

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**HISTOLOGICKÁ A IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA HOJÍCÍ SE
RÁNY U DIABETICKÝCH POTKANŮ ZDF**

Bc. PETRA SUCHÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2013

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**THE HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS
OF HEALING WOUND IN ZUCKER DIABETIC FATTY RAT (ZDF)**

Bc. PETRA SUCHÁ

MASTER THESIS

2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Suchá**
Osobní číslo: **C11778**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Histologická a imunohistochemická analýza hojící se rány u diabetických potkanů ZDF**
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) specifikace hojení ran u diabetiků
- c) role matrix metalloproteinasy 3 (MMP3) a dalších metalloproteinas při hojení ran

2) Praktická část:

- a) Zvládnout zalévání biologického materiálu do parafinových bločků a tvorbu histologických řezů.
- b) Zavést základní histologické barvení.
- c) Zavést imunohistochemické barvení s primární protilátkou MMP3.
- d) Provést histologická i imunohistochemická barvení u řezů z kožních ran potkanů ZDF.
- e) Porovnat a obrazově zdokumentovat různé časové intervaly hojení.
- f) Zjistit, zda jsou rozdíly mezi pohlavími a mezi zdravými a diabetickými jedinci.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

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 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

10. května 2013



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



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

V Pardubicích dne 15. února 2013

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, 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 nákladů, 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 10. 5. 2013

Bc. Petra Suchá

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Renatě Köhlerové, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady, vstřícný přístup a trpělivost při zpracování této diplomové práce. Za vytvoření příjemného pracovního prostředí a pomoc při práci v laboratoři tímto děkuji laborantce Mileně Hajzlerové a všem pracovníkům Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. DiS. Petře Hajzlerové a všem pracovníkům Ústavu histologie a embryologie děkuji za umožnění práce v jejich laboratořích a odbornou pomoc při zpracování histologického materiálu.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za vstřícnost, trpělivost, podporu a zázemí, které mi bylo během studia poskytnuto.

ANOTACE

Práce je věnována hojení ran se zaměřením na diabetes mellitus typu 2 a jeho vlivu na proces hojení. Zabývá se funkcí matrix metaloproteináz, především těch, které se uplatňují při hojení ran. Součástí práce je i stručné shrnutí informací o struktuře kůže, diabetes mellitus, ZDF potkanech a imunohistochemii.

Experimentální část je zaměřena na histologickou a imunohistochemickou analýzu ran ZDF potkanů.

KLÍČOVÁ SLOVA

kůže, diabetes mellitus, hojení ran, matrix metaloproteinázy, potkan ZDF, histologie, imunohistochemie

TITLE

The histological and immunohistochemical analysis of healing wound in Zucker Diabetic Fatty rat (ZDF).

ANNOTATION

The thesis is devoted to wound healing with a focus on diabetes mellitus type 2 and its influence on the healing process. It deals with the function of matrix metalloproteinases, particularly those that are involved in wound healing. The work also includes a brief summary of information about the skin structure, diabetes mellitus, ZDF rats and immunohistochemistry.

The experimental part focuses on the histological and immunohistochemical analysis of wounds ZDF rats.

KEYWORDS

skin, diabetes mellitus, wound healing, matrix metalloproteinases, ZDF rat, histology, immunohistochemistry

OBSAH

ANOTACE	7
ANNOTATION.....	7
OBSAH.....	8
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	10
1. ÚVOD.....	12
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1 KOŽNÍ SYSTÉM	13
2.1.1 Funkce kůže	13
2.1.2 Struktura kůže	13
2.2 SVALOVÁ TKÁŇ	15
2.3 DIABETES MELLITUS	16
2.3.1 Klasifikace diabetes mellitus	16
2.3.2 Diabetes mellitus typ 2	18
2.3.2.1 Definice a vznik	18
2.3.2.2 Epidemiologie	20
2.3.2.3 Komplikace	20
2.4 HOJENÍ RAN	22
2.4.1 Primární hojení	23
2.4.1.1 Fáze exsudativní	23
2.4.1.2 Fáze proliferační	24
2.4.1.3 Fáze remodelační	24
2.4.2 Sekundární hojení	25
2.4.3 Vliv diabetes mellitus na hojení ran	27
2.4.4 Léčba sekundárních ran	28
2.5 MATRIX METALOPROTEINÁZY.....	30
2.5.1 Struktura matrix metaloproteináz	30
2.5.2 Regulace matrix metaloproteináz	30
2.5.3 Funkce matrix metaloproteináz	31

