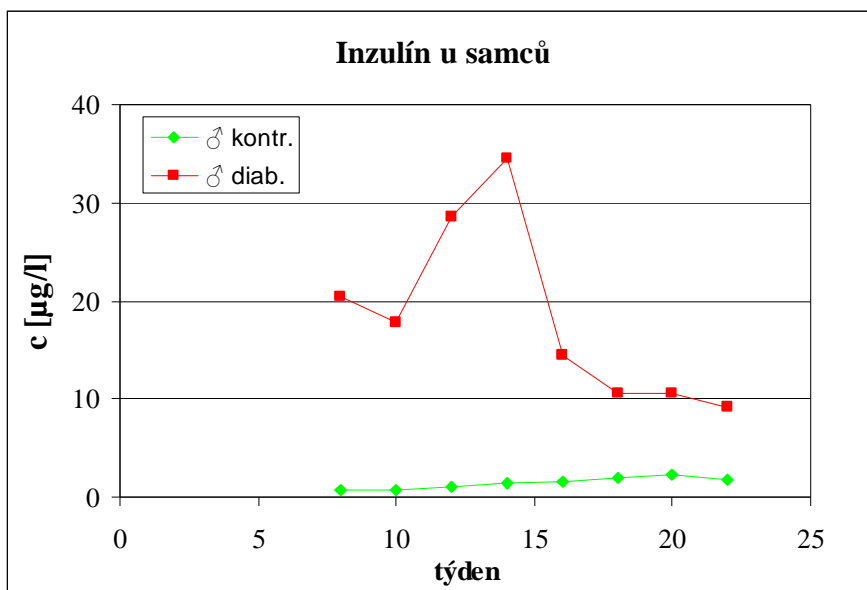
Graf 2. Průběh glykémie v závislosti na věku u samců, n= 3.



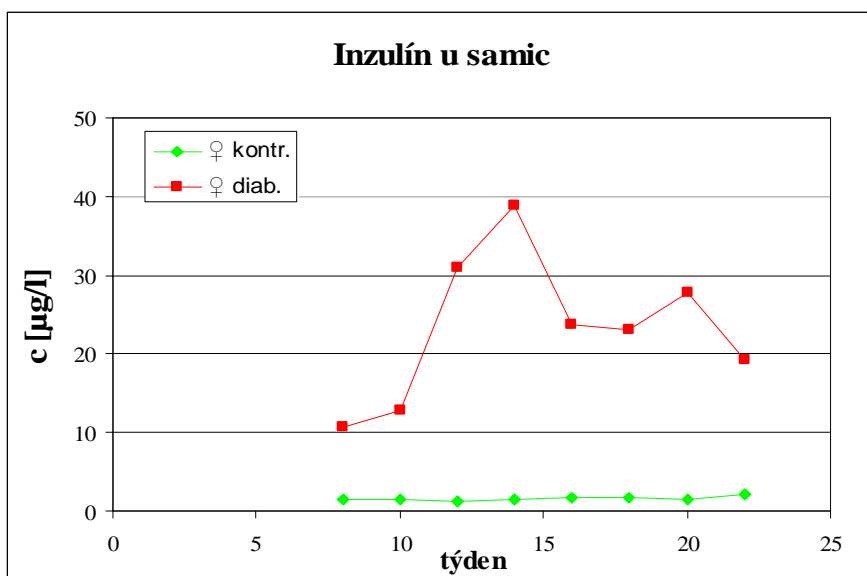
Graf 3. Průběh glykémie v závislosti na věku u samic, n= 3.

Inzulín

Kinetika inzulínu u samců je znázorněna na grafu č. 4. Hladiny inzulínu u diabetických samců se postupně zvyšují, až dosáhnou určité mezní hodnoty, od které začnou klesat. U diabetických samic také narůstá hladina inzulínu až do mezní hodnoty (graf č. 5), která je vyšší než u diabetických samců, a pak také začne postupně klesat. U kontrolních zvířat se koncentrace inzulínu pohybuje kolem 1 až 2 $\mu\text{g/l}$.



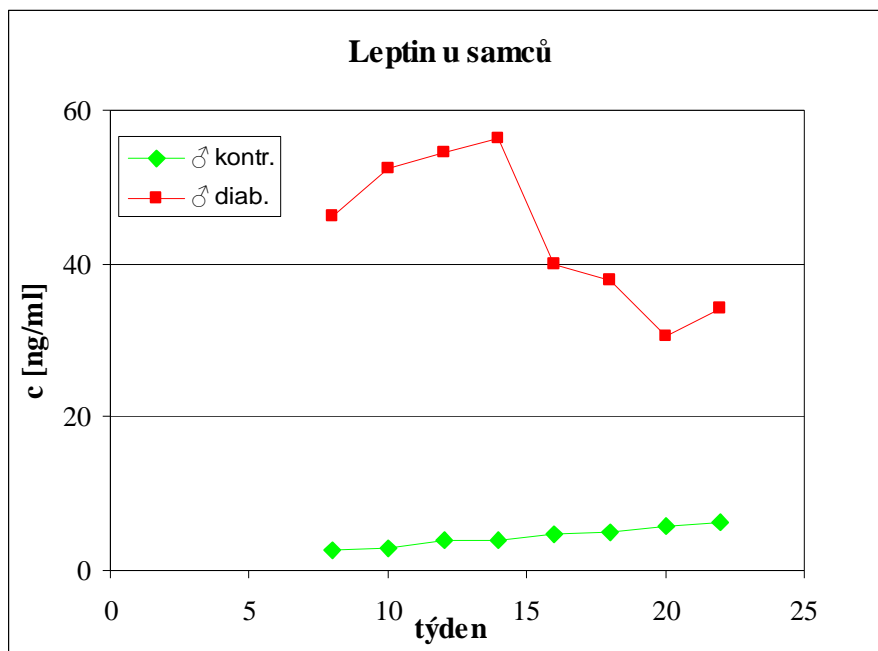
Graf 4. Plazmatické koncentrace inzulínu v závislosti na věku u samců, n= 3.



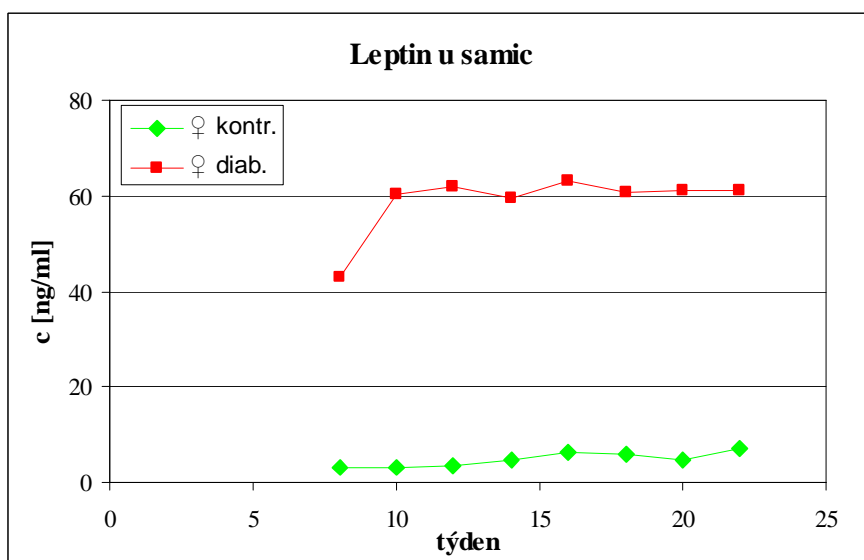
Graf 5. Plazmatické koncentrace inzulínu v závislosti na věku u samic, n= 3.

Leptin

U diabetických samců se hladina leptinu zvýší až na 57 ng/ml a poté klesá k hodnotám kolem 30 ng/ml (graf č. 6). U diabetických samic dojde také ke zvýšení koncentrace leptinu na 61 ng/ml, která zůstává stále na stejné hladině (graf č. 7). U kontrolních zvířat se koncentrace leptinu má tendenci s věkem zvyšovat.



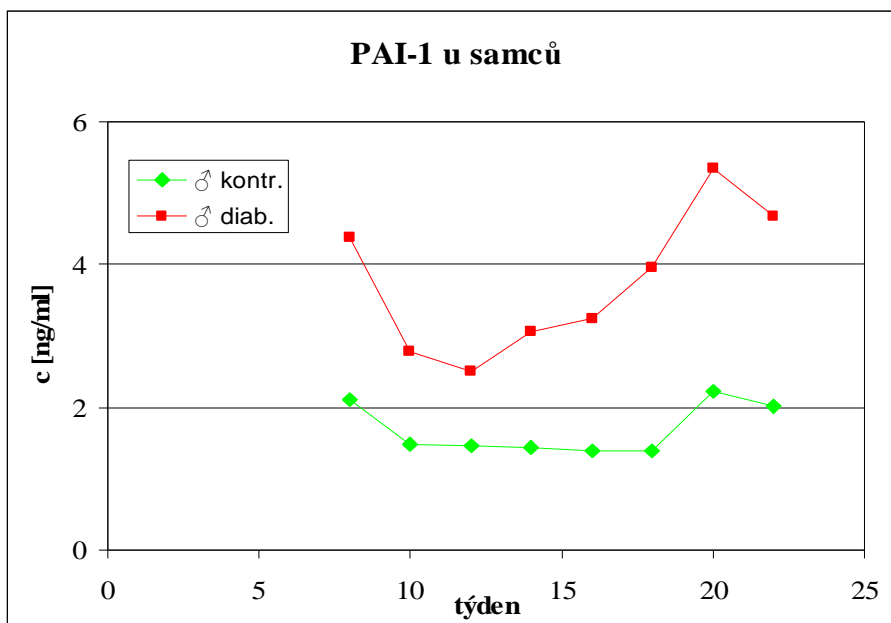
Graf 6. Plazmatické koncentrace leptinu v závislosti na věku u samců, n= 3.



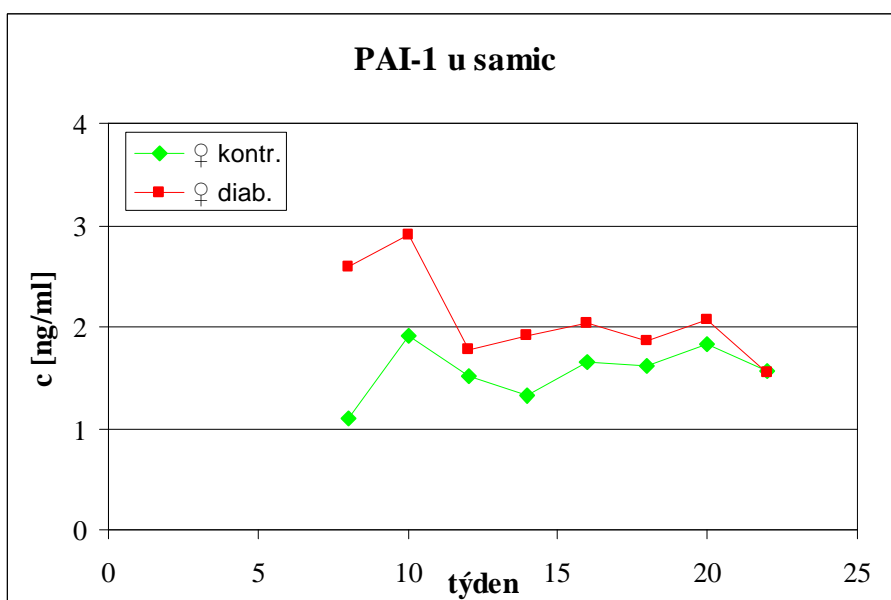
Graf 7. Plazmatické koncentrace leptinu v závislosti na věku u samic, n= 3.

PAI-1

Koncentrace PAI-1 u diabetických samců je zvýšená a má tendenci ke zvyšování rozdílu mezi hladinami diabetických a kontrolních samců (graf č. 8). U diabetických samic je koncentrace zvýšená a má tendenci ke snižování rozdílu mezi hladinami diabetických a kontrolních samic (graf č. 9).



Graf 8. Plazmatické koncentrace PAI-1 v závislosti na věku u samců, n= 3.



Graf 9. Plazmatické koncentrace PAI-1 v závislosti na věku u samic, n= 3.

4.1.2 PRŮMĚRNÉ HLADINY V PLAZMĚ

Glukóza

V grafu č. 10 lze vidět velké rozdíly v hladinách glukózy mezi kontrolními a diabetickými zvířaty obojího pohlaví. Přičemž u diabetických samců je průměrná hladina glukózy téměř trojnásobná oproti kontrolám. U samic je rozdíl poněkud menší.

Inzulín

Graf č. 11 znázorňuje průměrné hladiny inzulínu. Průměrná koncentrace u diabetických samců je pětkrát vyšší než hladina u kontrolních samců. Průměrná hladina u diabetických samic je asi devětkrát vyšší oproti kontrolním samicím.

Leptin

Průměrné hladiny leptinu jsou výrazně zvýšeny u diabetických potkanů (graf č. 12). U diabetických samců sedmkrát oproti kontrolním samcům a u diabetických samic až sedmnáctkrát oproti kontrolním samicím.

