

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

**Studium aktivit genů MMP při hojení ran u zdravých
a diabetických potkanů ZDF**

Bc. Luboš Hasman

Diplomová práce

2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Luboš HASMAN**
Osobní číslo: **C08806**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Srovnání aktivity genů MMP při hojení ran u zdravých a diabetických potkanů**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

- 1) Teoretická část:
 - a) Zpracování současného stavu problematiky hojení primárních a sekundárních ran.
 - b) Přehled MMP týkajících se hojení ran.
 - c) PCR - charakteristika metody.
- 2) Praktická část:
 - a) Izolovat RNA ze vzorků získaných z ran v různých intervalech hojení.
 - b) Pomocí elektroforézy zpřekontrolovat kvalitu RNA.
 - c) Nasyntetizovat cDNA.
 - d) Metodou rt RT-PCR provést analýzu exprese genu pro vybrané MMPs.
 - e) Získaná data statisticky vyhodnotit.
 - f) Určit, zda se exprese některého genu v průběhu hojení mění a posoudit, zda existuje korelace mezi expresí a rychlostí hojení.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
podle pokynů vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Renata Köhlerová, Ph.D.**
Ústav lék.biochemie LF UK Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **1. října 2010**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2011**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2011

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen 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 nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Luboš Hasman

Na tomto místě bych chtěl především poděkovat mé školitelce Mgr. Renatě Köhlerové, Ph.D. za odborné vedení a příležitost podílet se na výzkumu v dané oblasti. Dále bych chtěl poděkovat odbornému konzultantovi Ing. Rastislavu Slavkovskému a všem, kteří mi pomáhali během práce v laboratoři. Zvláště bych pak chtěl poděkovat své rodině a přátelům za všestrannou podporu a hlavně rodičům, kteří mě psychicky a finančně podporovali v průběhu celého mého studia.

Tato práce byla podporována výzkumným záměrem VZ MSM 0021620820

Souhrn

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou enzymy, které proteolyticky degradují extracelulární matrix (ECM) a tím jsou odpovědné za remodelaci pojivové tkáně. Za fyziologických podmínek se podílejí na ontogenetickém vývoji, morfogenezi, angiogenezi, růstu a hojení ran. Objevují se také ve většině zánětlivých, degenerativních a maligních procesech.

Hojení je komplikovaný děj, kterého se kromě MMP účastní celá řada buněk (neutrofilů, lymfocytů, mastocytů, monocytů, makrofágy, fibroblasty, keratinocyty, endotel) a jimi vylučovaných působků (cytokiny, růstové faktory apod.). Tento děj probíhá v několika fázích: hemostáza, zánět, proliferační fáze, fibrotizace a tvorba jizvy.

V této diplomové práci jsme se zaměřili na sledování změn aktivit vybraných MMP a jejich inhibitorů (TIMP) v průběhu hojení ran u zdravých a diabetických potkanů. Modelovými zvířaty byli zvoleni potkani Zucker Diabetic Fatty (ZDF), kterým byly odebírány v časových intervalech vzorky kůže, granulační tkáně a jizvy. Z těchto vzorků byla dále izolována celková RNA a syntetizována cDNA. Expres genů byla stanovena metodou real-time PCR. Data byla statisticky zpracována pomocí Studentova t-testu ($p \leq 0,05$).

MMP zasahují do všech fází hojení a jejich exprese se v průběhu hojení mění. V neporušené kůži byly lehce zvýšené hodnoty exprese MMP-2, -3, -14 a TIMP-2. První den exprese prudce vzrostla u MMP-8, -9 a TIMP-1 a vzápětí prudce klesla. Od pátého dne hojení narůstá exprese MMP-13, -2, -14 a TIMP-2. Desátý den je exprese vysoká u MMP-13, -2, -10, -14, -12 a TIMP-2. I v čerstvě zahojené jizvě lze zaznamenat vyšší expresi MMP-2, -10, -13 -14 a TIMP-2.

Nezaznamenali jsme žádné významné rozdíly v expresi sledovaných genů mezi zdravými a diabetickými zvířaty až na výjimku v neporušené kůži, kde byla hodnota exprese MMP-3 u samců.

Při porovnání samců a samic byly hodnoty exprese MMP-2, MMP-14 a TIMP-2 u samců vyšší v neporušené kůži, naopak 3. den hojení byly u samic zvýšené hodnoty exprese MMP-14 a TIMP-2.

Klíčová slova: hojení ran, matrixové metaloproteinázy, tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz, diabetes mellitus, potkan Zucker Diabetic Fatty

Summary

Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes that proteolytically degrade extracellular matrix (ECM) and they are thus responsible for the remodelling of connective tissue. MMPs involve in the ontogenesis, morphogenesis, angiogenesis, cell growth and wound healing in the physiological conditions. They take part in inflammation, degenerative and malignant processes.

Healing is a very complicated process. MMPs and many chemokines (cytokines, growth factors, proteases) from cells (neutrophils, lymphocytes, mast cells, monocytes, macrophages, fibroblasts, keratinocytes, and endothelium) involve in the wound healing. This process takes place in several phases: hemostasis, inflammation, proliferative phase, and the formation of fibrotic scars.

We focused on monitoring expressions of selected MMPs and their inhibitors (TIMP) during wound healing in healthy and diabetic rats in this thesis. Zucker Diabetic Fatty rat (ZDF) has been chosen as a suitable model for our study. We used the real-time RT-PCR methods for study expressions of MMPs and their inhibitors. Data were statistically analyzed using Student's t-test ($p \leq 0.05$).

MMPs are produced by different cell types in the healing and by expression of genes changed over time. The value of expression MMP-2, -3, -14 and TIMP-2 was slightly elevated in the intact skin. The expression of MMP-8, -9 and TIMP-1 rapidly increased the first day and then dramatically decreased. From the fifth day of healing the expression of MMP-13, -2, -14 and TIMP-2 increases. The high expressions of MMP-13, -2, -10, -14, -12 and TIMP-2 appeared on in the tenth day. We can see a higher expression of MMP-2, -10, -13 -14 and TIMP-2 even in fresh healed scar.

We did not reveal any significant differences in gene expression between healthy and diabetic animals with an exception in the intact skin, where the value of MMP-3 increased by diabetics.

The values of expression MMP-2, MMP-14 and TIMP-2 in intact skin were increased at males, but the increased value of expression MMP-14 and TIMP-2 were observed in female on the third day of the healing.

Keywords: Wound healing, matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, diabetes mellitus, Zucker Diabetic Fatty rat

Seznam zkratek

ADAM	skupina enzymů s disintegrinem a metaloproteinázovou doménou
ADAM-TS	skupina enzymů ADAM s trombospodinovou částí
cDNA	komplementární DNA
DM1T	diabetes mellitus prvního typu
DM2T	diabetes mellitus druhého typu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukletid trifosfát
dsDNA	dvouvláknová DNA
ECM	extracelulární matrix
IL-1	interleukin jedna
IL-4	interleukin čtyři
MMP	matrixová metaloproteináza
mRNA	mediátorová RNA
MT-MMP	matrixová metaloproteináza membránového typu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	destičkový růstový faktor
PMN	polymorfonukleární neutrofily
RNA	ribonukleová nukleová kyselina
ROI	reaktivní kyslíkové radikály
RT	enzym reverzní transkriptáza
ssDNA	jednovláknová DNA
TGF- α	transformující růstový faktor alfa
TGF- β	transformující růstový faktor beta
TIMP	inhibitor matrixové metaloproteinázy
TNF- α	tumor nekrotizující faktor
ZDF	Zucker Diabetic Fatty

Obsah:

SEZNAM ZKRATEK.....	8
ÚVOD.....	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 MATRIX METALOPROTEINÁZY	12
1.1.1 Obecná charakteristika.....	12
1.1.2 Struktura.....	12
1.1.3 Regulace aktivity matrix metaloproteináz	14
1.1.4 Lokalizace matrix metaloproteináz	16
1.1.5 Funkce matrix metaloproteináz	17
1.1.6 Vybrané matrix metaloproteinázy	17
1.2 HOJENÍ RAN	21
1.2.1 Fáze hojení rány	21
1.2.2 Zhoršené hojení ran	25
1.3 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE.....	26
1.3.1 Princip metody polymerázové řetězové reakce.....	26
1.3.2 Různé modifikace PCR.....	27
1.3.3 Real time RT-PCR.....	29
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
2.1 LABORATORNÍ POTKANI	30
2.1.1 Potkan Zucker Diabetic Fatty.....	30
2.2 METODY.....	31
2.2.1 Odběr a uchování vzorků.....	31
2.2.2 Izolace RNA a měření koncentrace	31
2.2.3 Gelová elektroforéza.....	34
2.2.4 Syntéza cDNA.....	35
2.2.5 Kvantifikace cDNA metodou rt RT-PCR	36
2.2.6 Vyhodnocení naměřených hodnot.....	38
3 CÍLE PRÁCE.....	39

4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	39
4.1	VÝSLEDKY.....	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
4.1.1	Samci	Chyba! Záložka není definována.
4.1.2	Samice.....	Chyba! Záložka není definována.
4.1.3	Srovnání samců a samic.....	Chyba! Záložka není definována.
4.2	DISKUZE	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
	ZÁVĚR.....	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
	POUŽITÉ ZDROJE INFORMACÍ:	41

Úvod

Hojení je dynamický interaktivní proces, kterého se účastní celá řada buněk (neutrofilů, lymfocytů, mastocytů, monocytů, makrofágy, fibroblasty, keratinocyty, endotel) a jimi vylučovaných působků (cytokiny, růstové faktory apod.) a zejména skupina matrixových metaloproteináz.