2.5.4 Skupiny matrix metaloproteináz	32
2.5.5 Vybrané matrix metaloproteinázy účastníci se hojení ran.....	35
2.5.5.1 MMP-1, MMP-2, MMP-9 a MMP-10	35
2.5.5.2 MMP-3.....	37
2.6 ZVÍŘECÍ MODELY DIABETES MELLITUS TYPU 2.....	38
2.6.1 Potkan ZDF (Zucker Diabetic Fatty)	39
2.7 IMUNOHISTOCHEMIE.....	40
3. CÍLE PRÁCE	42
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
5. VÝSLEDKY.....	61
6. DISKUZE	85
7. ZÁVĚR	89
8. POUŽITÁ LITERATURA.....	90

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

DM	diabetes mellitus
ECM	extracelulární matrix
EDRF	endoteliální relaxační faktor (endothel derived relaxing factor)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
EPC	endoteliální progenitorové buňky (endothelial progenitor cells)
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
FITC	fluorescein isothiokyanát
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GTPázy	guanosintrifosfatázy
HLA	hlavní lidský (histokompatibilní) antigen (human leukocyte antigen)
HPGH	hraniční poruchy glukózové homeostázy
IDDM	diabetes mellitus závislý na inzulinu (inzulin dependentní diabetes mellitus)
IFG	zhoršená glukóza na lačno (impaired fasting glucose)
IGF	inzulinu podobný růstový faktor (insuline-like growth factor)
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
IUMS	Univerzitní lékařská škola v Indianě
KGF	růstový faktor keratinocytů (keratinocyte growth factor)
MIC-2	inhibiční cytokiny makrofágů-2 (macrophage inhibitory cytokine-2)
MMPs	matrix metaloproteinázy
MODY	dědičná forma diabetes mellitus typu 2 diagnostikovaná v mládí (maturity onset diabetes of the young)
MPC-1	chemotaktický protein monocytů-1 (monocyte chemotactic protein-1)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MT-MMP	matrix metaloproteinázy membránového typu
NGF	nervový růstový faktor (nerve growth factor)
NIDDM	diabetes mellitus nezávislý na inzulinu (non inzulin dependentní diabetes mellitus)
p	krátké raménko chromozomu
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PDGF	růstový faktor destiček (platelet derived growth factor)
PGT	porušená glukózová tolerance
PPAR γ	gama receptor aktivovaný proliferátorem peroxizomu (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
q	dlouhé raménko chromozomu
TGF α , β	transformující růstový faktor alfa, beta (transforming growth factor alpha, beta)
TIMPs	tkáňové inhibitory matrix metaloproteináz (tissue inhibitors of metalloproteinases)
TNF- α	tumor nekrotizující faktor-alfa (tumor necrosis factor-alpha)
tRNA	transférová ribonukleová kyselina
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
ZDF	Zucker Diabetic Fatty

1. ÚVOD

Hojení ran je složitý komplexní proces vyžadující souhru řady faktorů a procesů probíhajících v lidském těle. V případě narušení některé z těchto složek může dojít k zánětlivým procesům, které mohou zapříčinit řadu komplikací a výrazně tak zatížit organismus. Mezi časté příčiny způsobující špatné hojení ran patří kromě těžkých poúrazových stavů i různá celková onemocnění organismu. Jedním z nich je diabetes mellitus.