PAI-1

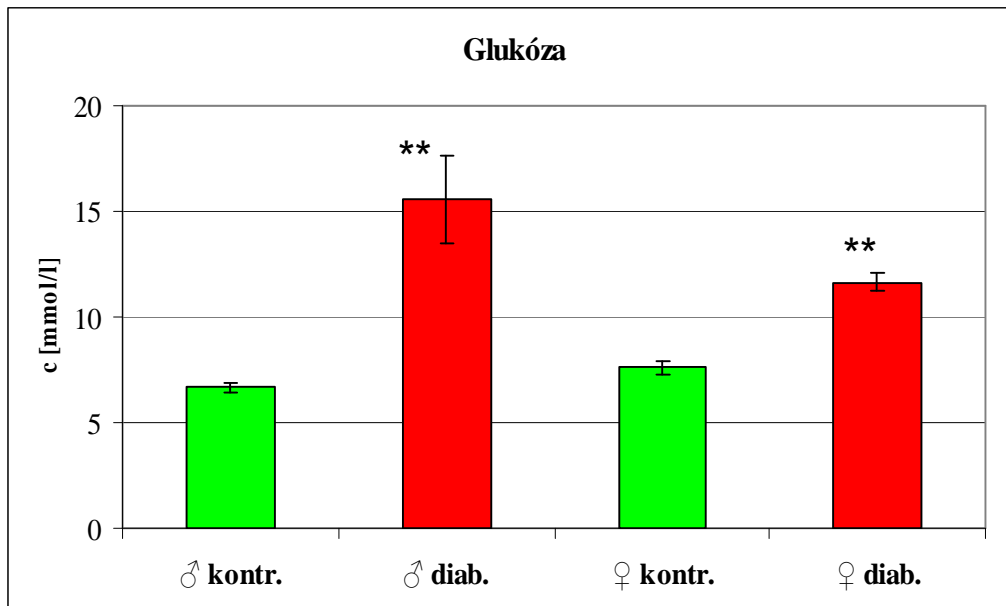
V grafu č. 13 jsou hladiny průměrných koncentrací u diabetických potkanů zvýšeny. U diabetických samců dvojnásobně oproti kontrolním samcům a u diabetických samic trojnásobně oproti kontrolním samicím.

Fibrinogen

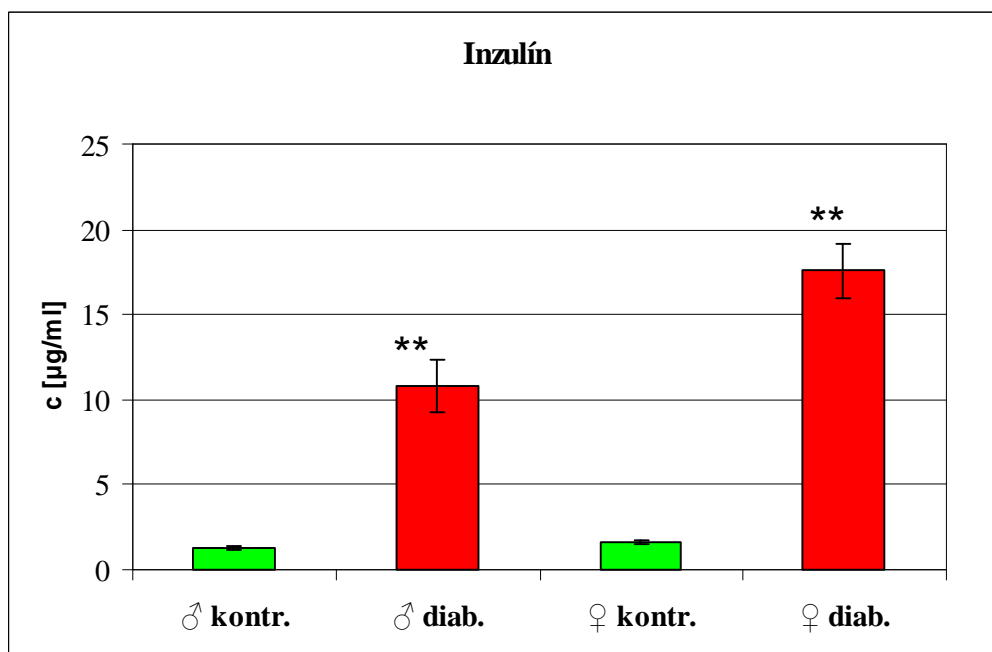
Graf č. 14 znázorňuje průměrné hladiny fibrinogenu. U kontrolních a diabetických samců jsou hladiny téměř stejné. Pouze u diabetických samic je koncentrace fibrinogenu mírně zvýšena.

IL-6

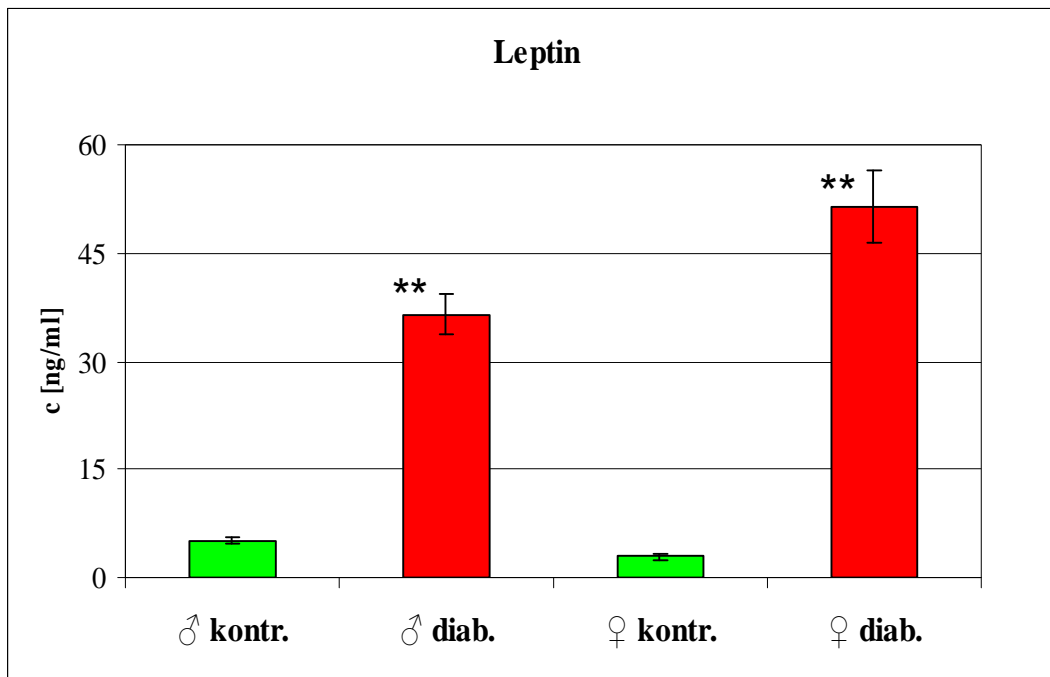
Průměrné koncentrace IL-6 jsou znázorněny v grafu č. 15. Naměřené hodnoty neprokázaly žádný rozdíl mezi průměrnými koncentracemi u diabetických a kontrolních zvířat.



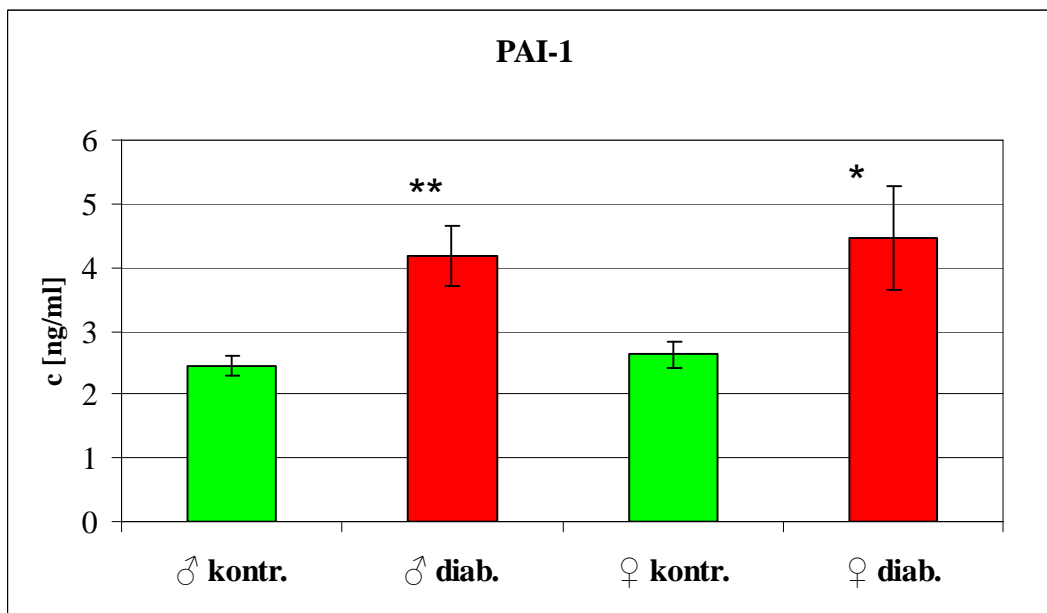
Graf 10. Průměrné hladiny glukózy ± SEM u potkanů ZDF ve věku 22 týdnů, n= 11.



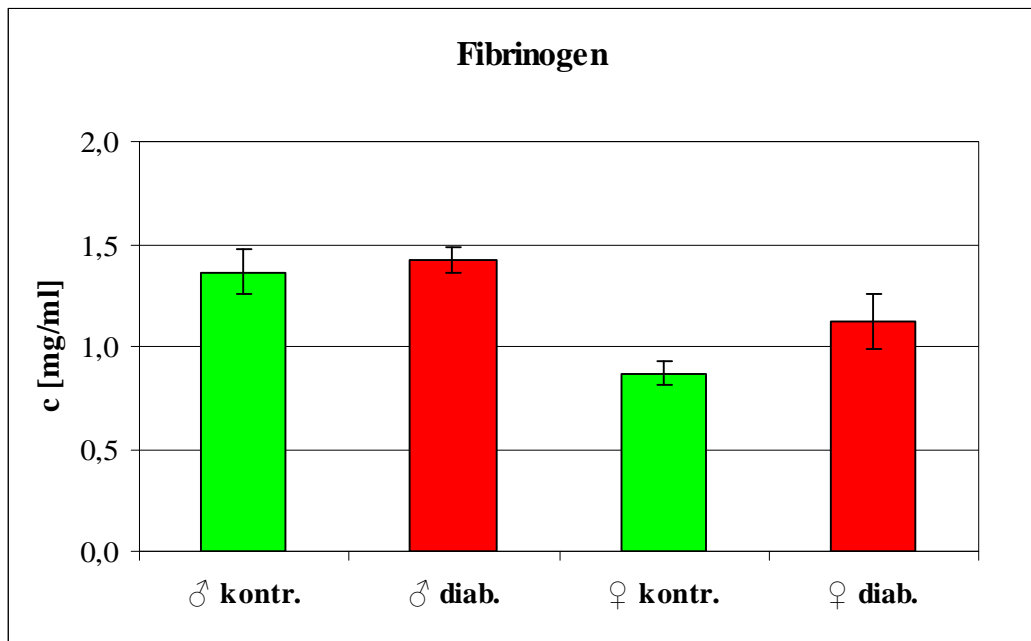
Graf 11. Průměrné plazmatické hladiny inzulínu ± SEM u potkanů ZDF ve věku 22 týdnů, n= 11.



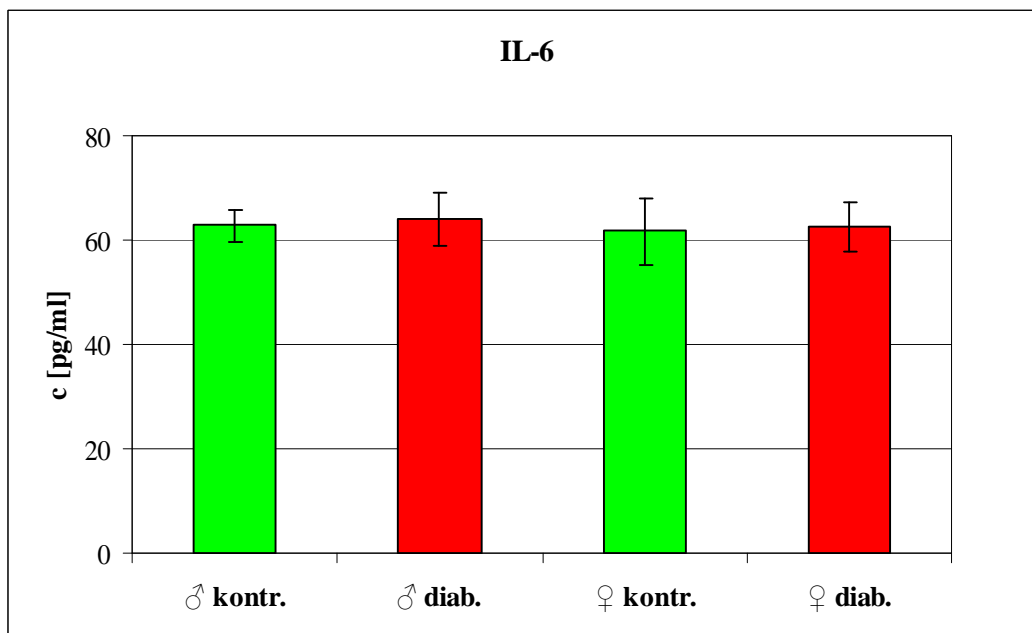
Graf 12. Průměrné plazmatické hladiny leptinu ± SEM u potkanů ZDF ve věku 22 týdnů, n= 11.



Graf 13. Průměrné plazmatické hladiny PAI-1 ± SEM u potkanů ZDF ve věku 22 týdnů, n= 11.