Matrixové metaloproteinázy jsou enzymy, které proteolyticky degradují extracelulární matrix, čímž se podílejí na procesu hojení ran. Vyskytují se u obratlovců, octomilek, červů, nezmarů i rostlin.

Zvýšené hodnoty exprese genů matrix metaloproteináz i aktivity jejich proteinů a snížené hodnoty jejich tkáňových inhibitorů se často dávají do souvislosti se špatným hojením ran u diabetických pacientů. Diabetes mellitus je onemocnění, které se projevuje vysokou hladinou glukózy z důvodu nedostatečného působení inzulínu. Je spojeno s řadou dalších zdravotních komplikací. Jednou z nich jsou špatně se hojící rány, zvláště dolních končetin, které v mnoha případech končí amputací.

Naším cílem bylo zjistit, jak se mění exprese vybraných typů matrix metaloproteináz a jejich inhibitorů v průběhu hojení kožních excizních ran a zda jsou rozdíly v expresi mezi zdravými a diabetickými zvířaty. Jako model jsme vybrali potkany Zucker Diabetic Fatty.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Matrix metaloproteinázy

1.1.1 Obecná charakteristika

Matrix metaloproteinázy (MMP) patří do velké rodiny enzymů metaloproteináz, která dále zahrnuje skupiny astacinů, disintegrin metaloproteináz (ADAM) a disintegrin metaloproteináz s trombospondinovou částí (ADAM-TS) (Mott at Werb, 2004). MMP jsou enzymy obsahujících ve své struktuře Zn^{2+} (Parks, 1999). Existuje jich více než 20 MMP u lidí a jsou objeveny další. Jsou u obratlovců, octomilek, červů, nezmarů i rostlin (Lennarz et Lane, 2004). Matrix metaloproteinázy (matrixiny) vykazují společné vlastnosti (Parks, 1999):

1. Přítomnost Zn^{2+} v aktivním místě
2. Schopnost štěpit alespoň jeden protein extracelulární matrix
3. Syntéza v inaktivní podobě ve formě zymogenu
4. V inaktivní podobě se na Zn^{2+} váže cysteinová oblast
5. Regulace probíhá pomocí tkáňových inhibitorů (TIMPs)

Až na dvě výjimky (MMP-2, MMP-7) se matrixiny zásadně neuvolňují v nepoškozené tkáni (Parks, 1999). Početné studie ukazují na jejich klíčovou roli během embryonálního vývoje organismu, ovulace, hojení ran, remodelace kostí, angiogeneze, apoptózy, růstu nervů (Lennarz et Lane, 2004). Můžou být sekretovány z různých typů buněk nebo se nachází na buněčných površích (Pirilä et al., 2003). Sekretované enzymy jsou produkovány neutrofilů, makrofágy, fibroblasty, keratinocyty v inaktivní podobě a pro plné působení musí být aktivovány (Grofová, 2006).

K aktivaci odštěpením malé části řetězce zymogenu dochází vlivem vnějších signálů (cytokinů, růstových faktorů, hormonů, interakcí matrix-buňka nebo interakcí buňka-buňka). Jejich řízená aktivace je nezbytná, jinak by docházelo k nekontrolovanému štěpení vlastních bílkovin. Optimálně MMPs fungují za fyziologického pH (Grofová, 2006).

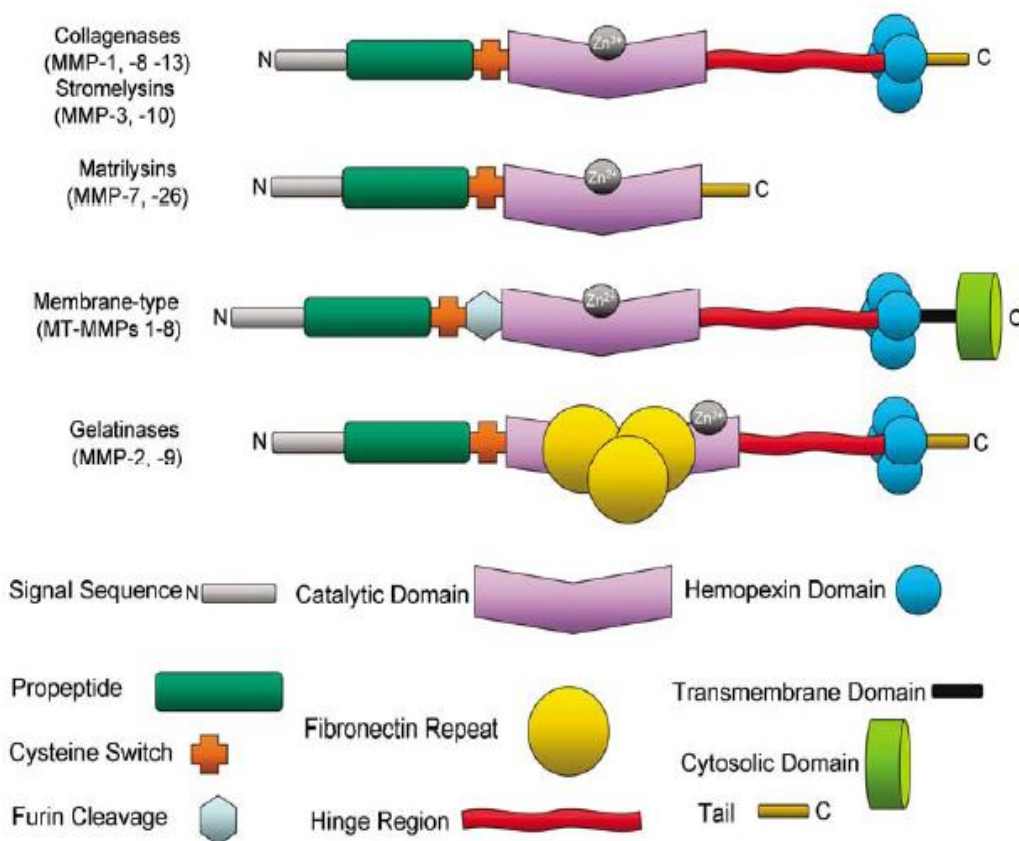
1.1.2 Struktura

MMP se dělí do několika skupin podle jejich substrátové specifity a primární struktury (Lennarz et Lane, 2004).

1. Kolagenázy (MMP-1, 8, 13, 18)
2. Gelatinázy (MMP- 2, 9)

3. Stromelysiny (MMP- 3, 10, 11)
4. Matrilysiny (MMP- 7, 26)
5. MMPs membránového typu (MMP - 14, 15, 16, 17, 24, 25)
6. Další MMP (MMP- 12, 19, 20, 21, 23, 27, 28)

MMP jsou tvořeny signálním peptidem, propeptidem, katalytickou doménou obsahující vysoce konzervativní vázající místo pro zinek a vápenaté ionty, otáčivou oblast a hemopexinovou doménu viz obr. č. 1. Katalytická doména udržuje trojrozměrnou strukturu MMP (Chakraborti et al., 2003). Želatinázy (MMP-2 a MMP-9) obsahují navíc fibronectin typu II v katalytické doméně. U matrilysinu (MMP-7) chybí hemopexinová doména. MT-MMP mají kromě zmiňovaných částí transmembránovou doménu v hemopexinové doméně (Kähäri, 1997). Primární struktura matrixinů je odvozena od kolagenázy 1 (MMP-1) (Lennarz et Lane, 2004). Katalytická



Obr. č. 1 Rozdělení enzymů dle struktury (zdroj: Chow et al., 2007)

Jednotlivé enzymy z dané skupiny se od sebe liší substrátovou specifitou (tab. č. 1).

Tab. č. 1 Rozdělení MMP podle jejich substrátové specifity

(zdroj: http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00003/BTN_A_05381RV01_O_3930a.pdf)

Table 1. Members of the MMP Family

Subgroup	MMP	Name	Substrate
1. Collagenases	MMP-1	Collagenase-1	Col I, II, III, VII, VIII, X, gelatin
	MMP-8	Collagenase-2	Col I, II, III, VII, VIII, X, aggrecan, gelatin
	MMP-13	Collagenase-3	Col I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatin
2. Gelatinases	MMP-2	Gelatinase A	Gelatin, Col I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gelatinase B	Gelatin, Col IV, V
3. Stromelysins	MMP-3	Stromelysin-1	Col II, IV, IX, X, XI, gelatin
	MMP-10	Stromelysin-2	Col IV, laminin, fibronectin, elastin
	MMP-11	Stromelysin-3	Col IV, fibronectin, laminin, aggrecan
4. Matrilysins	MMP-7	Matrilysin-1	Fibronectin, laminin, Col IV, gelatin
	MMP-26	Matrilysin-2	Fibrinogen, fibronectin, gelatin
5. MT-MMP	MMP-14	MT1-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-15	MT2-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-16	MT3-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogen, fibrin
	MMP-24	MT5-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-25	MT6-MMP	Gelatin
6. Others	MMP-12	Macrophage metalloelastase	Elastin, fibronectin, Col IV
	MMP-19		Aggrecan, elastin, fibrillin, Col IV, gelatin
	MMP-20	Enamelysin	Aggrecan
	MMP-21	X MMP	Aggrecan
	MMP-23		Gelatin, casein, fibronectin
	MMP-27	CMMP	Unknown
	MMP-28	Epilysin	Unknown

MMPs are categorized according to the organization of their peptide domains, their substrate specificity, and their sequence similarity (8,12,17,22–24,85–87). MMP, matrix metalloproteinase; MT-MMP, membrane-type matrix metalloproteinase.