Diabetes mellitus (úplavice cukrová, cukrovka) je souhrnné označení pro skupinu chronických chorob charakteristických poruchou metabolismu glukózy vlivem absolutního nebo relativního nedostatku inzulínu. Tato porucha způsobuje zvýšené množství glukózy v krvi (hyperglykemie).

Úkolem diplomové práce je přehled současného poznání týkajícího se problematiky hojení ran, s důrazem na roli matrix metaloproteináz a jeho ovlivnění nemocí diabetes mellitus. Experimentální část je věnována odběru vzorků tkáně v různých časových intervalech hojení, přípravě histologických preparátů a hodnocení tkáňových změn v průběhu hojení a jejich porovnání s preparáty z diabetických potkanů. Kromě toho se zabývá lokalizací proteinu matrix metaloproteinázy 3 pomocí imunohistochemické metody.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 KOŽNÍ SYSTÉM

2.1.1 Funkce kůže

Kůže patří mezi jednu z hlavních ochranných bariér, která svou funkcí zajišťuje oddělení i kontakt mezi zevním prostředím a organismem [1].

Jednou z mnoha základních činností kůže je ochrana před mechanickými, chemickými, fyzikálními a jinými nepříznivými vlivy zevního prostředí. Dalším velmi důležitým úkolem je obrana před škodlivými mikroorganismy, která je zajištěna imunologickými složkami kůže. Kromě obranných mechanismů se kůže podílí na řadě významných fyziologických procesů, například termoregulaci, resorpci, sekreci nebo na vlastní regeneraci a reparaci [2].

2.1.2 Struktura kůže

Kůže se skládá ze tří hlavních komponent a to z epidermis (pokožka), z dermis (škára) a z tela subcutanea (podkožní vazivo). Složky epidermis a dermis se dále dělí na jednotlivé vrstvy. Do kožní soustavy se řadí i další ústrojí jako chlupy, nehty a kožní žlázy.

Epidermis

Hlavními prvky epidermis je rohovějící vrstevnatý dlaždicový epitel a keratinocyty [3]. Mezi ostatní elementy se mohou řadit melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky, které společně s keratinocyty neplní pouze funkci stavební, ale svou součinností a secernací řady produktů se podílí na mnoha fyziologických a imunitních procesech kůže [3,4]. Podle typu keratinocytů se epidermis dělí do pěti vrstev:

Stratum basale (vrstva bazální): tvoří ji kubické či cylindrické buňky ukotvené pomocí hemidesmozomů na bazální laminu