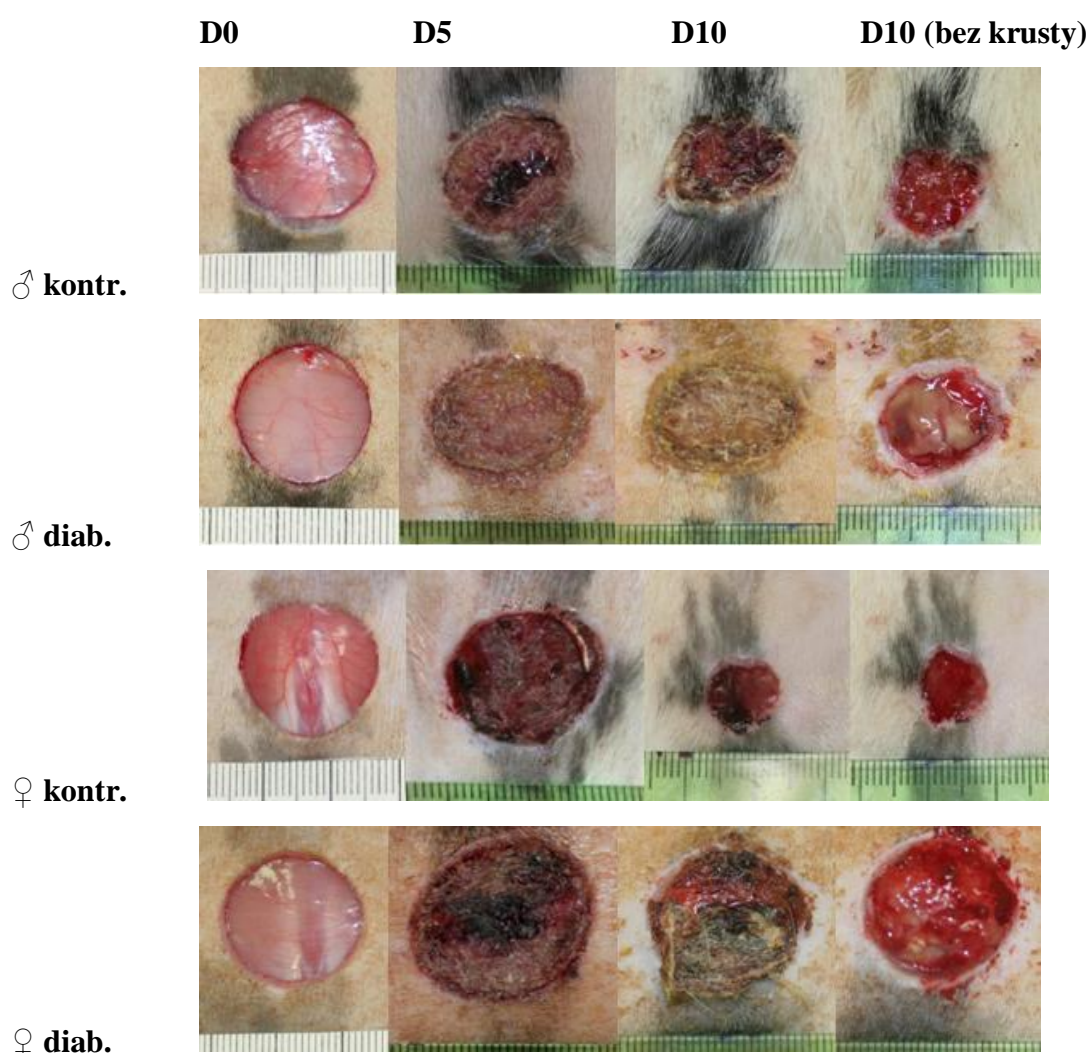
Graf 14. Průměrné plazmatické hladiny fibrinogenu \pm SEM u potkanů ZDF ve věku 22 týdnů, n= 5.



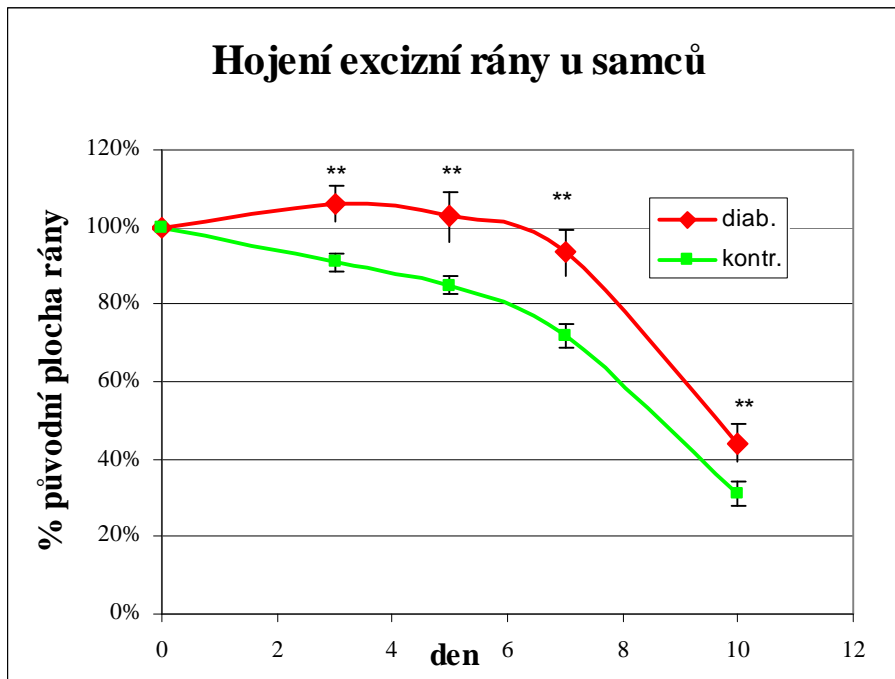
Graf 15. Průměrné plazmatické hladiny IL-6 \pm SEM u potkanů ZDF ve věku 22 týdnů, n= 11.

4.2 HOJENÍ RAN

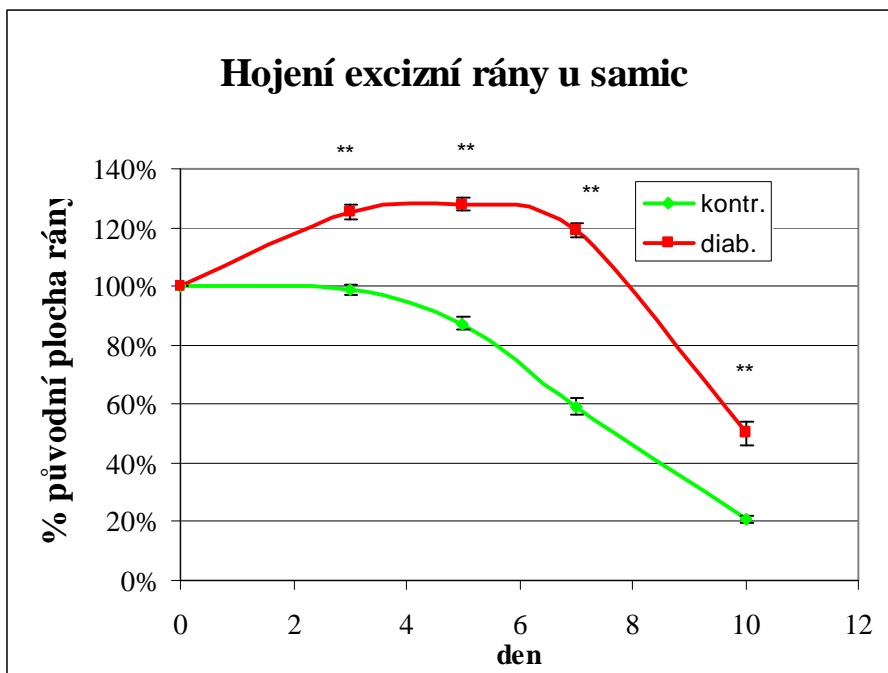
Na obr. 6 je znázorněn vzhled ran diabetických a kontrolních zvířat obojího pohlaví. Po vytvoření se rána u diabetických potkanů nejdříve zvětší. U diabetických samic až na 130 %, což je patrné z grafu č. 17. Diabetické rány se kontrahují méně než rány kontrolní a hojení je doprovázeno tvorbou hnisu. V desátém dni je rána u diabetických zvířat větší. To je vidět hlavně u diabetických samic, kdy plocha rány desátý den je dvakrát větší než rána u kontrolních samic.



Obr. 6: Fotografie ran těsně po vytvoření rány (D0), v pátém (D5), v desátém dni (D10) a v D10 po mechanickém odstranění krusty.



Graf 16. Hojení excizní rány u samců, zobrazen průměr ± SEM, n= 10.



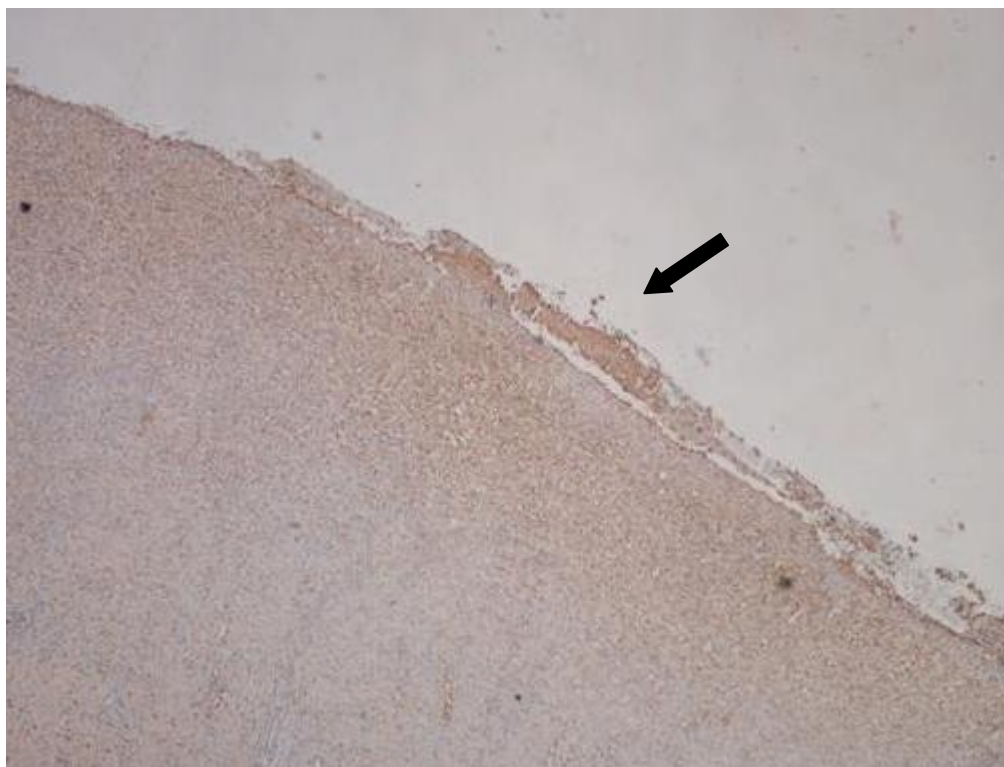
Graf 17. Hojení excizní rány u samic, zobrazen průměr ± SEM, n= 10.

4.3 IMUNOHISTOCHEMIE

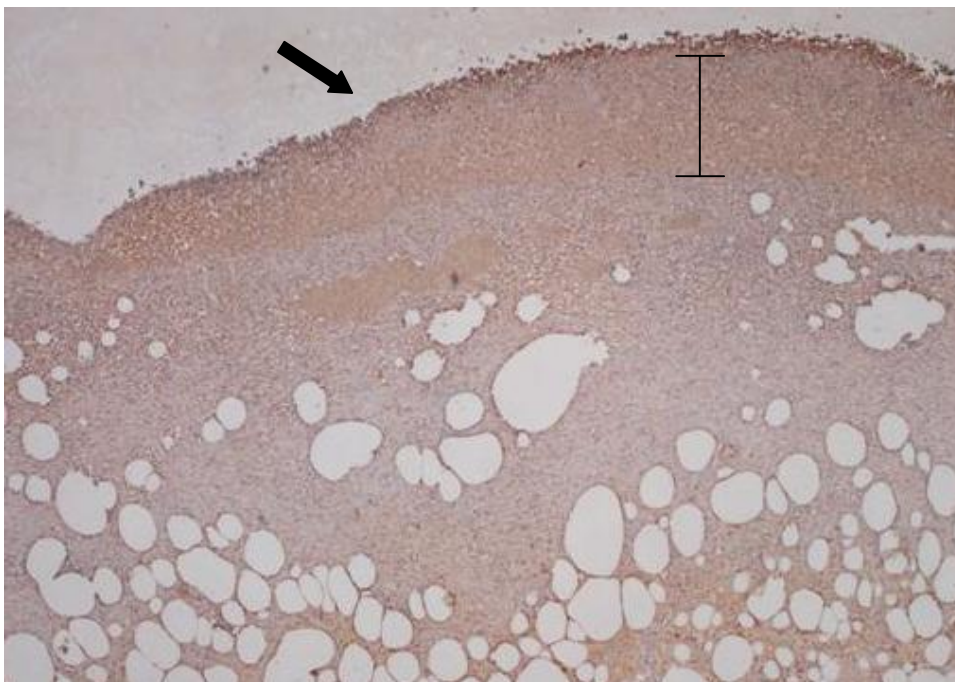
Imunohistochemickou metodou byly detekovány tři antigeny v granulační tkáni odebrané deset dní po poranění. Jednalo se o IL-6, PAI-1 a fibrinogen. Byly hodnoceny rozdíly v jejich množství a lokalizaci u kontrolních a diabetických potkanů.