1.1.3 Regulace aktivity matrix metaloproteináz

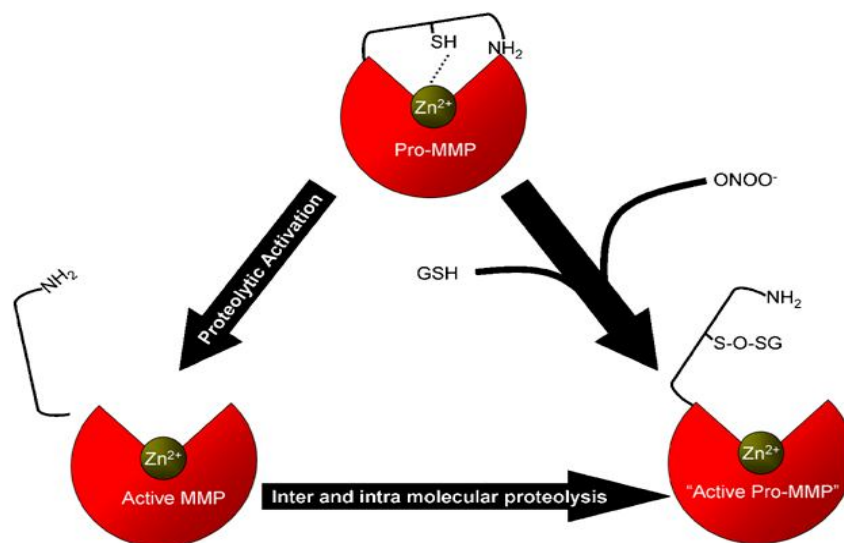
Aktivita metaloproteináz může být regulována různými mechanismy (Moses et al. 1996):

1. na úrovni transkripce
2. v zymogenní formě
3. pomocí inhibice jejich proteolytické aktivity (specifická a nespecifická)

Na transkripční úrovni se do procesu zapojuje množství stimulatorů jako cytokiny a růstové faktory např. interleukin 1 (IL-1), růstový faktor z destiček (platelet-derived growth factor – PDGF) nebo tumor-nekrotizující faktor alfa (TNF- α). Na druhé straně působí inhibitory transkripce: transformující růstový faktor beta (TGF- β), heparin, steroidy, retinoidy nebo interleukin 4 (IL-4), které proces transkripce blokují (Maresch, 2006).

Většina MMP je produkována a vylučována v mnoha buňkách v inaktivní formě a pro plné působení musí být aktivována (Grofová, 2006). Aktivace MMP je závislá na cysteinovém spínači, tvořeným vazbou cysteinu v propeptidu se zinkem v katalytickém místě (Kähäri, 1997). Pokud dochází k vytvoření vazby mezi cysteinem a Zn^{2+} dojde k zablokování

aktivního místa enzymu a substrát nebude navázán a následně štěpen. Rozpojení této vazby vede k aktivaci enzymů. Molekula vody se poté naváže na Zn^{2+} a nahrazuje cysteinový zbytek po disociaci (Snoek-Van Beurden et Von Den Hoff, 2005). Aktivaci metaloproteináz *in vitro* mohou vyvolat thiol-modifikující činidla, sloučeniny rtuti, kyslíkové radikály, různá denaturující činidla a podmínky jako nízké pH a vysoká teplota (Nagase, 1999). Za fyziologických podmínek (*in vivo*) je propeptid odštěpen pomocí proteáz (nejčastěji plazminem) nebo oxidativním stresem viz obr. č. 2 (Chow et al., 2007).



Obr. č. 2 Přerušení kovalentní vazby mezi cysteinem v propeptidu a Zn^{2+} vedoucí k aktivaci MMP (zdroj: Chow et al. 2007)

Proteolytická aktivita MMP je inhibována nespecifickými inhibitory (např. α 2-makroglobulinem, α 1-antiproteázou) stejně dobře jako specifickými inhibitory (tkáňovými inhibitory metaloproteináz - TIMP) (Tarnuzzer et Schultz, 1996). TIMP se vážou na aktivované MMP v poměru 1:1 podle stechiometrie a inhibují jejich aktivitu. Skupiny tkáňových inhibitorů (TIMP) zahrnuje 4 členy TIMP-1, -2, -3 a TIMP-4 (Gill et Parks, 2008). TIMP-1 a -2 jsou vylučovány v rozpustné formě, kdežto TIMP-3 se asociuje s extracelulárním matrix (ECM). Tkáňové inhibitory se liší hlavně v rozdílné inhibici aktivovaných MMP. TIMP-1 inhibuje aktivitu většiny MMP s výjimkou MT1-MMP a MMP-2. TIMP-2 také inhibuje téměř všechny MMP až na MMP-9. Oproti tomu TIMP-3 inhibuje aktivitu pouze těchto enzymů: MMP-1, -2, -3, -9 a -13 (Kähäri, 1997).

Tab. č. 2 Inhibice MMP pomocí TIMP zdroj: (Woessner et Nagase, 2000)

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
MMP-1	x	x	x	x
MMP-2	x	x	x	x
MMP-3	x	x	x	x
MMP-7	x	x	x	x
MMP-8	x	x	-	-
MMP-9	x	x	x	x
MMP-10	x	x	-	-
MMP-11	x	-	-	-
MMP-12	x	-	-	-
MMP-13	x	x	x	-
MMP-14	NO	x	x	-
MMP-15	-	x	x	-
MMP-16	x	x	-	-
MMP-17	-	-	-	-
MMP-18	-	-	-	-
MMP-19	-	x	-	-
MMP-20	-	-	-	-

x, inhibition has been observed; -, not studied

1.1.4 Lokalizace matrix metaloproteináz

Různé MMP jsou produkovány různými typy buněk, na různých místech a v odlišném čase. V tabulce č. 3 je příklad distribuce MMP během hojení ran v různých vrstvách kůže.

Tab. č. 3 Lokalizace MMP (zdroj: Parks, 1999)

Název enzymu	Produkující buňky	Lokalizace
Intersticiální kolagenasa (MMP-1)	Mononukleární fagocyty, eozinofily	epidermis, dermis, buňky zánětu
Neutrofilová kolagenasa (MMP-8)	Neutrofilly, eozinofily	buňky zánětu
72-kDa želatinasa (MMP-2)	Mononukleární fagocyty	dermis

92-kDa želatinasa (MMP-9)	Neutrofilny, mononukleární fagocyty	epidermis, buňky zánětu
Stromelysin-1, 2, 3 (MMP3,10, 11)	Mononukleární fagocyty	epidermis, dermis
Matrilysin (MMP-7)	Monocyty	
Metaloelastasa (MMP-12)	Makrofágy	buňky zánětu

1.1.5 Funkce matrix metaloproteináz

Matrixiny se účastní většiny procesů, které degradují proteiny extracelární matrix. Jsou spojovány s fyziologickými a patologickými procesy, ale jejich přesná úloha je stále do velké míry neprozkoumaná (Korpi, 2010). Podílejí se na ontogenetickém vývoji, morfogenezi, angiogenezi, růstu, hojení ran. Změnu exprese těchto enzymů pozorujeme i ve většině zánětlivých, degenerativních a maligních procesech (Kähäri, 1997).