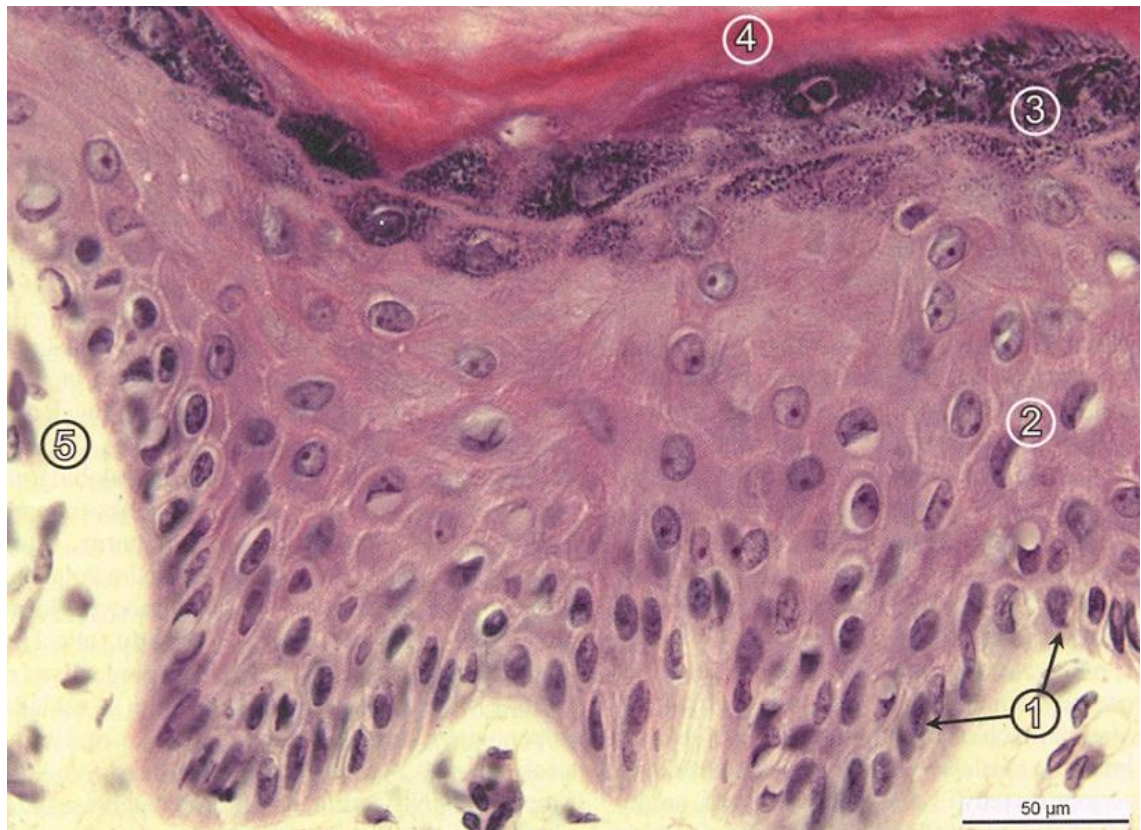
Stratum spinosum (vrstva ostnitá): složená z polygonálních buněk mezi sebou propojených desmozomy a v cytoplazmě obsahující svazky filament

Stratum granulosum (vrstva zrnitá): obsahuje 2 – 4 vrstvy oploštělých buněk, v jejichž cytoplazmě se dominantně vyskytují granula keratohyalinu a granula lamelární

Stratum lucidum (vrstva svítivá): tenká eosinofilní vrstva více viditelná u silného typu kůže; cytoplazma buněk obsahuje cytokeratinová filamenta

Stratum corneum (vrstva rohová): složená ze zrohovělých bezjaderných buněk (korneocyty), které se z povrchu neustále odlupují [5].

Dále se epidermis ještě dělí podle tloušťky kůže na kůži silného (obr. 1) a tenkého typu [3].



Obr. 1 – Kůže silného typu (hematoxylin-eosin). 1 – stratum basale, 2 – stratum spinosum, 3 – stratum granulosum, 4 – stratum lucidum, 5 – vazivová papila [5]

Dermis

Je vnitřní část kůže tvořená dvěma vzájemně splývajícími vrstvami vaziva [6]. Jelikož tato část kůže obsahuje četné svazky kolagenních a elastických vláken poskytuje kůži pevnost, ohebnost a tažnost [2]. Podle typu vaziva dělíme dermis na [6]:

Stratum papillare (vrstva papilární): zevní vrstva dermis; obsahuje řídké vazivo s vysokým podílem elastických vláken; tvoří tzv. vazivové papily, ve kterých jsou umístěny kotvící fibrily pojící dermis k epidermis; kromě vaziva se zde vyskytují kapilární sítě, volná nervová zakončení, receptory doteku (Meissnerova tělíska), buňky imunitního systému [3,4,6]

Stratum reticulare (vrstva retikulární): tvoří ji husté neuspořádané vazivo; zahrnuje řadu nervových zakončení.

Vedle vaziva se zde vyskytují vlasové folikuly a kožní žlázy [6].

Tela subcutanea

Podkožní vazivo je složeno z řídkého vaziva, které je volně fixováno k orgánům a tím zajišťuje neomezený pohyb kůže. Kromě toho se zde velmi často vyskytují tukové buňky [3].

2.2 SVALOVÁ TKÁŇ

Hlavní funkcí svalové tkáně je kontrakce, jež je umožněna přítomností proteinů aktinu a myosinu uspořádaných do aktinových a myosinových mikrofilament. Svalová tkáň se rozděluje na dva typy, na svalovou tkáň hladkou a příčně pruhovanou. Příčně pruhovaná svalová tkáň se dále dělí na kosterní a srdeční [7-9].