IL-6

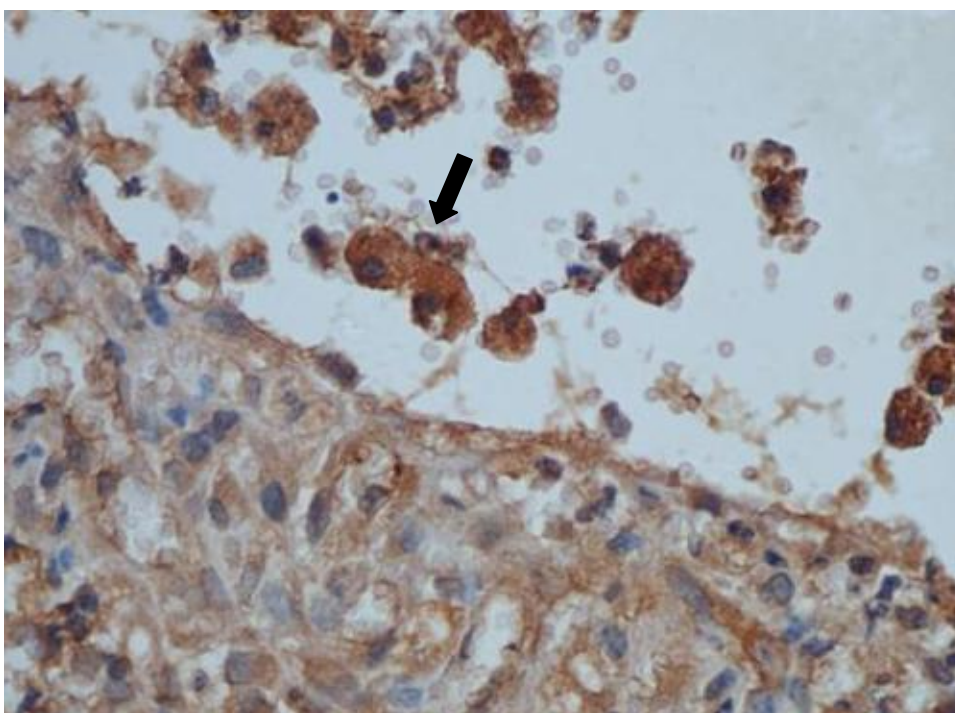
Prozánětlivý protein IL-6 byl detekován především v hnisu na povrchu rány. Jeho množství bylo několikanásobně větší v diabetických ranách než v kontrolních ranách. Na obr. 7 je vidět rána kontrolního zvířete s tenkou vrstvou hnisu obsahující IL-6. Mnohonásobně větší vrstva hnisu s IL-6, která je typická pro diabetické rány, je vidět na obr. 8. Dále byl IL-6 detekován v okolí tukových buněk (obr. 10), v kapilárách (obr. 11) a slabý signál byl také u fibroblastů (obr. 12).



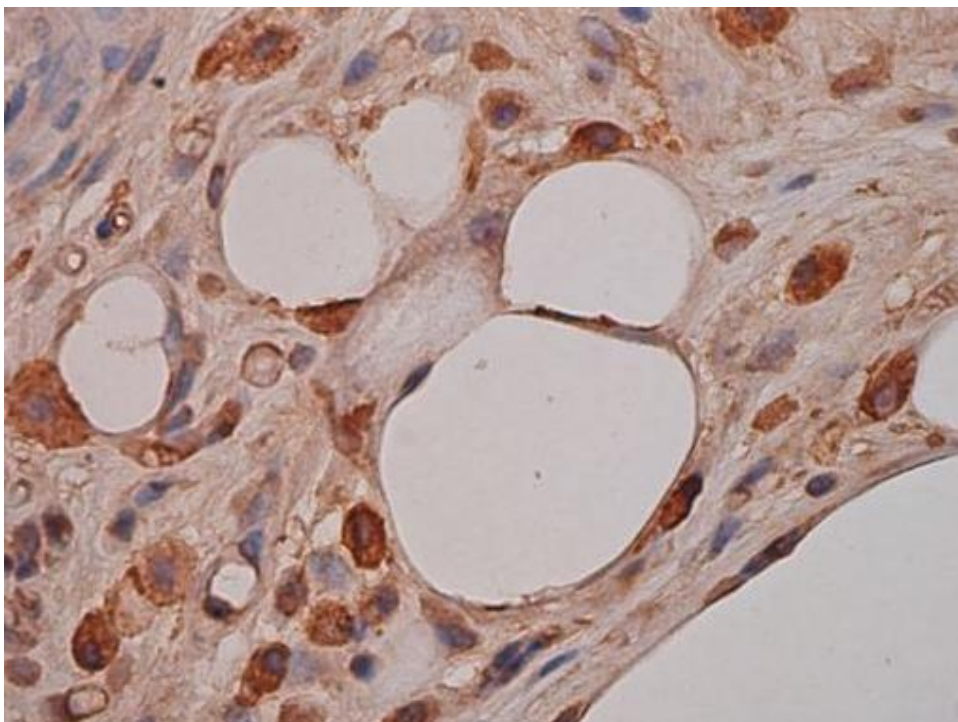
Obr. 7: IL-6 v tenké vrstvě hnisu na povrchu kontrolní rány. Zvětšeno 4x.



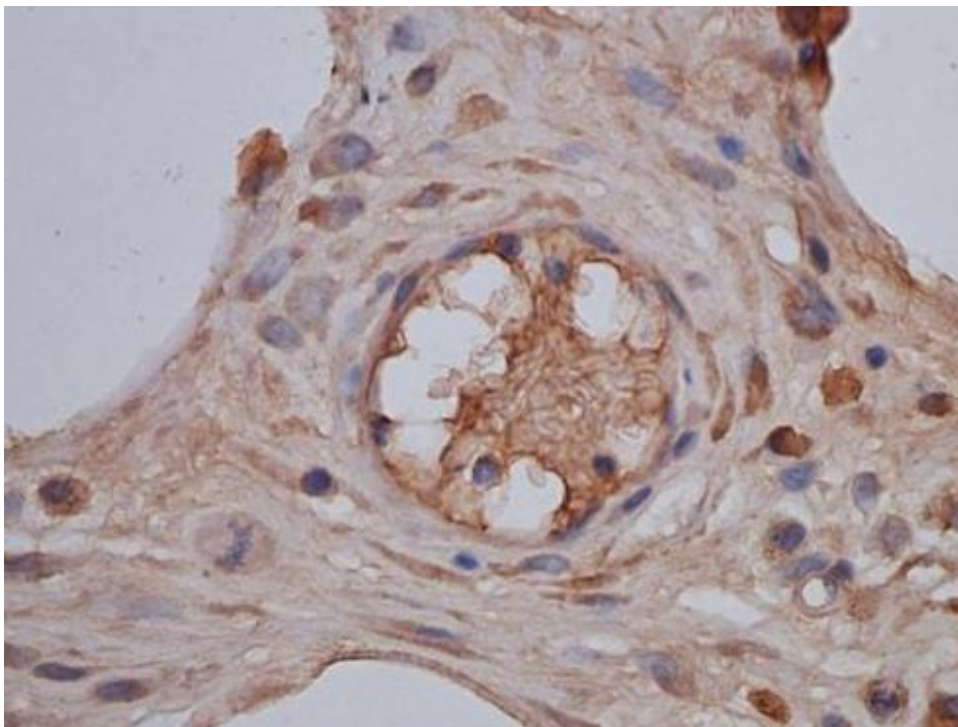
Obr. 8: IL-6 ve velké vrstvě hnisu na povrchu diabetické rány. Zvětšeno 4x.



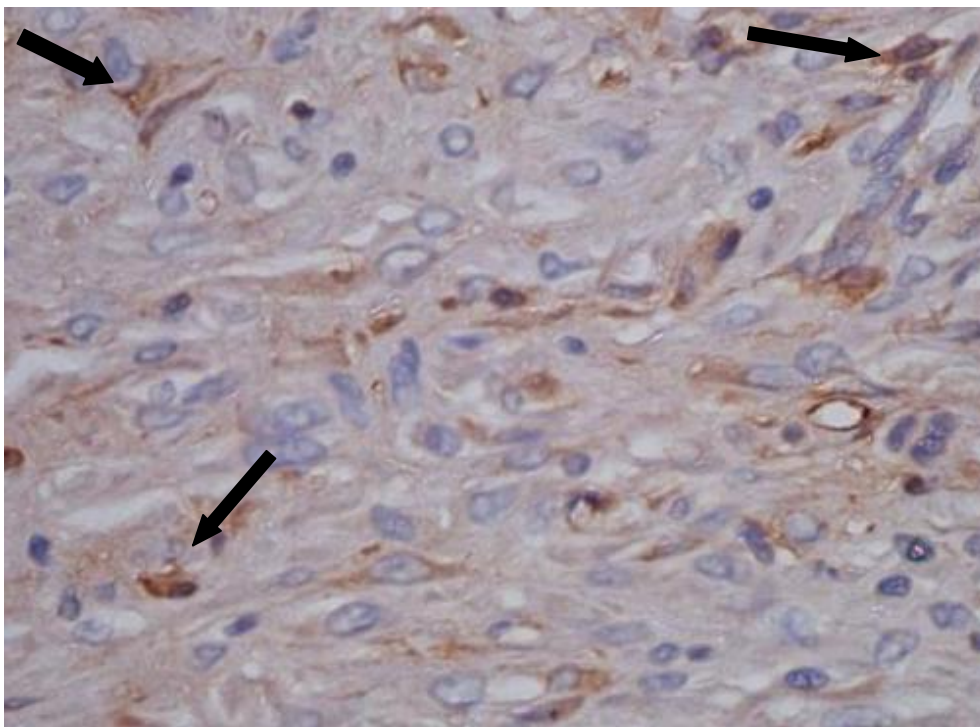
Obr. 9: Makrofágy na povrchu diabetických ran. Zvětšeno 60x.



Obr. 10: IL-6 v okolí tukových buněk. Zvětšeno 60x.



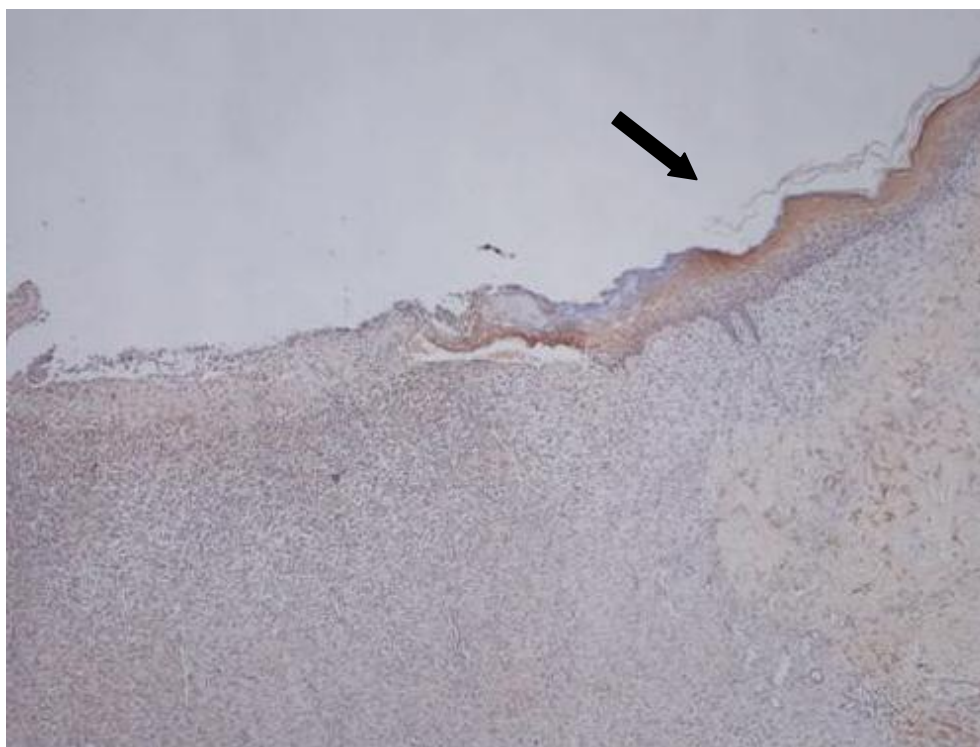
Obr. 11: Kapilára pozitivní na IL-6. Zvětšení 60x.



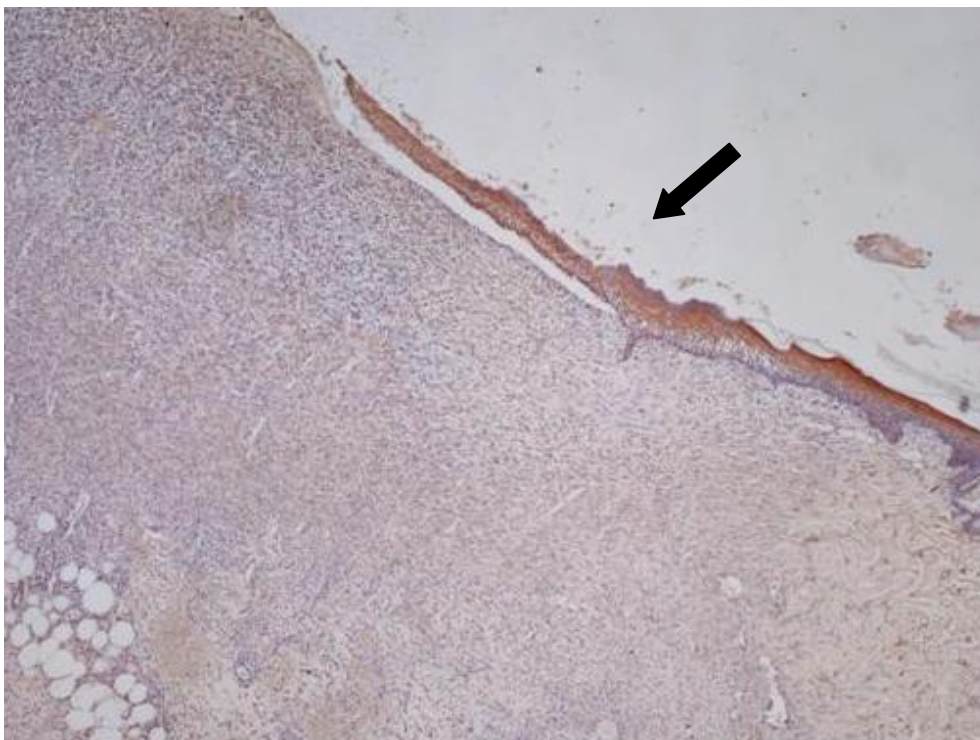
Obr. 12: Fibroblasty slabě pozitivní na IL-6. Zvětšeno 60x.