Funkce při hojení ran

MMP degradují proteinové složky extracelulární matrix (ECM), čímž přispívají k opravám a její remodelaci během hojení. MMP se mohou podílet na hojení ran mnoha různými způsoby. Mají vliv na (Kähäri, 1997):

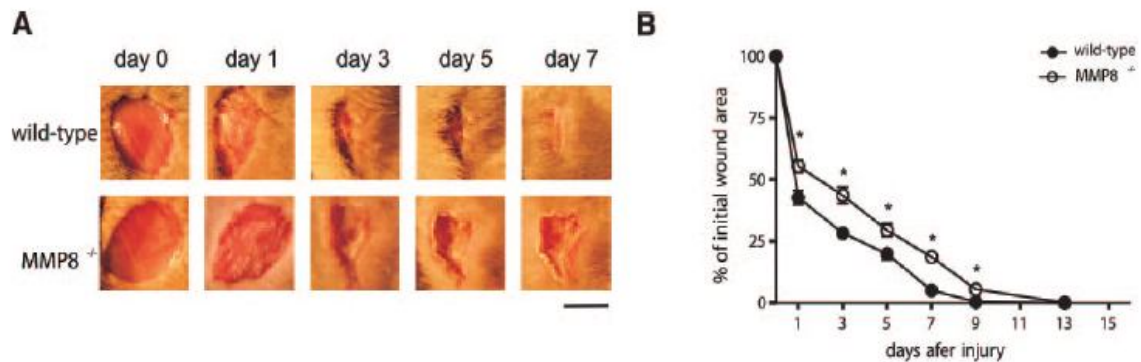
1. odstranění odumřelých tkání
2. epidermálně-mesenchymatické interakce během migrace keratinocytů
3. angiogenezi (novotvorbu cév)
4. remodelaci nově syntetizované granulační tkáně během maturace
5. regulaci určitých růstových faktorů

1.1.6 Vybrané matrix metaloproteinázy

MMP-8 (kolagenáza-2, neutrofilní kolagenáza)

Patří spolu s MMP-1 a MMP-13 mezi kolagenázy. Je produkována neutrofilny, kde se soustřeďuje v granulích. Tyto granula jsou po aktivaci buněk uvolňována (Fernández et al., 2007). Všechny kolagenázy jsou schopny štěpit kolageny typu I, II, III, V. Fibrilární kolagen typu I je štěpen na 2 molekuly $\frac{3}{4}$ a $\frac{1}{4}$ fragmenty, které denaturují při teplotě 37 °C na želatinu, která dále může být štěpena jinými MMP (MMP-2, MMP-9). Neutrofilní kolagenáza štěpí kolagen typu I neefektivněji (Zítka, 2008). Ztráta MMP-8 u myši poukazuje na zhoršené hojení ran, což naznačuje důležitost tohoto enzymu viz obr. č. 3. Spolu s MMP-9

údajně kooperují a vytvářejí stabilní a specifický komplex *in vivo* a podílejí se významně na procesu hojení. Spekuluje se o tom, že MMP-8 má ochranný účinek proti rakovině kůže (Fernandéz et al., 2007).



Obr. č. 3 Ztráta MMP-8 ukazuje na zhoršené hojení ran u myší (zdroj: Fernandéz et al., 2007)

MMP-13 (kolagenáza-3)

MMP-13 se řadí mezi kolagenázy. Jednotlivé kolagenázy se od sebe liší různým stupněm degradace jednotlivých substrátů. MMP-13 štěpí mnohem efektivněji kolagen typu II než typ I a III a má většinou silnější želatinolytickou aktivitu než MMP-1 a MMP-8. MMP-13 má širokou škálu substrátů, navíc štěpí i kolagen typu IV, IX, X, XIV a obrovský tenascin C a fibronectin (Kähäri, 1997). Kolagenáza-3 u hlodavců je považována za homolog kolagenáza-1 (MMP-1) u lidí (Hemmann et al., 2007).

MMP-2 (želatináza-A, 72-kDa želatináza)

MMP-2 patří do skupiny želatináz spolu s MMP-9. Minimální množství je produkováno i v neporušené kůži, což je u MMP výjimkou (Parks, 1999). Je exprimována epidermálními keratinocyty a kožními fibroblasty. O MMP-2 a MMP-9 se míní, že hrají důležitou úlohu ve finální degradaci fibrilárních kolagenů po předchozích štěpení kolagenázami. Oba typy enzymů mají také kolagenolytickou aktivitu. MMP-2 štěpí nativní kolagen typu I. MMP-2 a MMP-9 hrají důležitou úlohu v remodelaci kolagenů extracelulárního matrix (ECM) (Kähäri, 1997). Patří také mezi nejčastěji vyskytující se enzymy podílející se na nádorových invazích a metastázách (Endo et al., 2003).

MMP-9 (želatináza-B, 92-kDa želatináza)

Je exprimována keratinocyty a ukládána v neutrofilních a eozinofilních granulích. Spolu s MMP-2 hraje důležitou roli v remodelaci tkání. Degraduje podobné substráty jako

želatináza-A a navíc štěpí kolagen typu II a V (Kähäri, 1997). Zvýšená exprese obou těchto enzymů se vyskytuje u invazivních a vysoce karcinogenních onemocnění (Zítka, 2008). Prostředí s vysokou expresí MMP-9 v ráně může svědčit o zánětu a špatném hojení ran (LIU et al., 2009).

MMP-3 (stromelysin-1)

MMP-3 patří do skupiny stromelysinů. Je exprimován keratinocyty a fibroblasty u akutních a chronických ran. Degraduje širokou škálu substrátů zahrnující fibronectin, kolageny typů IV, V, IX a X, elastin, lamininy, gelatiny, proteoglykany. Strukturou a funkcí je úzce spjat s MMP-10. MMP-3 není pravděpodobně potřeba pro reepitelizaci, ale pro rekonstrukci nově vytvořené bazální membrány. Během hojení ran jsou MMP-3 spolu s MMP-1 exprimovány dermálními fibroblasty a účastní se formování a odstraňování granulační tkáně a mají podíl na tvorbě jizvy (Kähäri, 1997). MMP-3 je zodpovědný za počáteční zahájení kontrakce rány (Fernandéz et al., 2007).

MMP-10 (stromelysin-2)

MMP-10 je produkován stejně jako MMP-3 keratinocyty a fibroblasty. MMP-10 může plnit úlohu v superaktivaci spolu vylučovaných kolagenáz a pomoci usnadnit keratinocytům migraci štěpením nekolagenázových matrixových molekul. Má i podobnou strukturu a substrátovou specifitu jako MMP-3. Je aktivován tryptázami a elastázami. Aktivuje MMP-8, MMP-13, MMP-1 (Kähäri, 1997).

MMP-12 (makrofágová elastáza)

Produkují ji makrofágy a stromatické buňky placenty. Makrofágová metaloelastáza štěpí kolagen IV, fibronectin a elastin (Kähäri, 1997). MMP-12 se objevuje u granulomatózního onemocnění kůže pomáhá makrofágům migrovat přes epidermis a cévní bazální membránu u zánětlivých onemocnění (Vaalamo et al., 1999). Může být také nalezena v chondrocytech a osteoklastech (Nagase, 2006).

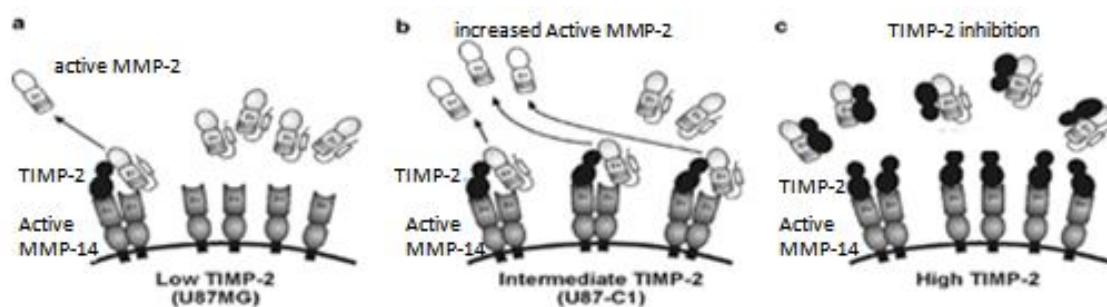
MMP-7 (matrilysin-1)

Matrilysin-1 je nejmenší MMP, chybí jí otáčivá oblast a hemopexinová doména (Reunanen et Kähäri, 2000-2011). MMP-7 má širokou substrátovou specifitu, štěpí fibronectin, lamininy, entaktiny, kolagen typu IV a proteoglykany (Kähäri, 1997). Je aktivně exprimována dukální epitelem ve všech potních a vylučovacích žlázách (Parks, 1999). Je aktivován

plazminem a MMP-3 a podílí se na aktivaci MMP-2 (Kähäri, 1997). MMP-7 má hlavní úlohu během reepitelizace. MMP7 je exprimována epitelem poškozených (Dunsmore et al., 1998).

MMP-14 (MT1-MMP)

MMP-14 náleží mezi membránové typy MMP. Exprimuje se v mnoha typech buněk (epiteliálních, nádorových buněk a fibroblastů) a to v podobě dimeru (Lennarz et Lane, 2004). Na její aktivaci se podílí plazmin. Je upevněná k cytoplazmatické membráně pomocí transmembránové části, tudíž hraje důležitou roli na buněčných površích. Podílí se na mnoha chorobných procesech, jako jsou nádorové invaze, patologická angiogeneze, revmatoidní artritida, ateroskleróza a záněty (Endo et al., 2003). Podporuje migraci buněk, tím že štěpí složky ECM včetně kolagenu I, II, III, laminin-1, 5, fibronektin, vitronectin, fibrin, a agrekany a to jako jediný zakotvený enzym. Nepodílí se pouze na degradaci ECM, ale podílí se také na aktivaci proMMP-2 a proMMP-13. Nejvíce je prozkoumaná aktivace proMMP-2 viz obr. č. 4. Touto aktivací dochází dále ke štěpení kolagenu IV (bazální membrány). K aktivaci jsou vyžadovány alespoň 2 molekuly MMP14. Přičemž jedna je inhibována TIMP-2, čímž dojde k vytvoření komplexu přes aktivní místo v katalytické doméně enzymu a N-terminální doménou inhibitoru. C-terminální částí inhibitoru má afinitu k hemopexinové části enzymu pro-MMP-2. Výsledkem se stává třídílný komplex MMP-14-TIMP-2-proMMP-2 na povrchu buněk. Druhá molekula MMP-14, která je volná proteolyticky aktivuje pro-MMP-2 v komplexu (Itoh, 2006).