Hladká svalová tkáň se skládá z vřetenovitých svalových buněk, jejichž cytoplazma obsahuje aktinová a myosinová mikrofilamenta. Svalové buňky se vyskytují jednotlivě nebo v souvislé vrstvě vzájemně propojené kanálkovým spojením, elastickými a retikulárními fibrilami. Hladká svalovina je inervována autonomními nervy [7].

Příčně pruhovaná svalová tkáň obsahuje myofibrily. Kosterní svalová tkáň je složena ze svalových vláken [8]. Ty vznikly diferenciací myofibroblastů na myofibrily, které tvoří syncytia. Svalová vlákna jsou spojena vazivovými fibrilami a obalena vrstvičkou kolagenního vaziva. Jednotlivá svalová vlákna na povrchu obklopuje sarkolema a jádra uvnitř sarkoplazma [7]. Uvnitř svalových vláken jsou dále umístěny žíhané myofibrily složené z tenkých aktinových a tlustých myosinových mikrofilament [9]. Svalová vlákna obsahují mozkomíšní nervy a bohatou síť krevních kapilár [7].

Srdeční svalová tkáň je složena z kardiomyocytů, které jsou navzájem propojeny interkalárními disky. Prostory mezi buňkami vyplňuje řídké kolagenní vazivo, uvnitř okolo jádra je přítomna sarkoplazma a zbytek buněk obsahuje příčně žíhané myofibrily. Srdeční svalovinu inervují autonomní nervy a je bohatě zásobena krví [8,9]. V srdeční svalové tkáni jsou ještě přítomna Purkyňova vlákna a sekreční kardiomyocyty [7].

2.3 DIABETES MELLITUS

První zmínky o diabetes mellitus (DM) byly zaznamenány již 1500 let před naším letopočtem starověkými Egypťany. Termín DM byl poprvé použit řeckým lékařem Aretaeusem, který žil v letech asi 80 až 138. V roce 1776 se Matthewovi Dobsonovi podařilo naměřit koncentraci glukózy v moči, která byla u pacientů zvýšená. Teprve v roce 1812 v *New England Journal of Medicine and Surgery* se stal DM základním objektem zkoumání [10].

DM patří do skupiny metabolických, etiopatogeneticky heterogenních onemocnění charakterizovaných chronicky zvýšenou hladinou glukózy (hyperglykemie) nad hranici fyziologických hodnot. Současný moderní styl života má za následek neustálé zvyšování počtu osob postižených tímto onemocněním. Incidence v současné době přesáhla hranici 200 milionů případů, kdy největší procentuální nárůst je patrný ve vyspělých zemích světa [11,12]. Prevalence tohoto onemocnění za poslední čtyři desetiletí vyústila v celosvětovou epidemii a tím učinila diabetes mellitus jednou z nejzávažnějších chorob, kterým musí lidstvo čelit [10].

DM a jeho průběh má vliv na kvalitu a délku života [12]. Jedná se o onemocnění, které není v současné době vyléčitelné, ale je dobře léčitelné. Správná péče o pacienty může velmi výrazně snížit nemocnost a úmrtnost spojenou s tímto onemocněním [13]. Nesprávně diagnostikovaný nebo špatně léčený DM může způsobit mnoho komplikací, mezi které patří slepota, mrtvice, selhávání ledvin, špatné hojení ran a s ním spojená častá amputace dolních končetin [12]. S narůstajícím počtem preventivních činností a objevem účinných terapií pro léčbu DM a jeho komplikací došlo za posledních 40 let k výraznému zlepšení a zkvalitnění života pacientů s touto nemocí [10].

I přes to, že v současné době máme mnoho poznatků o prevenci, patofyziologii a léčbě diabetes mellitus, existuje ještě řada oblastí, které nebyly důkladně prozkoumány [13].