PAI-1

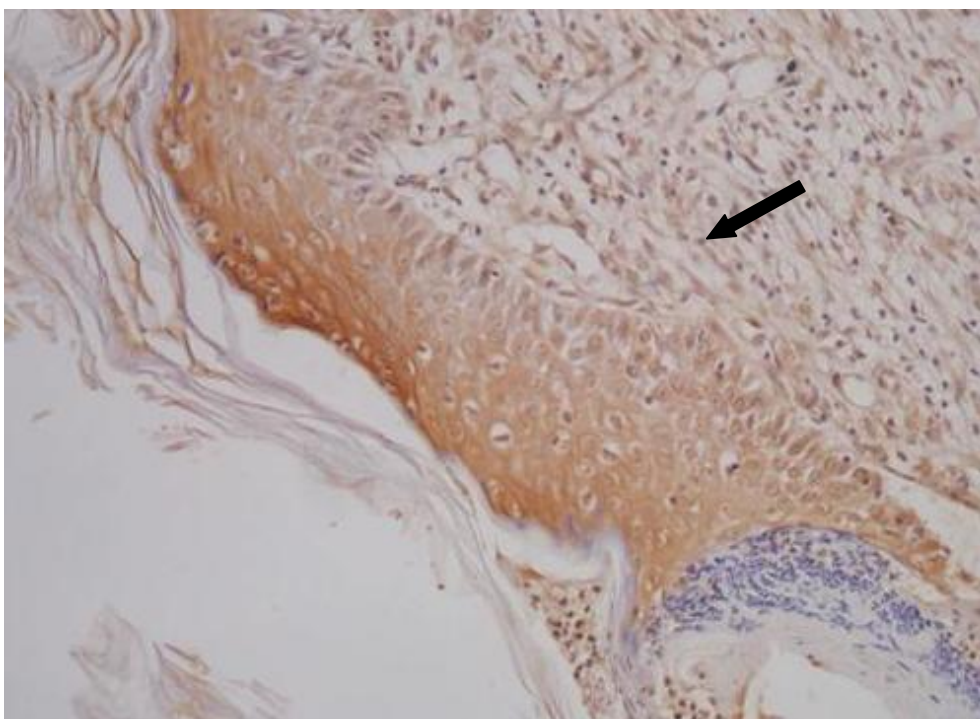
Nebyly nalezeny žádné výrazné rozdíly v expresi PAI-1 v kontrolních a diabetických ranách. U obou skupin byl detekován především v horní vrstvě epitelu (obr. 13 - 16) a v endotelu kapilár (obr. 17).



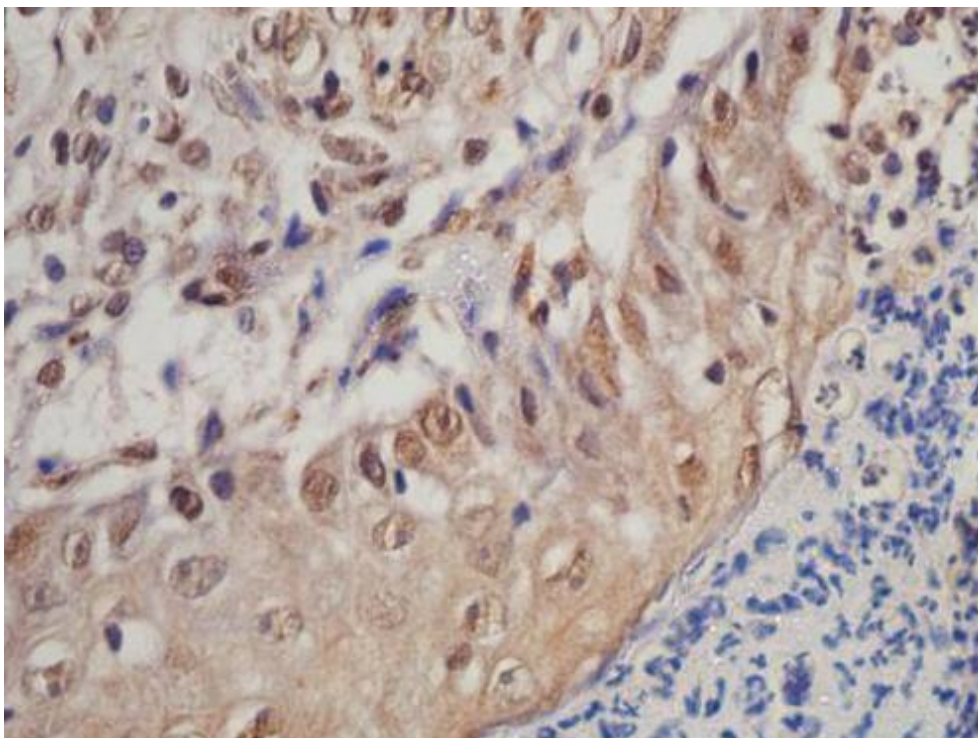
Obr. 13: Epitel pozitivní na PAI-1 u kontrolní rány. Zvětšeno 4x.



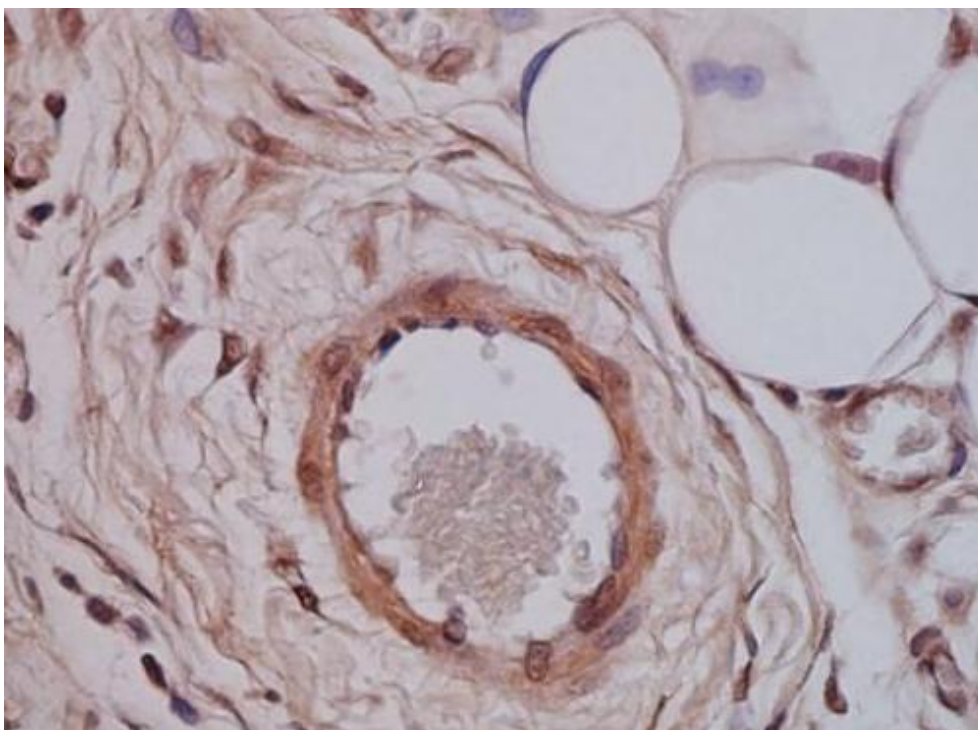
Obr. 14: Epitel pozitivní na PAI-1 u diabetické rány. Zvětšeno 4x.



Obr. 15: Epitel pozitivní na PAI-1 u diabetické rány. Zvětšeno 20x.



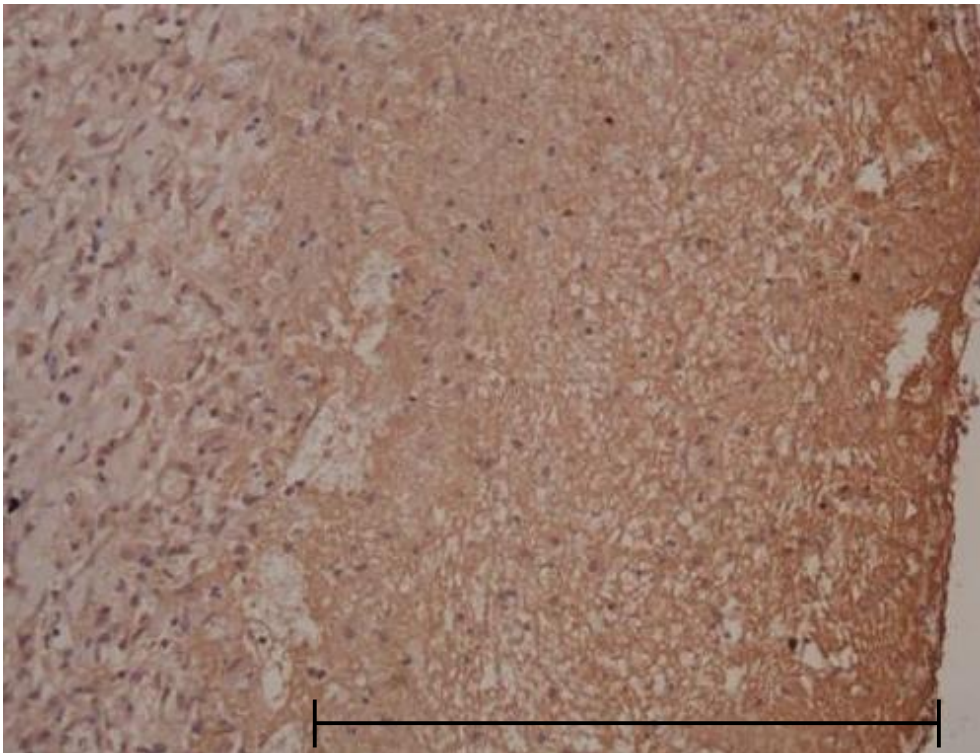
Obr. 16: Epitel pozitivní na PAI-1 u diabetické rány. Zvětšeno 60x.



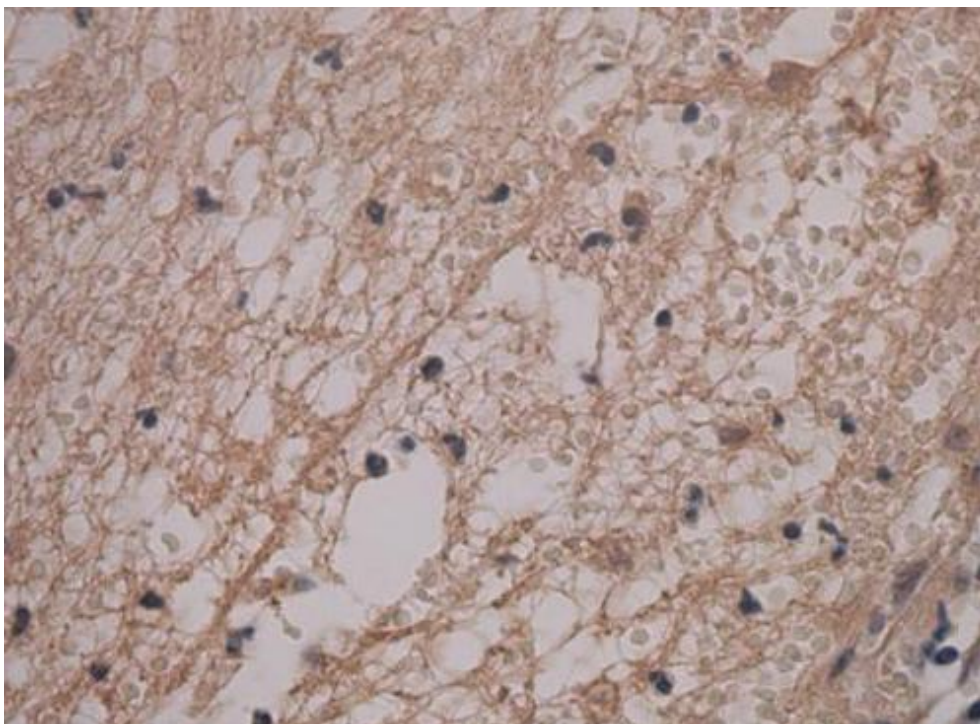
Obr. 17: Endotel kapiláry pozitivní na PAI-1. Zvětšeno 60x.

Fibrinogen

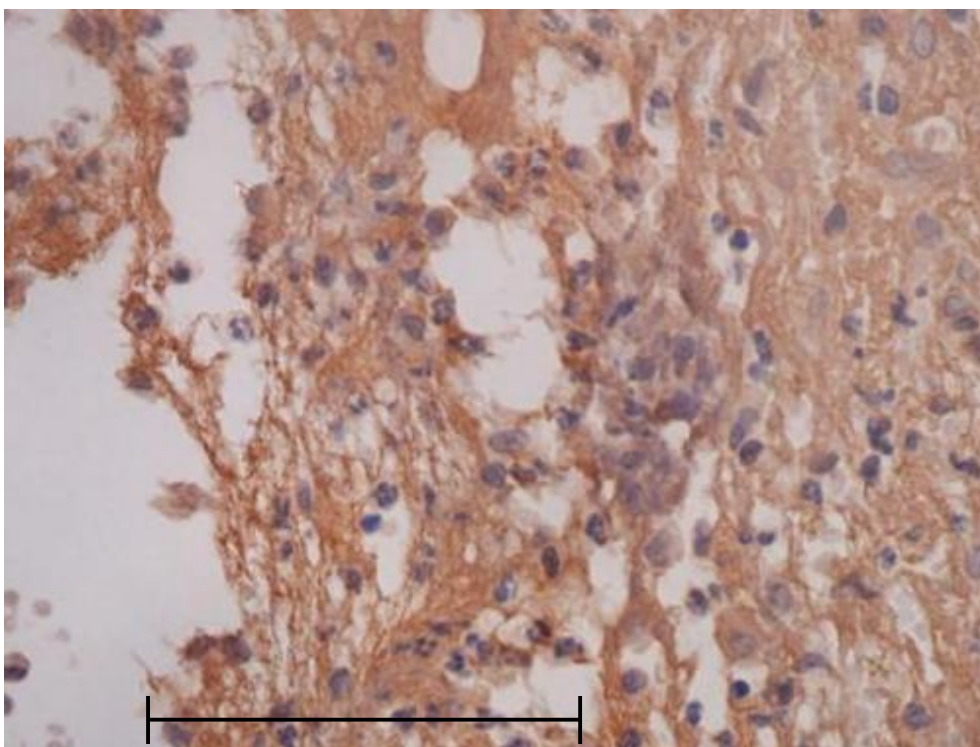
Fibrinogen byl detekován převážně ve formě velké fibrinové sítě (obr. 18, 19) pod strupem na povrchu diabetických ran. U kontrolních zvířat nedochází k tvorbě silné krusty, proto je asi také fibrinová síť tenčí a v desátém dni nevždy detekovatelná (obr. 20). Dále byl fibrinogen detekován v krvi v kapilárách (obr. 21) a v epitelu (obr. 22).