Obr. č. 4 Aktivace a inhibice MMP- 2 pomocí komplexu MMP14 a TIMP-2
(Zdroj: http://www.nature.com/labinvest/journal/v84/n1/fig_tab/3700003f10.html)

TIMP-1

TIMP-1 inhibuje aktivitu většiny MMP s výjimkou MT1-MMP a MMP-2. TIMP-1 tvoří komplex přednostně s MMP-9 (Stamenkovic, 2003). Inhibuje také ADAM-10. U TIMP-1 a TIMP-2 deficientních myší nebyly zaznamenány žádné abnormality (Nagase, 2006).

TIMP-2

TIMP-2 je jeden ze zástupců tkáňových inhibitorů, jehož pomocí lze regulovat aktivitu některých MMP. Vylučuje se v rozpustné formě. TIMP-2 inhibuje téměř všechny MMP až na MMP-9. Inhibiční kapacita TIMPs závisí na jejich schopnosti vázat se na katalytické místo aktivovaných MMP s jejich N-terminálním konci (Kähäri, 1997). Zajímavostí je, že TIMP-2 je sekretován spolu s MMP-14 a vytváří třídílný komplex s MMP-14 a latentní MMP-2 (Hemmann et al., 2007). Tento komplex do jisté míry aktivuje či inhibuje aktivitu MMP-2. Závisí to na množství navázaného TIMP-2 viz obr. č. 4 (LU et al., 2004).

1.2 Hojení ran

Hojení ran je dynamický interaktivní proces. Probíhá podle relativně jednoduchého modelu, ale řízení procesu je složité (Grofová, 2006).

Za ránu se považuje každé porušení souvislosti kůže, sliznice nebo povrchu některého orgánu vzniklé působením vnějších vlivů (Wald, 2002). Rány lze rozdělit na akutní a chronické.

Akutní rána je porušení integrity tkání těla vzniklé v důsledku fyzikálního nebo mechanického poškození. Vznikají ve zdravé kožní tkáni, hojí se obvykle v krátkém čase a bez komplikací. Jejich příčinou je nejčastěji úraz nebo chirurgický zákrok.

Jako chronická rána se označuje sekundárně se hojící rána, která i přes adekvátní léčbu nemá po dobu 4 týdnů tendenci se hojit. Chronické rány se hojí výstavbou nové tkáně (hojení „per secundam“) s odpovídající anatomickou strukturou, proto doba hojení je zpravidla dlouhá a individuálně podmíněná příčinou a rozsahem poškozené tkáně. Chronické rány mohou vzniknout i z ran akutních (<http://www.hojeni-ran.cz/chronicke-rany>).

1.2.1 Fáze hojení rány

Hojení se účastní jak buňky (neutrofil, lymfocyty, mastocyty, monocyty, makrofágy, fibroblasty, keratinocyty, endotel), tak cytokiny, růstové faktory a proteázy, zejména skupina matrixových metaloproteáz a jejich tkáňové inhibitory (Grofová, 2006).

Hojení ran je charakterizováno několika fázemi (Nečas, 2005):

1. Hemostáza

Při poškození tkáně dochází k narušení cév a k úniku krevních elementů viz obr. č. 5a. Reakcí na tento jev dochází k vazokonstrikci, která spolu s koagulem zajišťuje hemostázu (zástavu krve) viz obr. č. 5b. Na tomto ději se podílejí hlavně trombocyty, jejichž agregace a degranulace je zdrojem dalších důležitých látek pro tvorbu provizorní matrix. Součástí matrix

jsou glykoproteiny uvolněné z trombocytů, vlákna fibrinu, plazmatického fibronektinu, vitronektinu a trombospodinu. Z trombocytů se také uvolňuje růstový destičkový faktor (PDGF), transformující růstový faktor alfa (TGF- α) a transformující růstový faktor beta (TGF- β). Mezi další látky uvolněné opět z trombocytů patří chemokiny např. IL-8, které lákají do sraženiny neutrofilů a makrofágy (Nečas, 2005). Po vazokonstrikci dochází k lokální vazodilataci, jež napomáhá migraci zanětlivých buněk do poškozené oblasti. Hojení poté přechází do druhé fáze – fáze časného zánětu (Fejfarová, 2007).

2. Zánět

Zánět se projevuje lokálním zvýšením teploty (calor), zarudnutím (rubor), otokem (tumor) a bolestivostí (rubor) v místě poranění (Hořejší a Bartůňková, 2005). Prvním typem buněk podílejících se na lokální zánětlivé odpovědi jsou neutrofilů (PMN), které se do místa poranění dostávají diapedézou (přestupem buněk skrz stěnu cév) a jsou přítomny asi týden viz obr. č. 5c. Tyto buňky brání vzniku infekce v místě poranění díky své schopnosti fagocytovat a tvořit kyslíkové radikály (ROI). Jejich hlavní funkcí v procesu hojení je uvolňování proteolytických enzymů např. kolagenáz, elastáz, proteinázy-3, katepsinu-G (Nečas, 2005). Neutrofilů pomocí těchto enzymů rozrušují poškozenou tkáň. Mohou také aktivovat fibroblasty a epitelové buňky (Derrick, 2008). Po jednom či dvou dnech se začínají hromadit v místě poranění monocytů, které se následně přemění na tkáňové makrofágy viz obr. č. 5d. Opět produkují proteinázy (kolagenázy, metaloelastázy, želatinázy-B, stromelysiny) a jsou dále zdrojem růstových faktorů a fibronektinu. Během této fáze dochází ke změně složení provizorní matrix, kdy původní krevní sraženina podléhá fibrinolýze a mění se v hmotu obsahující tenascin, osteopontin, osteonektin, glykosaminoglykany, hyaluronan a buněčnou formu fibronektinu (Nečas, 2005).

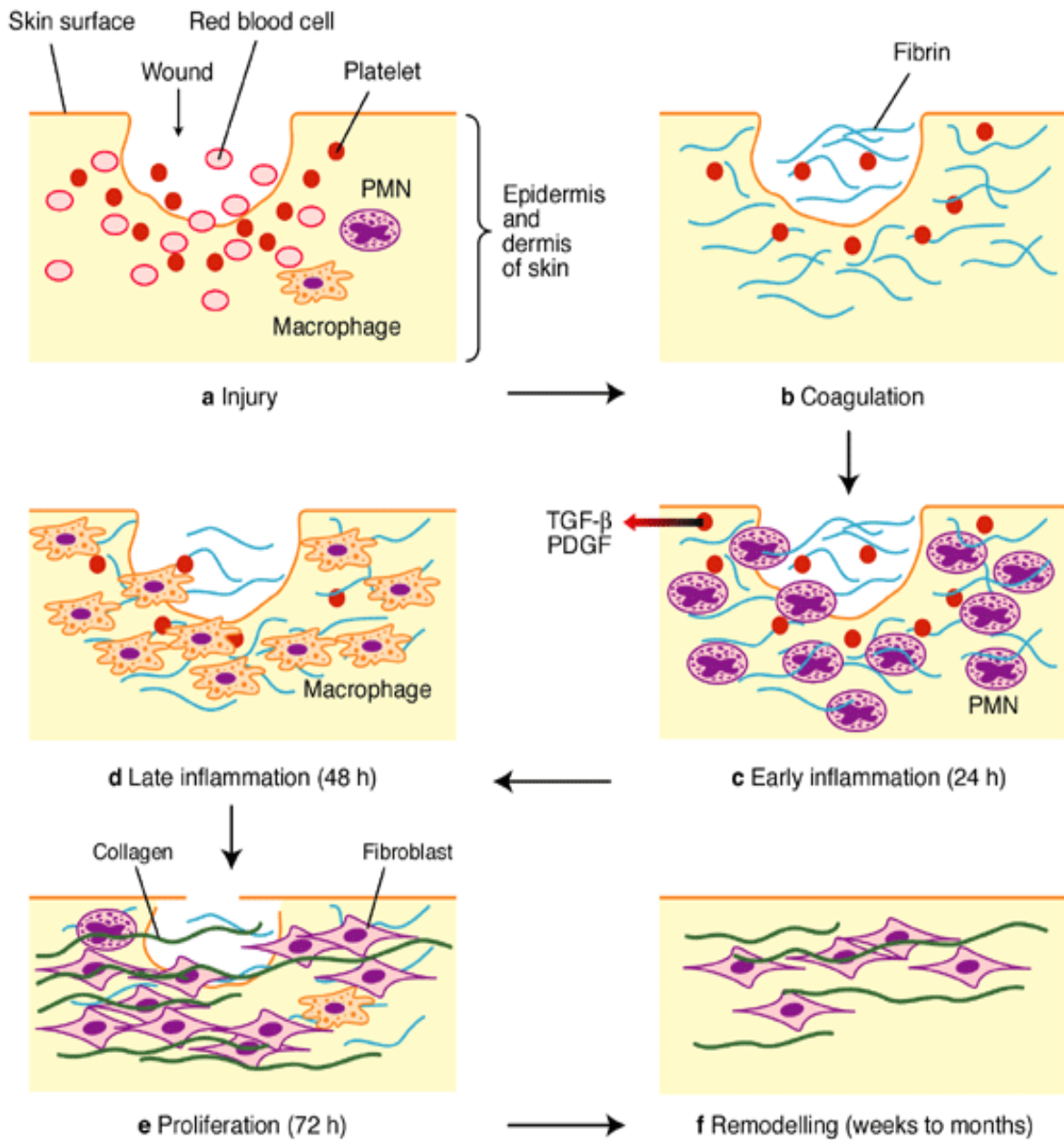
3. Proliferační fáze

Do této fáze lze zahrnout procesy fibroplazie, angiogeneze a epitelizace. Tyto fáze se vzájemně překrývají. Fáze fibroplazie a angiogeneze začínají po třech až čtyřech dnech. Přibližně s těmito fázemi začíná probíhat proces epitelizace. Provizorní matrix se postupně změní v granulační tkáň. Tento děj vrcholí mezi sedmým a desátým dnem. Do provizorní matrix migrují mesenchiální buňky charakteru fibroblastů, které jsou zdrojem kolageních vláken, nejdříve typu III a později typu I, čímž je zahájena fibroplazie viz obr. č. 5e. Ta většinou vrcholí mezi sedmým až čtrnáctým dnem. Tvorbu kolagenu zvyšuje růstový faktor TGF- β prostřednictvím svých receptorů přítomných na fibroblastech. Mezi hlavní producenty