2.3.1 Klasifikace diabetes mellitus

Nové poznatky o DM vedly ke změně a vytvoření současné klasifikace DM používané od roku 1999, která je doplněna o hraniční poruchy glukózové homeostázy (tab. 1) [11]. Na základě etiologie a patologie dělíme DM na diabetes mellitus typ 1 (DM typ 1) a typ 2 (DM typ 2), ostatní typy a gestační diabetes mellitus [11-13]. Společným ukazatelem pro všechny typy diabetes mellitus je nedostatek inzulínu. Ten je způsoben různými příčinami, z nichž ne

všechny jsou pochopeny [13]. DM typ 1 a typ 2 jsou většinou polygenní onemocnění. 1 až 2 % DM jsou monogenní poruchy, které ovlivňují především funkci pankreatických β -buněk [10].

Tab. 1 – Klasifikace diabetes mellitus a poruch glukózové homeostázy v současnosti [11]

Diabetes mellitus	Obvyklá zkratka
I. Diabetes mellitus typ 1	DM typ 1 (dříve IDDM)
A. imunitně podmíněný	
B. idiopatický	
II. Diabetes mellitus typ 2	DM typ 2 (dříve NIDDM)
III. Ostatní specifické typy diabetu	
IV. Gestační diabetes mellitus	
Hraniční poruchy glukózové homeostázy	HPGH
I. Zvýšená glykemie nalačno	IFG (impaired fasting glucose)
II. Porušená glukózová tolerance	PGT

Diabetes mellitus typ 1 (diabetes mellitus závislý na inzulinu) postihuje převážně děti a mladé lidi, ale může se objevit ve všech věkových skupinách. Výskyt se výrazně liší mezi populacemi [10,14]. DM typ 1 zaujímá 5 až 10 % všech typů DM. Existují 3 formy DM typu 1, které se liší věkem postiženého, vznikem, rychlostí a průběhem onemocnění a výskytem dalších onemocnění [13]. Hlavní oblast genů citlivých ke vzniku DM typu 1 leží na krátkém raménku chromozomu 6 a je spojena především se systémem human leukocyte antigen (HLA). Další oblast se vyskytuje na chromozomu 11, která je spjata s genem pro inzulin [10,14]. Bylo objeveno několik genů souvisejících se vznikem diabetes mellitus typu 1, jako HLA-DQA1*0301, HLA-DQA1*0302, HLA-DQB-1*0602 a HLA-DQW1.2. Ne u všech lidí s poruchou těchto genů však propukne DM [13]. Proto určitě existují faktory životního prostředí, které po interakci s některými geny způsobují destrukci β -buněk a tím vyvolávají DM typu 1. Zatím nejsou přesně známy [14]. Absolutní nedostatek inzulinu vede k poruše anabolických procesů a vzniku komplikací typu hyperglykemie, polyurie, polydipsie, polyfagie či častější výskyt acidózy [13].

Diabetes mellitus typ 2 (diabetes mellitus nezávislý na inzulinu) je nejčastější forma diabetes mellitus. Prevalence DM typu 2 se výrazně liší podle dané populace a geografické polohy [14]. Tento typ DM nejčastěji postihuje lidi ve starším věku, i když věková hranice se v posledních letech neustále snižuje a není ojedinělý výskyt mezi mladými lidmi [10]. Vznik tohoto onemocnění je způsoben vzájemnými interakcemi genetických faktorů a faktorů prostředí. Mezi činitele životního prostředí podílející se na tomto onemocnění patří obezita a snížená fyzická aktivita [14]. Hlavní příčinou vzniku a vývoje chorobných změn v těle je

inzulinová rezistence a poškození funkce β -buněk. Společně s těmito poruchami se vyskytuje u DM typu 2 metabolický syndrom, který kromě inzulínové rezistence zahrnuje obezitu, hypertenzi, hypertriacylglycerolemii a nízké hladiny HDL lipoproteinů. Lidé s tímto syndromem mají zvýšené riziko poruchy glukózové tolerance a vzniku DM typu 2 [10].