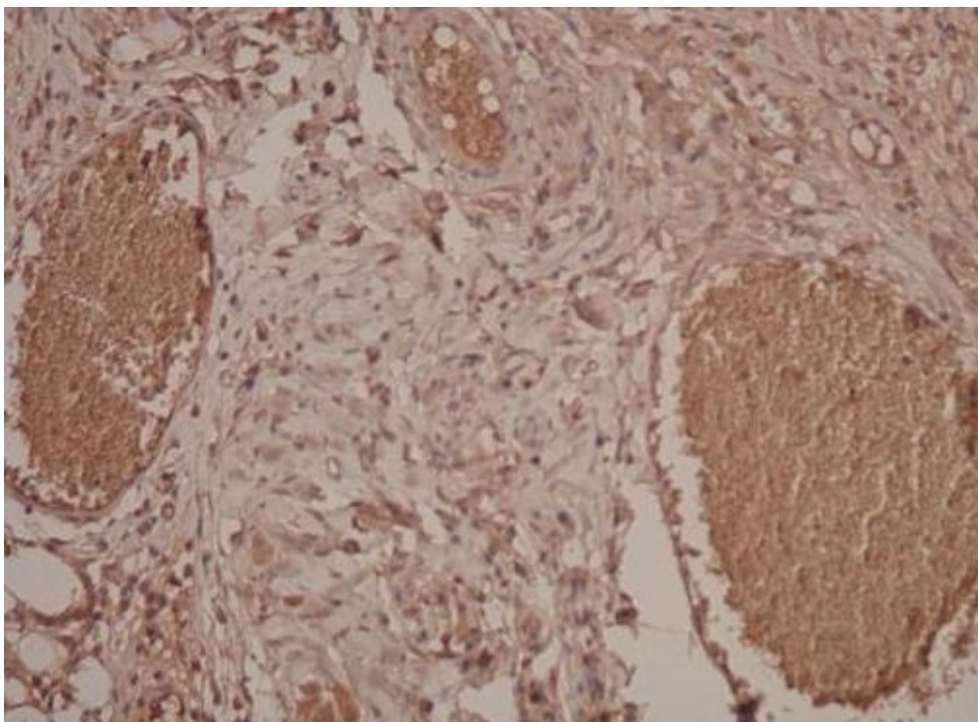
Obr. 18: Fibrinová síť na povrchu diabetické rány. Zvětšeno 20x.



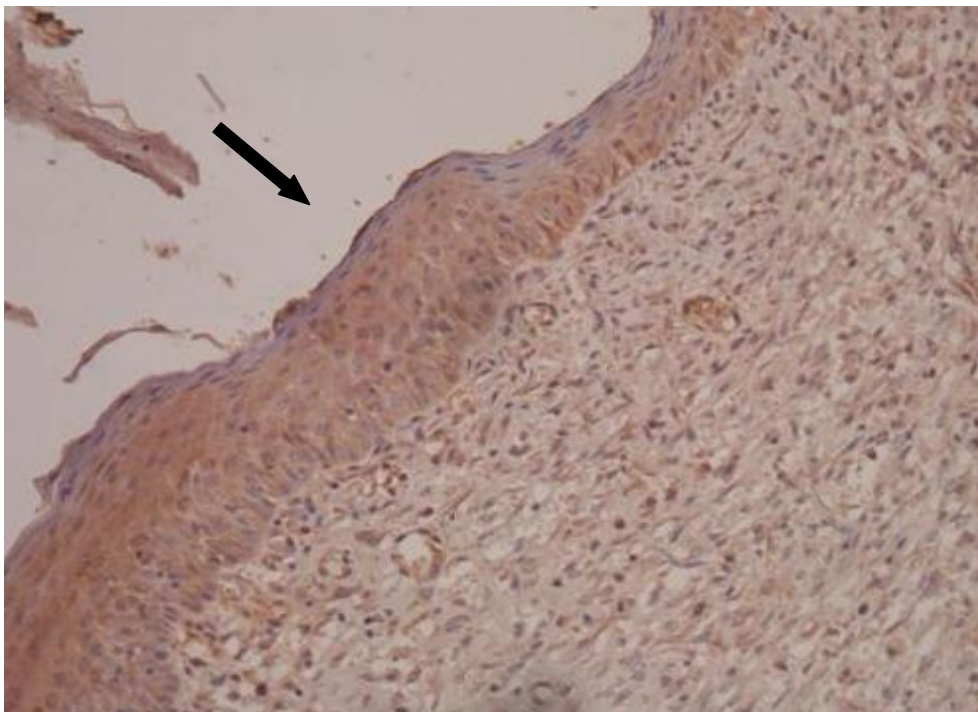
Obr. 19: Fibrinová síť na povrchu diabetické rány. Zvětšeno 60x.



Obr. 20: Fibrinová síť na povrchu kontrolní rány. Zvětšeno 60x.



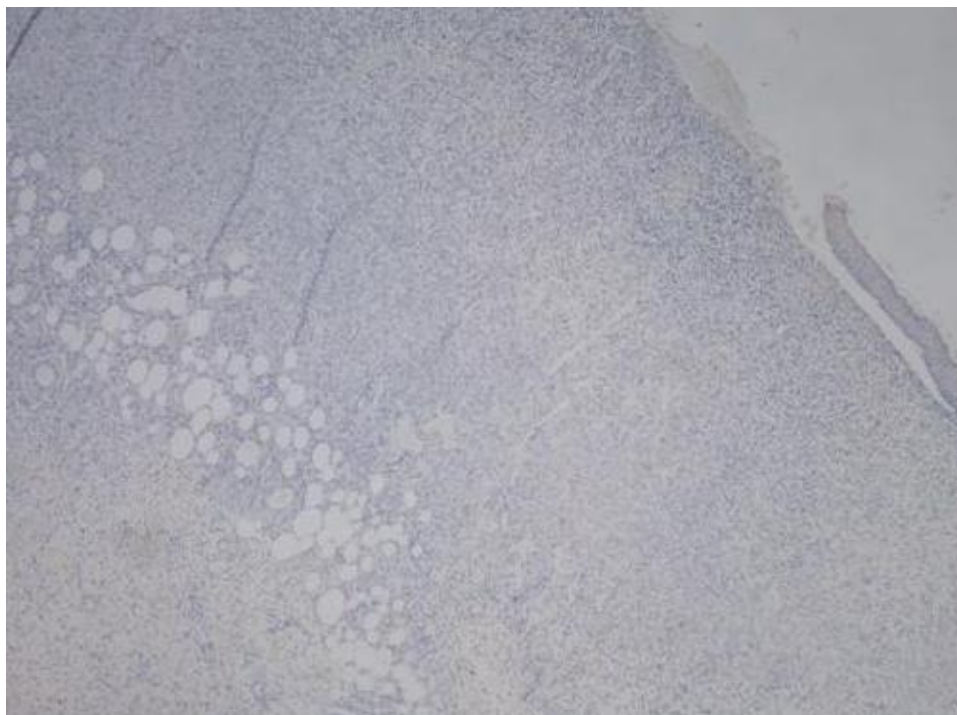
Obr. 21: Kapiláry s obsahem fibrinogenu. Zvětšeno 20x.



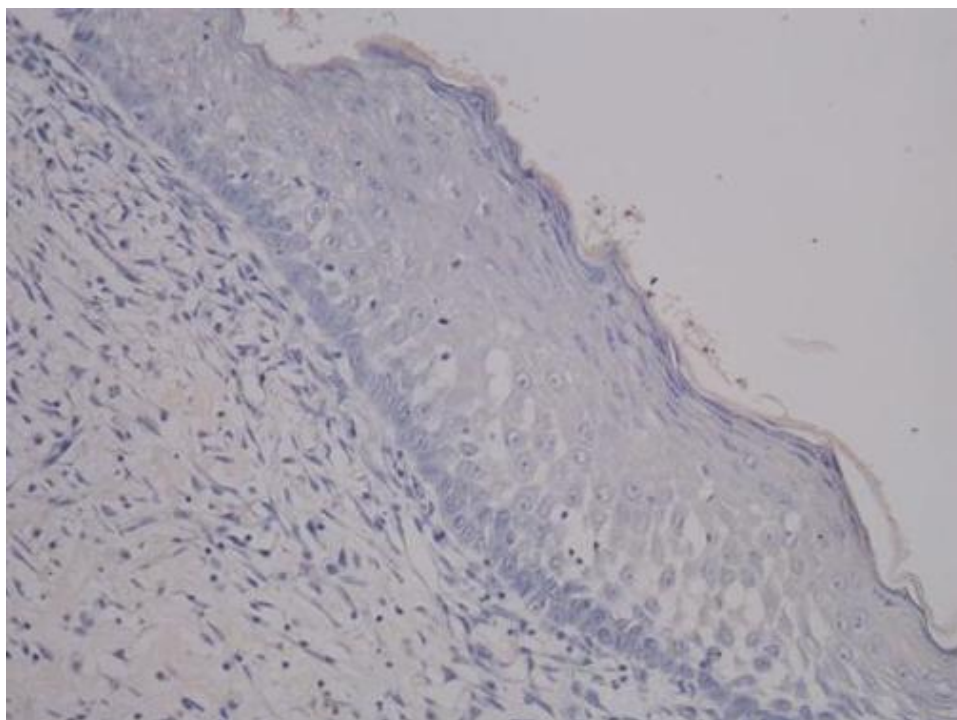
Obr. 22: Epitel pozitivní na fibrinogen. Zvětšeno 20x.

Negativní kontrola

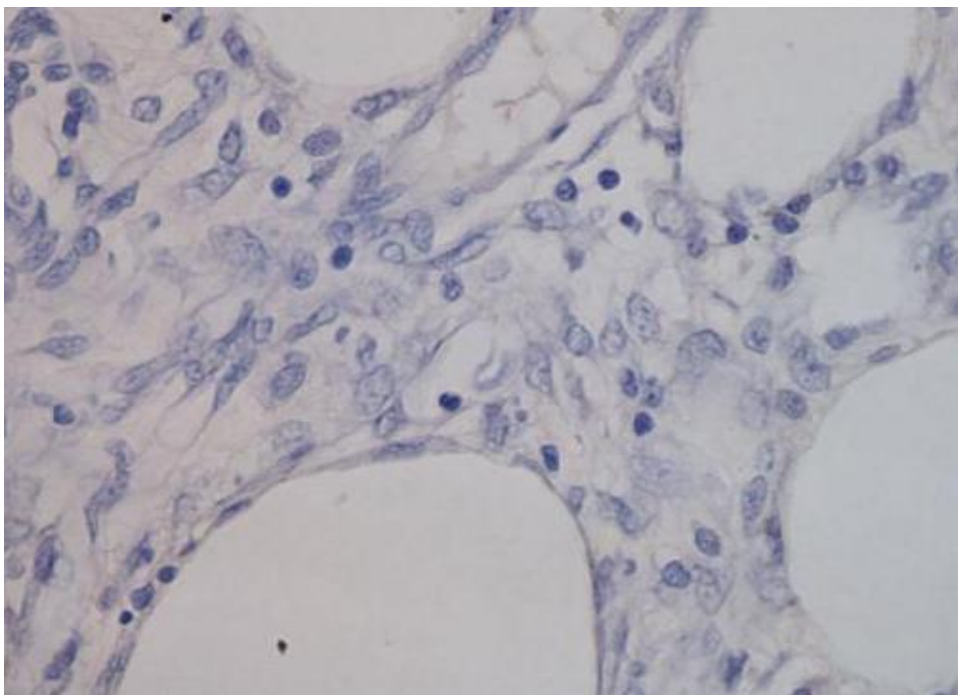
Na obrázcích 23 - 27 jsou znázorněny histologické preparáty inkubované v séru bez přidané primární protilátky.