TGF- β patří především makrofágy. Fibroblasty v granulační tkáni obsahují kontraktilní vlákna aktinu, desminu a vimentinu. Předpokládá se, že se podílejí na kontrakci rány (Nečas, 2005). Angiogeneze (proliferace a migrace endotelií v ráně) je stimulována růstovými faktory, hypoxií a zvýšenou hladinou laktátu (Fejfarová, 2007). Proces epitelizace začíná probíhat v místě, kde byla narušena bazální membrána epitelu. Při poranění kůže jsou zdrojem reepitelizace bazální keratinocyty. Tyto buňky se stanou producentem metaloproteináz (kolagenáz, želatináz-B a stromelyzinů). Bazální keratinocyty se změní v migrující a proliferující epitelální buňky během několika hodin. Pokud během poranění zůstala částečně zachována kožní adnexa (vlasové folikuly, mazové a potní žlázy), vytvářejí se ostrůvky, ze kterých se epitelizace šíří všemi směry. Pokud v ráně nenacházíme zbytky těchto adnex, probíhá epitelizace z okrajů rány. Růstové faktory hrají také důležitou roli v reepitalizaci rány. Tato fáze většinou končí během sedmi až deseti dnů (Nečas, 2005).

4. Fibrotizace a tvorba jizvy

Po desátém dni dochází k procesu fibrotizace, kdy přibývá v granulační tkáni množství kolagenu typu I, vytváří se jejich svazky orientovány v závislosti na působení mechanických sil. Dále dochází k jejich spojování. Tento děj trvá po několik měsíců či let a je citlivý na vitamín C (Nečas, 2005). Za pomoci kolagenních vláken se rána zpevňuje a mění se v jizevnatou tkáň. Jizva má však jen 70% pevnosti původní tkáně (Grofová, 2006). Během epitelizace vzniká tenká, na cévy chudá tkáň, která postrádá kožní žlázy, pigmentové buňky a nervová zásobení. Epitelizace povrchové rány a tvar budoucí jizvy závisí na tvaru poranění (Nečas, 2005). Kruhová rána se ve středu hůře epitelizuje než čtvercová (Kelnarová, 2009).



The phases of cutaneous wound healing

Obr. č. 5 Jednotlivé fáze hojení ran

(Zdroj: http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_08/S1462399403005817sup002.htm)

1.2.2 Zhoršené hojení ran

Porucha hojení ran může mít příčinu jednak v samotném místě rány a jejím bezprostředním okolí (lokální), nebo může být příčina v onemocnění jiných systémů (systémová) (Wald, 2002).

Mezi lokální příčiny poruchy hojení lze zařadit:

- infekce v ráně
- otok
- ischemie
- cizí těleso v ráně
- dříve poškozená tkáň (jizevnatá, ozářená)
- a další

Mezi systémové příčiny poruchy hojení patří:

- cévní poruchy (ateroskleróza)
- metabolické (diabetes mellitus, obezita, malnutrice)
- nádorová onemocnění (včetně chemo- a radioterapie)
- hematologické poruchy
- nedostatek vitamínu C
- chronické infekční onemocnění (AIDS, TBC, syfilis)
- farmakologické příčiny (imunosupresiva, kortikoidy apod.)
- vysoký věk

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je onemocnění, které se projevuje vysokou hladinou glukózy z důvodu nedostatečného působení inzulínu. Inzulín, hormon vznikající ve slinivce břišní v beta buňkách Langerhansových ostrůvků, působí v látkové přeměně především cukrů, ale i tuků a bílkovin. Podle příčiny rozlišujeme základní dva typy - diabetes mellitus 1. typu (DM1T) a diabetes mellitus 2. typu (DM2T) (Rybka, 2007).

DM2T patří mezi nejčastější metabolickou poruchu, která se vyznačuje jednak rezistencí na inzulín a jednak nadprodukcí kontrainsulinárně působících hormonů. Oproti DM1T nejde o primární zničení beta buněk slinivky břišní. Rezistence na inzulín je způsobena buď úbytkem počtu inzulínových receptorů nebo postreceptorovou bloádou. Do této skupiny patří kolem

90 % diabetiků. Na vývoj diabetu mají vliv genetické i exogenní faktory. Mezi ně patří (Rybka, 2007):

- zvýšený příjem kalorií
- špatné složení potravy
- nedostatečná aktivita
- zvýšené procento obezity
- kouření a jiné návyky

1.3 Polymerázová řetězová reakce

PCR (polymerázové řetězové reakce) byla vyvinuta v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii. Zasloužil se o to Kary B. Mullis, který demonstroval, že oligonukleotidy mohou být specificky použity k namnožení milionů kopií definovaného úseku genové DNA. V roce 1993 byl oceněn Nobelovou cenou za chemii (Pačes, 1994).

PCR se dnes běžně využívá v klinických laboratořích v nepřímé DNA diagnostice a vyšetření polymorfismů, dále v kriminalistice a k určování biologických vztahů. PCR metoda je také nedílnou součástí výzkumných molekulárně-biologických laboratoří (Průša, 1997).

1.3.1 Princip metody polymerázové řetězové reakce

Polymerázové řetězové reakce (PCR) je enzymaticky řízený děj, který vede ke zmnožení jednoho nebo více určitých úseků DNA *in vitro*. K vybraným úsekům komplementárních vláken denaturované DNA vzorku se připojí krátké syntetické oligonukleotidy (primery), od nichž probíhá syntéza nové DNA zprostředkovaná DNA polymerázou. PCR je založena na opakování cyklů, které se podílejí na amplifikaci vybrané sekvence nukleové kyseliny. Každý cyklus je složen ze tří jednoduchých reakcí, které probíhají za stejných podmínek a liší se pouze hodnotou použité reakční teploty (Millar et al., 2007). Každý cyklus této reakce doprovázejí tři teplotní kroky:

1. Denaturace

Zahřátím DNA na teplotu kolem 95 °C se rozpadnou vodíkové můstky spojující purinové a pyrimidinové báze vzájemně komplementárních nukleotidů, čímž jsou od sebe oddělovány jednotlivé řetězce DNA. Výsledkem tohoto procesu je jednořetězcová DNA (ssDNA). Ta v další fázi slouží jako matrix pro syntézu nového komplementárního řetězce (Pavlík, 2005).

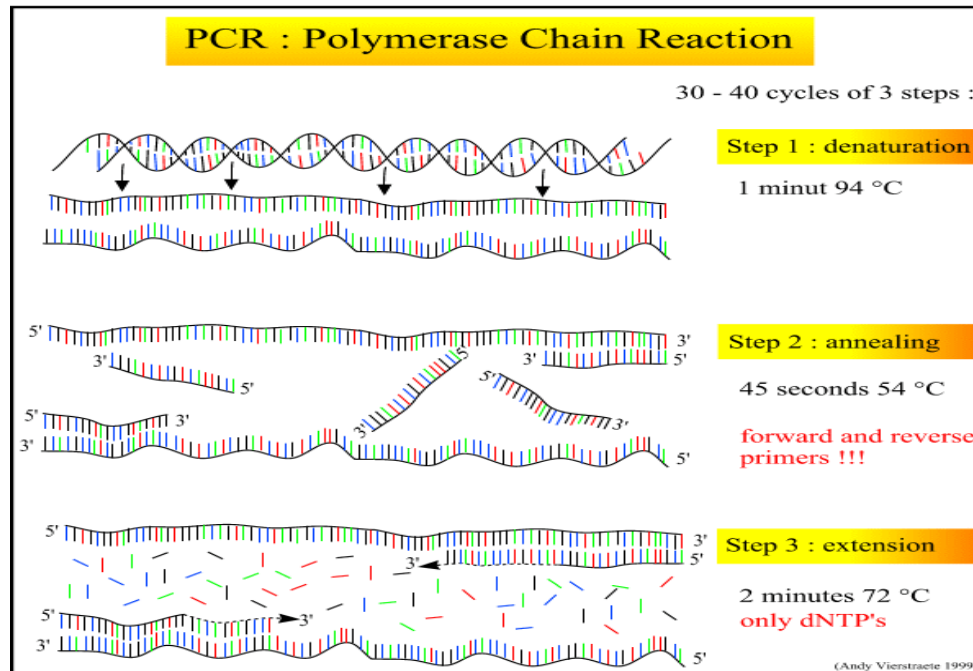
2. Annealing (navázání specifických primerů)

Annealing je proces hybridizace, tj. komplementární navázání specifických primerů na cílové sekvence matricového řetězce. Primery jsou syntetické oligonukleotidy (zpravidla 20 - 30 nukleotidů). Od jejich 3' konce začíná syntéza nového řetězce. Jednotlivé nukleotidy jsou přiřazovány podle komplementarity bazí (A-T, C-G), propojení cukrů fosfodiesterickou vazbou do páteřního řetězce zajišťuje polymeráza (Pavlík, 2005). Místa vazby primerů vymezují oblast DNA, která bude v dalších cyklech amplifikována. Tato reakce probíhá při teplotách 40-65 °C (Kočárek, 2004).

3. Elongace (prodlužování řetězce DNA)

Tento enzymatický proces probíhá při teplotě 72 °C. Na 3'-OH konce navázaných primerů nasedá DNA-polymeráza, která k primerům připojuje nové nukleotidy (dNTP). Tím dochází k prodloužení řetězce ve směru 5'→3' (Kočárek, 2004).

Výsledkem procesu je nově vytvořený úsek dvouřetězcové DNA (dsDNA), tzv. amplikon (Pavlík, 2005). V každém cyklu dojde k dvojnásobnému zmožení přítomné matricové DNA a celkově k exponenciálnímu nárůstu množství DNA. Počet cyklů bývá kolem 20-35, což je pro většinu aplikací dostatečný počet (Krčmář a Břicháček, 1993). Z jedné jediné molekuly dsDNA vstupující do reakce vznikne v průběhu 30 cyklů až 1 073 741 824 amplikonů (Pavlík, 2005).



Obr. č. 6 Jednotlivé kroky v průběhu PCR (Zdroj: <http://users.ugent.be/~avierstr/pdf/PCR.pdf>)

1.3.2 Různé modifikace PCR

Vedle standardní PCR existují různé modifikace např.:

- Multiplex PCR

- RT - PCR
- Asymetrická PCR
- Kvantitativní PCR

Multiplex PCR (mnohonásobná PCR)

Mnohonásobná PCR je taková varianta PCR, kdy je do reakční směsi přidáno několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných sekvencí, což umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi (Šmarda, 2008).

RT-PCR

K polymerázové řetězové reakci lze jako templát použít také RNA. Tato takzvaná reverzní PCR (RT-PCR) využívá reverzní transkriptázu, která přepisuje RNA na DNA. Díky RT-PCR jsme získali citlivou metodu k určování aktivních genů v buňce. Tato metoda se využívá pro syntézu cDNA (Storchová, 1998).

Asymetrická PCR

Tato modifikace PCR umožňuje preferenční syntézu jenom jednoho vlákna z duplexu DNA tím, že jeden z primerů je v nadbytku. Jako produkt PCR tak vzniká jednovláknová DNA vhodná např. pro sekvenování. Jinou modifikací je SSPR (single strand producing reaction), která je ještě specifitější Tato metoda se užívá např. při automatickém sekvenování.

Kvantitativní PCR

využívá externě přidanou referenční DNA o přesně známém množství. Cílová i referenční DNA využívá stejné primery a na základě porovnání amplifikovaných produktů lze kvantifikovat cílovou DNA. Druhou možností je použití endogenního standardu, tzv. housekeepingového genu, který se množí ze stejného templátu a jehož exprese je za daných podmínek stále stejná. Srovnáním obou produktů můžeme kvantifikovat DNA, která nás zajímá (Holasová et al., 2006).

Při kvantitativním stanovení DNA/RNA lze dále metody rozdělit do dvou skupin:

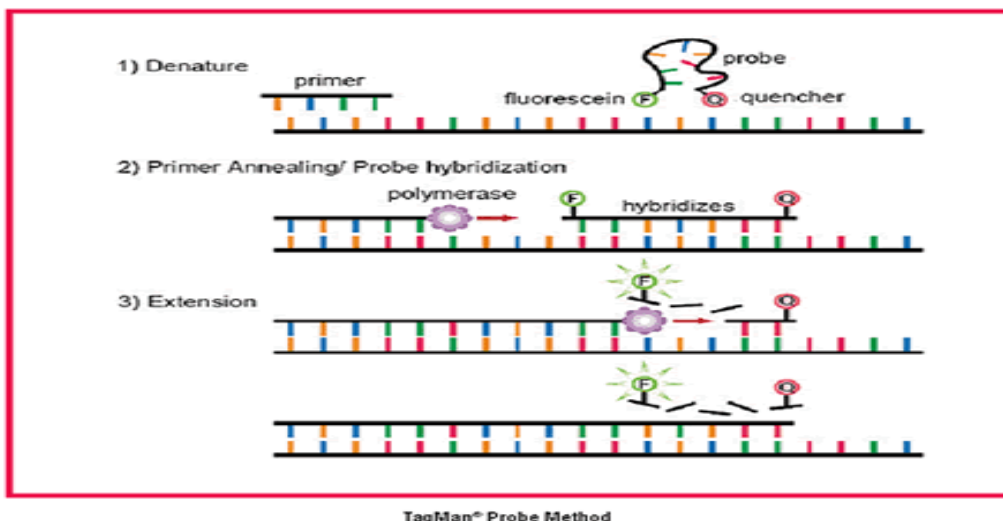
- End point - PCR, tj. metody, při kterých dochází k měření až skončení PCR
- Real-time - PCR, tj. při kterých dochází ke kontinuálnímu měření v průběhu PCR

Obecně lze říci, že metody real-time jsou mnohem více využívány než metody end-point a to hlavně díky širšímu rozsahu koncentrací, možnosti automatizovatelnosti a poněkud vyšší přesnosti a universálnosti (Holasová et al., 2006).

1.3.3 Real time RT-PCR

Real-time RT-PCR je metoda umožňující přesnou kvantifikaci hledané cDNA sekvence ve vzorku. Tato komplementární DNA vznikne reverzní transkripcí mediátorové RNA (mRNA) (Guénin et al., 2009).

Metoda real-time PCR (tzv. PCR v reálném čase) je založená na měření množství PCR produktu během amplifikace. Příkladem může být tzv. TaqMan PCR. Kromě primerů se do reakce vkládá další oligonukleotid (sonda), který dosedá na amplifikovaný úsek. Tento oligonukleotid je na jednom konci označený fluorescenční značkou (F) a na druhém konci tzv. zhášečem (Q) viz obr. č. 6. Pokud je fluorescenční látka v těsné blízkosti zhášeče, je její fluorescence potlačena. Vlastní PCR probíhá obvyklým způsobem až do okamžiku, kdy Taq polymeráza při syntéze nového řetězce narazí na značený nukleotid. V tom okamžiku jej začne vytěšňovat z templátového vlákna a štěpit jej. Taq polymeráza nemá opravnou 3'-exonukleázovou aktivitu, ale má 5'-exonukleázovou aktivitu, která umožňuje degradaci „překážejícího“ řetězce). Tím se uvolní fluorescenční sonda do roztoku a ve speciálním PCR cyklu je možné měřit fluorescenci přímo v destičce v průběhu amplifikace. Intenzita fluorescence je úměrná množství nasynthetizovaného PCR produktu (Udvardi et al., 2008; Guénin et al., 2009).



Obr. č. 7 Real time PCR (zdroj: <http://www.dnasequencing.com/wp-content/uploads/2011/04/Real-Time-Pcr.gif>)

Závěr

V průběhu hojení se exprese jednotlivých genů měnila. První den prudce vzrostla u MMP-8, -9 a TIMP-1 a vzápětí prudce klesla. Od pátého dne hojení narůstá exprese MMP-13, -2, -14 a TIMP-2. Desátý den je exprese vysoká u MMP-13, -2, -10, -14, -12 a TIMP-2 a přetrvává i v čerstvé jizvě, na rozdíl od MMP-9 a MMP-3, jejichž exprese desátý den také vzroste, ale potom opět klesá. Tyto výsledky opět zapadají do celkové tendence hojení, kdy v průběhu proliferační fáze je nutné v ECM uvolnit cestu migrujícím fibroblastům, keratinocytům, případně dalším buňkám. Následná remodelace a zpevňování jizvy probíhá pak i několik dalších měsíců, což je opět v souladu s naměřenými vysokými hodnotami exprese MMP štěpících kolagen.

Nezaznamenali jsme žádné významné rozdíly v expresi sledovaných genů mezi zdravými a diabetickými zvířaty. Při porovnání samců a samic byly hodnoty exprese v neporušené kůži vyšší u samců, ale 3. den hojení byly hodnoty exprese MMP-14 a TIMP-2 u samic zvýšené. V literárních pramenech se často dává do souvislosti špatné hojení ran u diabetických pacientů a zvýšené hodnoty exprese genů MMP i aktivity jejich proteinů a snížené hodnoty TIMP. To se v naší práci nepotvrdilo. Hojení diabetických ran je proces daleko složitější, komplexnější a určitě si vyžaduje další výzkum.