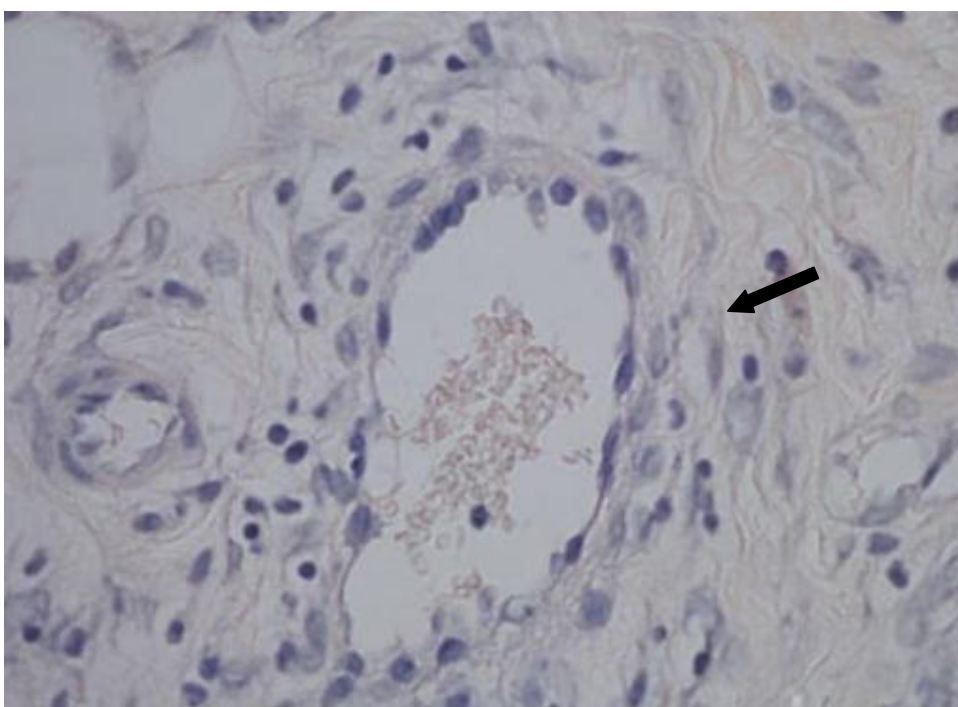
Obr. 23: Pohled na celý řez. Zvětšeno 4x.



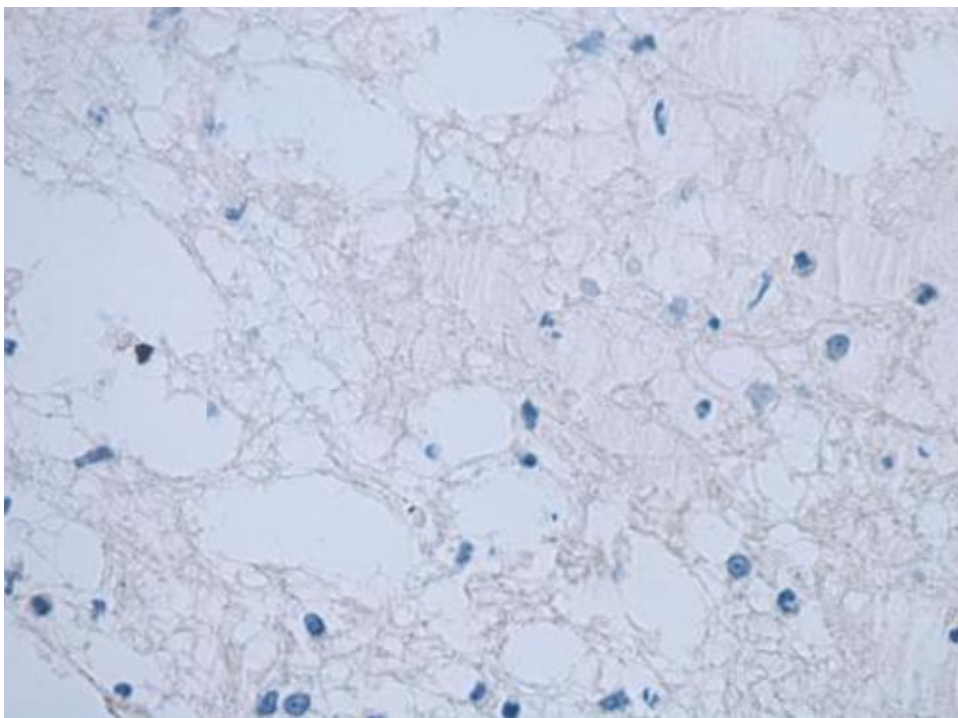
Obr. 24: Epitel. Zvětšeno 20x.



Obr. 25: Tukové buňky. Zvětšeno 60x.



Obr. 26: Kapilára. Zvětšeno 60x.



Obr. 27: Provizorní matrix na povrchu rány. Zvětšeno 60x.

5. Diskuse

V první části experimentu byly sledovány děje odehrávající se v organismu potkanů v závislosti na jejich věku. Z naměřených hodnot je patrný postupný vývoj DM2T. Kritický okamžik nastal u diabetických samců v patnáctém týdnu, kdy se glykémie začíná výrazně zvyšovat až na 20 mmol/l. Jak je známo, tak hladiny krevní glukózy souvisejí s koncentrací plazmatického inzulínu (Rybka 2007). Koncentrace inzulínu se u diabetických samců postupně zvyšuje až do patnáctého týdne, kdy začne prudce klesat až na 10 $\mu\text{g/l}$. β -buňky pankreatu již nejsou schopny zvládat vysoké nároky na produkci inzulínu a udržovat tak nízké hladiny glykémie, protože dochází k jejich dysfunkci (Tokuyama et al. 1995). Snížení plazmatické hladiny inzulínu se projeví zvyšující se glykemií.

U diabetických samic se plazmatická koncentrace inzulínu zvyšuje až k hodnotám 40 $\mu\text{g/l}$. V patnáctém týdnu dochází také k poklesu jeho hladiny, který ovšem není tak výrazný jako u diabetických samců. Koncentrace inzulínu klesne na 20 $\mu\text{g/l}$. Tato hladina inzulínu je schopná udržet glykémii v nižších hodnotách. Protože glykémie nedosahuje vysokých hodnot, nedochází u diabetických samic k tak mohutnému rozvoji DM2T jako u samců.

Jelikož ZDF potkani mají mutaci leptinového receptoru a jsou obézní, předpokládali jsme, že koncentrace leptinu v plazmě diabetických potkanů bude vysoká, což se také potvrdilo. Leptin jako adipokin je produkován hlavně tukovými buňkami. Jeho koncentrace korelují s tukovými zásobami v organismu (Spiegelman et Flier 2001). Jeho hladiny u diabetických samců jsou zvýšené až do patnáctého týdne, od kterého, jak je již zmíněno, dochází k rozvoji diabetu. Jelikož v organismu diabetických samců dochází k závažným systémovým změnám, začínají méně přibývat na váze, využívají tukové zásoby, a to se projeví poklesem hladiny leptinu.

U diabetických samic, nedochází k tak mohutnému rozvoji diabetu a následně systémovým změnám vedoucích k poklesu tukových zásob, proto koncentrace plazmatického leptinu zůstává konstantně zvýšená.

Dalším studovaným proteinem byl PAI-1. Jeho hladiny jsou spojeny s inzulínovou rezistencí (Theuma et Fonseca 2004). DM2T je spojen s endotelovou

dysfunkcí, což může vést také ke zvyšování PAI-1 (Dandona et Aljada 2004a). Bylo prokázáno, že plazmatické hladiny PAI-1 jsou u diabetických ZDF potkanů vyšší než u kontrolních. U diabetických samců má koncentrace tendenci spíše se zvyšovat, ovšem u diabetických samic se koncentrace postupně snižuje až na 1,5 ng/ml. Tím se konečná hodnota ve dvacátém druhém týdnu liší od průměrné hodnoty u stejně starých diabetických samic, která dosahuje 4,5 ng/ml. Tato hodnota je přesnější, protože skupina obsahovala 11 potkanů. V experimentu sledujícím vývoj jednotlivých proteinů v závislosti na věku byla každá skupina potkanů tvořena pouze třemi zvířaty. U výše zmíněných proteinů byly rozdíly koncentrací a jejich vývoj jednoznačný, proto byla tři zvířata ve skupině postačující. Ovšem u PAI-1 bylo třeba ještě provést stanovení u většího počtu potkanů, aby bylo možné dosavadní výsledky potvrdit.

V další části experimentu byly stanoveny a porovnávány průměrné hladiny fibrinogenu, IL-6 a již výše zmíněných proteinů u kontrolních a diabetických zvířat ve věku 22 týdnů. Průměrné hladiny glukózy u diabetických samců jsou téměř třikrát vyšší než u kontrolních. U diabetických samic jsou hladiny také zvýšeny oproti kontrolním samicím, ale glukóza nedosahuje takové koncentrace jako u diabetických samců. To souvisí s hladinami plazmatického inzulinu. Koncentrace inzulinu u diabetických samic dosahuje až 18 $\mu\text{g/l}$, u diabetických samců 11 $\mu\text{g/l}$. Proto jsou průměrné hladiny glykémie vyšší u diabetických samců než u diabetických samic. Ty mají ještě dostatek inzulinu, který dokáže regulovat přebytek glukózy.

Studie od Wanga uvádí, že koncentrace plazmatického leptinu u diabetických ZDF potkanů starých 13 týdnů, je 32,2 ng/ml. V tomto věku již glukóza dosahovala 29,9 mmol/l (Wang et al. 2001). V jejich podmínkách byl vývoj diabetu rychlejší. Podobné hodnoty u diabetických ZDF potkanů jsme také naměřili, ale až ve věku 22 týdnů. Plazmatická koncentrace leptinu u diabetických samců dosahovala až 36 ng/ml a u diabetických samic 51 ng/ml. Vyšší hladiny u samic lze odůvodnit jejich hmotností. Jsou dvakrát těžší než kontrolní samice a hladina jejich plazmatického leptinu souvisí se zásobami tuku v organismu.

Průměrné plazmatické koncentrace PAI-1 byly zvýšeny dvojnásobně u diabetických samců a trojnásobně u diabetických samic oproti kontrolním

zvířatům. I když se jedná o adipokin, jeho největším producentem v organismu je endotel. Zvýšené hladiny PAI-1 tedy mohou souviset spíše s endotelovou dysfunkcí, ke které dochází u diabetu (Dandona et Aljada 2004a), než s obezitou. PAI-1 je marker endotelové dysfunkce (Dandona et Aljada 2004b). Zvýšená koncentrace PAI-1 může vést ke zpomalenému odbourávání fibrinové zátky a tím mít negativní účinek na hojení ran. Bylo prokázáno, že rány se PAI-1 deficientním myším se hojí rychleji (Chan et al. 2001).

Při DM2T u lidí se zvyšuje syntéza fibrinogenu, který je proteinem akutní fáze (Galajda et Mokáň 2001). Tyto výsledky se nám nepodařily dostatečně potvrdit. U diabetických samic je sice zvýšení oproti kontrolním samicím, ale ne tak výrazné jak jsme předpokládali. Mezi koncentracemi plazmatického FBG u kontrolních a diabetických samců nejsou patrné žádné rozdíly. To zřejmě souvisí s plazmatickými koncentracemi IL-6, který je hlavním induktorem FBG (Heinrich et al. 1990). Při DM2T by měly být hladiny IL-6 výrazně zvýšeny vlivem obezity (Kern et al. 2001) a systémové zánětlivé odpovědi (Galajda et Mokáň 2001). Jedna studie uvedla zvýšení IL-6 v séru, obézních ZDF potkanů, až na 500 pg/ml (Kim et al. 2008). V našem experimentu ale nebyly nalezeny žádné rozdíly v koncentracích plazmatického IL-6 u diabetických a kontrolních zvířat. Vlivem nízké hladiny IL-6, zřejmě nedochází ani ke zvýšení plazmatické koncentrace FBG. Další možností experimentu by mohlo být sledování plazmatické hladiny IL-6 a FBG po poranění. Koncentrace by se pravděpodobně zvýšily a u diabetických zvířat by se plazmatické hladiny asi vracely k původním hodnotám mnohem pomaleji než u kontrolních zvířat.

Při sledování hojení ran byly zaznamenány rozdíly mezi kontrolními a diabetickými zvířaty. Hojení diabetických ran je zřejmě zpomaleno vlivem zánětu doprovázeného velkou infiltračí imunitních buněk, což vede k tvorbě hnisu. Dále se na diabetických ranách tvoří velká krusta, což může být způsobeno zvýšeným množstvím fibrinogenu a PAI-1. Proto jsme v desátém dni ránu odebrali a pokusili jsme se imunohistochemicky detekovat IL-6 (jako jeden z nejdůležitějších prozánětlivých proteinů), FBG a PAI-1.

Při hojení za fyziologických podmínek má IL-6 regulační účinek jako důležitý prozánětlivý faktor. Ovšem při chronických ranách je jeho účinek škodlivý (Naugler

et al. 2008). Hojení chronických ran se často zastaví ve fázi zánětu. Tekutina obsažená v ranách je bohatá na prozánětlivé proteiny IL-1, IL-6 a TNF α . To souvisí s nahromaděním imunitních buněk v ranách (Yager et al. 2007). IL-6 je produkován převážně makrofágy, adipocyty, endotelem a fibroblasty (Heinrich et al. 1990). Tuto lokalizaci se nám podařilo potvrdit. Zvýšené množství v diabetických ranách bylo nalezeno především na povrchu ran v hnisu, kde je produkován převážně makrofágy. Dále byly na IL-6 pozitivní makrofágy v okolí tukových buněk a fibroblasty. Práce Wellena uvádí, že zvýšená produkce leptinu tukovými buňkami stimuluje nahromaděním makrofágů v tukové tkáni, kde začínají produkovat prozánětlivé cytokiny typu IL-6, IL-1, TNF α a ty mohou podílet na inzulínové rezistenci (Wellen et al. 2003). IL-6 tedy není produkován adipocitami, ale makrofágy. Mateo uvedl, že v pozdější fázi hojení může IL-6 potlačovat proliferaci fibroblastů (Mateo et al. 1994).

Při detekci PAI-1 nebyly nalezeny rozdíly v jeho lokalizaci a množství u diabetických a kontrolních ran. PAI-1 je produkován převážně endotelem kapilár a adipocyty (Galajda et Mokáň 2001). Tyto údaje se nám podařilo potvrdit u kapilár. Tkáň adipocytů je velmi jemná a při histologickém zpracování může docházet k jejímu poškození a proto lze pozitivitu na PAI-1 špatně detekovat. Romer brzo po poranění detekoval PAI-1 také v bazální vrstvě keratinocytů, které ho za normálních okolností neprodukují. Uvedl, že při hojení ran PAI-1 hraje zřejmě roli při reepitelizaci (Romer et al. 1991). My jsme také našli pozitivní epitel, ale převážně v horních vrstvách. Bazální keratinocyty jsou spíše negativní. Epitel sice vypadá pozitivně, ale netroufáme si tvrdit, že opravdu produkuje PAI-1. Interpretace imunohistochemie je velmi složitá a může docházet k falešně pozitivním výsledkům.