Použité zdroje informací:

1. DERRICK, Kathleen L, et al. Comparative analysis of global gene expression profiles between diabetic rat wounds treated with vacuum-assisted closure therapy, moist wound healing or gauze under suction. *International Wound Journal*. 2008, 5, s. 615-624.
2. DORSETT-MARTIN, Wanda A. . Rat models of skin wound healing: A review. *Wound Repair and Regeneration*. 2004, 6, s. 591–599.
3. DRAPER, Bradley K.; DAVIDSON, Mari K. ; NANNEY, Lillian B. MMPs a TIMP-1 are Differentially Expressed Between Acute Murine Excisional and Laser wounds. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2002, 30, s. 106-116.
4. DUNSMORE, Sarah E., et al. Matrilysin Expression and Function in Airway Epitheliu. *J. Clin. Invest* . 1998, 7, s. 1321–1331.
5. ENDO, Kazuhira , et al. Cleavage of Syndecan-1 by Membrane Type Matrix Metalloproteinase-1 Stimulates Cell Migration. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2003, 42, s. 40764–40770.
6. FERNÁNDEZ, Ana Gutiérrez, et al. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2. *The FASEB Journal*. 2007, 21, s. 2580–2591.
7. GILL, Sean E. ; PARKS, William C. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008, 40, s. 1334–1347.
8. GROFOVÁ, Zuzana. Biologie rány. *Česká geriatrická revue*. 2006, 4, s. 157-162. Dostupný také z WWW: <http://www.geriatricka-revue.cz/pdf/gr_06_03_05.pdf>.
9. GUÉNIN, Stéphanie , et al. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany*. 2009, 60, 2, s. 487-493.
10. HEMMANN, Stefanie , et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *Journal of Hepatology* . 2007, 46, s. 955–975.
11. *Hojení-Ran.cz* [online]. c2011 [cit. 2011-02-07]. Chronické rány. Dostupné z WWW: <<http://www.hojeni-ran.cz/chronicke-rany>>.
12. HOLASOVÁ, Šárka; RADILOVÁ, Hana; BUNČEK, Martin. *Praktická cvičení z molekulární genetiky*. Praha : Karolinum, 2006. 40 s. ISBN 8024610728.
13. HOŘEJŠÍ, Václav ; BARTUŇKOVÁ, Jiřina. *Základy imunologie*. Praha : Triton, 2005. 52 s.

14. CHAKRABORTI, Sajal, et al. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003, 253, s. 269–285.
15. CHOW, Ak.; CENA, J.; SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *British Journal of Pharmacology* . 2007, 152, s. 189-205.
16. ITOH, Yoshifumi . MT1-MMP: A Key Regulator of Cell Migration in Tissue. *IUBMB Life*. 2006, 58, s. 589 – 596.
17. KAHARI, Veli-Matti; SAARIALLIO-KERE, Ulpu. Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental dermatology*. 1997, 6, s. 199-213.
18. KELNAROVÁ, Jarmila, et al. Ošetřovatelství pro střední zdravotnické školy – 2. ročník. Praha: Grada , 2009. 134 s.
19. KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. Praha : Scientia, 2004. 211 s.
20. KORPI, Jarkko . *Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) in tongue squamous cell carcinoma, bone osteosarcoma, and wound repair*. OULU, 2010. 100 s. Dizertační práce. UNIVERSITY OF OULU.
21. KRČMÁŘ, Martin; BŘICHÁČEK, Beda. *Molekulárně biologické metody ve virologické diagnostice*. Brno : [s.n.], 1993. 87 s.
22. LAFLEUR, Marc A.; HANDSLEY, Madeleine M.; EDWARDS, Dylan R. Mechanism of pro-matrix metalloproteinase 2 (pro-MMP-2) activation. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2003, 5, s. 1. Dostupný také z WWW: <http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_23/S1462399403006628_sup007.pdf>.
23. LENNARZ, W.J.; LANE, M.D. *Encyclopedia of biological chemistry*. Oxford : Elsevier academic press, 2004. 657-665 s.
24. LEONARD, B. L. , et al. Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *ACTA DIABETOLOGICA*. 2005, 42, 4, s. 162-170.
25. LIU, Yu , et al. Increased Matrix Metalloproteinase-9 Predicts Poor Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care*. 2009, 32, s. 117–119.
26. LU, Kan V, et al. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Laboratory Investigation*. 2004, 84, s. 8-20. Dostupný také z WWW: <<http://www.nature.com/labinvest/journal/v84/n1/pdf/3700003a.pdf>>.

27. MADLENER, M. Differential expression of matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors in acute murine skin wounds. *Arch Dermatol Res.* 1998, 290, s. 24-29.
28. MAREŠCH, Martin, et al. Výduť břišní aorty: patofyziologie, diagnostika a léčba. *Kardioforum.* 2006, 3, s. 25-29. Dostupný také z WWW: http://www.kardiologickeforum.cz/pdf/kf_06_03_07.pdf.
29. MARX, Gerard ; MOU, Xiaode. Characterizing fibrin glue performance as modulated by heparin, aprotinin, and factor XIII. *J Lab Clin Med.* 2002, 140, s. 152-60.
30. MILLAR, Beverley Cherie , et al. Molecular Diagnostics of Medically Important Bacterial Infection. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2007, 9, s. 21-40.
31. MOSES, M.A. , et al. Temporal Study of the Activity of Matrix Metalloproteinases and Their Endogenous Inhibitors During Wound Healing. *Journal of Cellular Biochemistry.* 1996, 60, s. 379-386.
32. MOTT, Joni D; WERB, Zena. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Cell Biology.* 2004, 16, s. 558–564.
33. NAGASE, Hideaki ; VISSE, Robert; MURPHY, Gillian. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research.* 2006, 69, s. 562 – 57
34. NAGASE, Hideaki ; WOESSNER, J. Frederick. Matrix Metalloproteinases. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* 1999, 274, 31, s. 21491–2149.
35. NEČAS, E. *Obecná patologická fyziologie.* Praha : Karolinum, 2005. Hojení rány, s. 120 - 128.
36. PAČES , Václav. Nobelovy ceny 1993. *Vesmír.* 1994, 73, s. 8.
37. PARKS, William C. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair and regeneration.* 1999, 6, s. 423-432.
38. PAVLÍK, Emil. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 3. *Labor Aktuell* [online]. 2005, 3, [cit. 2011-05-06]. Dostupný z WWW: <http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>.
39. 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, s. 16-19
40. PICKAVANCE, L, et al. The development of overt diabetes in young Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats and the effects of chronic MCC-555 treatment. *Br J Pharmacol.* Oct;125(4):.. 1998, 4, s. 767-770.

41. PIRILÄ, Emma , et al. Matrix metalloproteinases process the laminin-5 c2-chain and regulate epithelial cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 2003, 303, s. 1012–1017.
42. REUNANEN, Niina ; KÄHÄRI, VeliMatti. Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion. *Madame Curie Bioscience Database*. 2000-2011
43. RYBKA, J. *Diabetes mellitus - komplikace a přidružená onemocnění*. Praha : Grada, 2007. Etiopatogeneze, průběh a klinický obraz diabetes mellitus, s. 19-26.
44. SNOEK-VAN BEURDEN, Patricia A.M.; VON DEN HOFF, Johannes W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*. 2005, 38, 1, s. 73-83.
45. STAMENKOVIC, Ivan. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *Journal of Pathology*. 2003, 200, s. 448-464.
46. STORCHOVÁ, Zuzana. Molekuly na povel IV.. *Vesmír*. 1998, 8, s. 444.
47. ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. Brno : MU, 2008. 171 s.
48. TARNUZZER, Roy W; SCHULTZ, Gregorys. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Rep Reg*. 1996, 4, s. 321-325.
49. Terrettaz, J., Jeanrenaud, B.: In vivo hepatic and peripheral insulin resistance in genetically obese (fa/fa) rats. *Endocrinology*. 1983, 112, s. 1346-1351.
50. UDVARDI, Michael K. , et al. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*. 2008, 20, s. 1736–1737.
51. VAALAMO, MAARIT; LEIVO, TOMI; SAARIALHO-KERE, ULPU. Differential Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP-I, -2, -3, and -4) in Normal and Aberrant Wound Healing. *HUMAN PATHOLOGY* . 1999, 30, 7, s. 795-802.
52. VEJRAŽKA, Martin. www.wikiskripta.eu [online]. 2008 [cit. 2011-02-07]. TaqMan. Dostupné z WWW: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:TaqMan.jpg>>.
53. WALD, Martin. Hojení ran za patologických podmínek. *Interní medicína pro praxi*. 2002, 10, s. 6-10.
54. WOESSNER, J. F. ; NAGASE, Hideaki . *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. Oxford : Oxford University Press, 2000. 131 s.
55. ZÍTKA, Ondřej. *STUDIUM VZTAHU METALOPROTEINÁZ A METALOTHIONEINU*. Brno, 2008. 69 s. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA Přírodovědecká fakulta. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/th/175737/prif_b/Zitka_2008.pdf>.