Fibrinogen se tvoří v játrech a hraje důležitou roli při hemostáze. Po přeměně na nerozpustný fibrin dochází k zesíťování a zástavě krvácení. Původně jsme předpokládali, že velkou pozitivitu FBG nalezneme v krustě. Tyto domněnky se ale nepodařilo potvrdit, jelikož krusta je tvořena nekrotickou a příliš vysušenou tkání. Proto není pro imunohistochemické analýzy vhodná. FBG byl detekován převážně ve formě sítě na povrchu diabetických ran. V kontrolních ranách v desátém dni fibrinová síť není vždy patrná. Bylo prokázáno, že FBG při opravě tkání poskytuje počáteční matici, která stabilizuje ránu a podporuje lokální proliferaci a migraci

buněk (Drew et al. 2001). Dále jsme FBG detekovali v epitelu jak u kontrolních tak diabetických ran. Není známo, že by keratinocyty produkovaly fibrinogen, proto jsme s vytvářením nějakého závěru velmi opatrní. Jak je již zmíněno, interpretace imunohistochemie je velmi složitá a proto jsme při uvádění výsledků velmi opatrní s musíme je brát s určitou rezervou.

ZÁVĚR

Změny plasmatické koncentrace glukózy, inzulinu, leptinu a PAI-1, které byly u potkanů ZDF pozorovány během vývoje diabetu, jsou srovnatelné se změnami, ke kterým dochází u lidských pacientů. Nebylo zjištěno podstatné zvýšení koncentrace fibrinogenu a IL-6, a tyto parametry tedy porovnatelné nejsou.

V hojících se ranách byl stanoven IL-6, PAI-1 a fibrinogen. IL-6 byl detekován převážně na povrchu diabetických ran a v okolí tukových buněk. U PAI-1 nebyly nalezeny rozdíly v množství a lokalizaci v ranách kontrolních a diabetických potkanů. Pozitivní na PAI-1 byl hlavně endotel kapilár a horní vrstva epitelu. Fibrinogen byl detekován ve formě fibrinové sítě na povrchu diabetických ran a v epitelu ran kontrolních i diabetických.

Potkan ZDF se ukázal jako vhodný model ke studiu zhoršeného hojení ran vlivem diabetu. Mohl by být dále používán ke studiu prostředků vedoucích ke zlepšení hojení ran. Za daných podmínek ovšem není vhodný ke sledování doprovodných změn diabetu týkající se plazmatických hladin fibrinogenu a IL-6.

Literatura

1. Armstrong, D. G., Lipsky, B. A.: Diabetic foot infections: stepwise medical and surgical management. *Int Wound J* 2004; 1:123–132.
2. Blakytyny, R., Jude, E. B., Gibson, J. M., et al.: Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers. *Int J Pathol* 2000; 190:589-594.
3. Brem, H., Tomic-Canic, M.: Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *Int J Clin Invest* 2007; 117:1219-1222.
4. Bross, J., Talbot, G. H., Maislin, G. et al.: Risk factors for nosocomial candidemia: a case – control study in adults without leukemia. *Am J Med* 1989; 87:614-620.
5. Burrow, J. W., Koch, J. A., Chuang, H. H. et al.: Nitric oxide donors selectively reduce the expression of matrix metalloproteinases-8 and -9 by human diabetic skin fibroblasts. *Int J Surg Res* 2007; 140:90-98.
6. Chan, J. C. Y., Duszczyszyn, D. A., Castellino, F. J., Ploplis, V. A.: Accelerated skin wound healing in plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice. *Am J Pathol* 2001; 159:1681-1688.
7. Clark, R. A. F.: Mechanism of cutaneous wound repair. In: Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg, I. M., Austen, K. F. editors. *Dermatology in General medicine*. New York: McGraw Hill, 1993, s. 473-486.
8. Cross, S. E., Naylor, I. L., Coleman, R. A. Teo, T. C.: An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *Br J Plast Surg* 1995; 48:189-197.
9. Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P.: Endothelial dysfunction, inflammation and diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 2004a; 5:189-197.
10. Dandona, P., Aljada, A.: Endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes and the effects of thiazolidinedione antidiabetic agents. *J Diabet Complications* 2004b; 18:91-102.
11. Davidson, J. M.: Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res* 1998; 290:1-11.
12. Dorsett-Martin, W. A.: Rat models of skin wound healing: A review. *Wound Rep Reg* 2004; 12:591-599.

13. Drew, A. F., Liu, H., Davidson, J. M., Daugherty, C. C., Degen, J. L.: Wound-healing defects in mice lacking fibrinogen. *Blood* 2001; 97:3691-3698.
14. Fejfarová, V.: Diabetes mellitus a hojení ran – 1. díl. *Hojení ran* 2007; 1(1):24-27.
15. Fejfarová, V.: Diabetes mellitus a hojení ran – 2. díl. *Hojení ran* 2008a; 2(2):4-8.
16. Fejfarová, V.: Diabetes mellitus a hojení ran – 3. díl. *Hojení ran* 2008b; 2(3):11-15.
17. Finegood, D. T., McArthur, M. D., Kojwang, D., Thomas, M. J., Topp, B. G., Leonard, T., Buckingham, R. E.: Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes* 2001; 50:1021- 1029.
18. Ferencík, M., Rovenský, J., Mařha, V.: Dictionary of immunology. Bratislava: Slovak academic press Ltd., 2002, s. 152-153.
19. Galajda, P., Mokáň, M.: Hyperkoagulační stav při cukrovce a poruchy fibrinolýzy při cukrovce. In: Galajda, P., Mokáň, M.: *Poruchy hemostázy při diabetes mellitus*. Martin: Prokonzult, 2001, s. 195-239.
20. Gottup, F., Agren, M. S., Karlsmark, T.: Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Rep Reg* 2000; 8:83-96.
21. Heinrich, P. C., Castell, J. V., Andus, T.: Interleukin-6 and acute phase response. *J Biochem* 1990; 265:621-636.
22. Hirano, S., Rees R. S., Gilmont, R. R.: MAP kinase pathways involving hsp27 regulate fibroblast – mediated wound contraction. *J Surg Res* 2002; 102:77-84.
23. Hunt, J. A.: Foot infections in diabetes are rarely due to a single microorganism. *Diabet Med* 1992; 9:749-752.
24. Jirkovská, A.: Epidemiologické, ekonomické a sociální faktory syndromu diabetické nohy. In: Tošenovský, P., Edmonds, M. E., et al., editors. *Moderní léčba syndromu diabetické nohy*. Praha: Galém, 2004, s. 1-14.
25. Jirkovská, A.: Syndrom diabetické nohy – základní informace. In: Jirkovská, A., et al., editors. *Syndrom diabetické nohy*. Praha: Maxdorf, 2006, s. 22-36.

26. Kern, P. A., et al.: Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280:E745-E751.
27. Kin, D. H., Burgess, A. P., Li, M., Tsenovoy, P. L., Addabbo, F., McClung, J. A., Puri, N., Abraham, N. G.: Heme oxygenase-mediated increases in adiponectin decrease fat content and inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in Zucker rats and reduce adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325:833-840.
28. Kirsner, R. S. Bogensberger, G.: The normal process of healing. In: Kloth, L. C., McCulloch J. M., editors. *Wound healing: alternatives in management*. Philadelphia: F. A. Davis, 2002, s. 3-34.
29. Köveker, G. B.: Growth factors in clinical practice. *Int Clin Pract* 2000; 54:590-593.
30. Kuhlmann, J., Neumann-Haefelin, C., Belz, U., Kalisch, J., Juretschke, H. P., Stein, M., Kleinschmidt, E., Kramer, W., Herling, A. W.: Intramyocellular lipid and insulin resistance: a longitudinal in vivo ¹H-spectroscopic study in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 2003; 52:138-144.
31. Lavery, L. A., Walker, S. C., Harkless, L. B.: Infected puncture wounds in diabetic and nondiabetic adults. *Diabetes Care* 1995; 18:1588-1591.
32. Leonard, B. L., Watson, R. N., Loomes, K. M., Phillips, A. R. J., Cooper, G. J.: Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol* 2005; 42:162-170.
33. Lilley, S. H., Levine, G. I.: Management of hospitalized patients with type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician* 1998; 57:1079-1088.
34. Lin, Z., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T., Mukaida, N.: Essential involvement of IL-6 in the skin wound healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukocyte Biol* 2003; 73:713-721.
35. Lindblad, W.: Animal models in wound healing research: do we need more. *Wound Rep Reg* 2000; 8:81-82.
36. Liu, W., Mehrara, B. J., Chin, G. S., Hsu, M., Peled, Z., Longaker, M. T.: The use of newborn rats and an adenoviral gene delivery vector as a model system for wound – healing research. *Ann Plast Surg* 2000; 44:543-551.

37. Marx, G., Mou, X.: Characterizing fibrin glue performance as modulated by heparin, aprotinin, and factor XIII. *J Lab Clin Med* 2002; 140:152-60.
38. Mateo, R. B., Reichner, J. S., Albina, J. E.: Interleukin-6 activity in wounds. *Am J Physiol* 1994; 266:R1840-R1844.
39. Mogford, J. E., Mustoe, T. A.: Experimental models of wound healing. In: Falanga, V., editor. *Cutaneous wound healing*. London: Martin Dunitz, 2001, s. 22-109.
40. Montandon, D., D'Anoiran, G., Gabbiani, G.: The mechanism of wound contraction and epithelialization: clinical and experimental studies. *Clin Plast Surg* 1977; 4:325-346.
41. Nagappa, A. N., Cheriyan, B.: Wound healing activity of the aqueous extract of *Thespesia populnea* fruit. *Fitoterapia* 2001; 72:503-506.
42. Naugler, W. E., Karin, M.: The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med* 2008; 14:109-119.
43. Nečas, E.: Hojení rány. In: Nečas, E. et al., editors. *Obecná patologická fyziologie*. Praha: Karolinum, 2005, s. 120-128.
44. Nováková, M.: Makrovaskulární komplikace diabetu postihující periferní tepenný systém. In: Charvát, J. et al., editors. *Diabetes mellitus a makrovaskulární komplikace*. Praha: Triton, 2001, s. 171-184.
45. Peterson, R. G., Shaw, W. N., Neel, M., Little, L. A., Eichberg, J.: Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *ILAR News* 1990; 32:16-19.
46. Piaggese, A.: Research development in the pathogenesis of neuropathic diabetic foot ulceration. *Curr Diab Rep* 2004; 4:419-423.
47. Pickavance, L., Widdowson, P. S., King, P., Ishii, S., Tanaka, H., Williams, G.: The development of overt diabetes in young Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats and the effect of chronic McC-555 treatment. *Br J Pharmacol* 1998; 125:767-770.
48. Pirala, E., Parikka, M., Ramamurthy, N. S., Maisi, P., McClain, S., Kucine, A., Tervahartiala, T., Prikk, K., Golub, L. M., Salo, T., Sorsa, T.: Chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen promote wound healing in ovariectomized rats: effects on matrix metallo-proteinase-2, membrane type 1

- matrix metalloproteinase, and laminin-5 gamma2-chain. *Wound Rep Reg* 2002; 10:38-51.
49. Roner, J., Lund, L. R., Eriksen, J., Ralfkiaer, E., Zeheb, R., Geleher, T. D., Dano, K., Kristensen, P.: Differential expression of urokinase – type plasminogen activator and its type – 1 inhibitor during healing of mouse skin wounds. *J Invest Dermatol* 1991; 97:803-811.
50. Rybka, J.: Etiopatogeneze, průběh a klinický obraz diabetes mellitus. In: Rybka, J.: *Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění*. Praha: Grada , 2007, s. 19-26.
51. Rybka, J.: Obezita a diabetes mellitus. In: Rybka, J.: *Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění*. Praha: Grada, 2007, s. 183-192.
52. Spiegelman, B. M., Flier, J. S.: Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001; 104:531-543.
53. Škrha, J.: Diabetes mellitus a oxidační stres. In: Perušičová, J., editor. *Diabetologie 2005*. Praha: Triton, 2005, s. 13-36.
54. Terretaz, J., Jeanrenaud, B.: In vivo hepatic and peripheral insulin resistance in genetically obese (fa/fa) rats. *Endocrinology* 1983; 112:1346-1351.
55. Theuma, P., Fonseca, V. A.: Inflammation, insulin resistance, and atherosclerosis. *Metab Syndr Relat Disord* 2004; 2:105-113.
56. Tokuyama, Y., Sturis, J., DePaoli, A. M., Takeda, J., Stoffel, M., Tang, J., Sun, X., Polonsky, K. S., Bell, G. I.: Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 1995; 44:1447-1457.
57. Toyokawa, H., Matsui, Y., Uhara, J., Tsuchiya, H., Teshima, S., Nakanishi, H., Kwon, A. H., Azuma, Y., Nagaoka, T., Ogawa, T., Kamiyama, Y.: Promotive effects of far – infrared ray on full – thickness skin wound healing in rats. *Exp Biol Med* 2003; 228:724-729.
58. Wang, J., Yuen, V. G., McNeill, H. J.: Effect of vanadium on insulin and leptin in Zucker diabetic fatty rats. *Mol Cel Biochem* 2001; 218:93-96.
59. Wellen, K. E., Hotamisliqil, G. S.: Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112:1785-1788.
60. Yager, D. R., Kulina, R. A., Gilman, L. A.: Wound Fluids: A window into the wound environment?. *Int J Low Extrem Wounds* 2007; 6:262-272.

61. Yaron, M., Erin, M. H., Huffer, W., Cairns, C.: Efficacy of tissue glue for laceration repair in an animal model. *Acad Emerg Med* 1995; 2:259-263.