Ostatní specifické typy DM zaujímají pouze okolo 1 % lidí s DM. Gestační diabetes mellitus se vyskytuje u 5 až 6 % těhotných žen a jedná se ve většině případů o diabetes mellitus typu 2 [13].

2.3.2 Diabetes mellitus typ 2

2.3.2.1 Definice a vznik

Vznik tohoto onemocnění je spojen s poruchou sekrece inzulínu a inzulínovou rezistencí. Opět spolupracují genetika a životní prostředí [12]. Genetické změny se zdají být prvním impulzem pro rozvoj nemoci, ale samotný vznik nemoci je určen především faktory životního prostředí [14]. Inzulínová rezistence společně s hyperinzulinemií je stále považována za předchůdce vzniku DM typu 2, ale řada studií ukázala, že i absolutní nedostatek inzulínu bez poruchy citlivosti tkání na inzulín, může vést k rozvoji DM typu 2 [15]. Zřetelný DM typu 2 se začne vyvíjet pouze tehdy, když už β -buňky nejsou schopny přiměřeně zvýšit sekreci inzulínu jako kompenzaci vad v účinku inzulínu [16]. Mnoho aspektů z epidemiologie, patofyziologie a léčebných postupů diabetes mellitus typu 2 u dospělých jsou dobře známy, na rozdíl od znalostí této nemoci u dětí. Jisté je, že nadváha a obezita jsou nejvýznamnějšími rizikovými faktory podílející se na vzniku onemocnění u dětí a mládeže [17]. Je velmi těžké popsat patofyziologii DM typu 2, protože s neustálými pokroky v lékařství se pohled na DM typu 2 mění téměř každý den. Navíc DM typu 2 není jedno onemocnění, ale skupina nemocí s různými genetickými a patofyziologickými faktory, ale s podobnými příznaky a výsledky [13].

Environmentální faktory

Změna životního stylu v několika generacích odráží významný vliv environmentálních faktorů na expresi choroby. Obezita je jedním z prvních významných činitelů podílejících se na diabetes mellitus typu 2, ale pouze malá část obézních jedinců onemocní. Nejen přítomnost, ale také typ obezity ovlivňuje riziko vzniku [14]. Zejména viscerální obezita negativně

ovlivňuje citlivost na inzulin. Nárůstem volných mastných kyselin z tukových buněk může docházet k zablokování cest inzulinových signalizací, což vede k inzulinové rezistenci. Zvýšené množství volných mastných kyselin je uvolňováno do portálního oběhu, kde může narušit metabolismus a účinek inzulinu a zvýšit glukoneogenezi v játrech. Zvýšený obsah triacylglycerolů v orgánech cílových pro inzulin (sval, β -buňky) může mít za následek snížený účinek a sekreci inzulinu [18]. Nárůst tělesné hmotnosti v populaci je výsledkem špatného stravování. Vysoce kalorická strava se zvýšeným obsahem tuku může přispět k rozvoji inzulinové rezistence [10]. Dalším faktorem ovlivňující výskyt DM typu 2 je nedostatečná fyzická aktivita. Prevalence choroby u fyzicky neaktivních osob je dvakrát až třikrát vyšší než u aktivních jedinců. Zvýšená obezita a snížená fyzická aktivita se podílí na rozvoji inzulinové rezistence, která se zdá být rozhodující složkou v patogenezi DM typu 2 [14]. DM typu 2 je také spojen se stárnutím, kdy dochází ke ztrátě svalové hmoty a zvýšení tukové tkáně [18]. Další roli mohou hrát rozdíly v pohlaví a porodní hmotnost [16]. A tak, i když genetická predispozice vedoucí k rozvoji diabetes mellitus typu 2 je hlavním činitelem, průběh onemocnění je do značné míry závislý na dalších faktorech [14].

Genetické faktory

Nedávná studie genomu *GWAS* úspěšně identifikovala a replikovala téměř 75 oblastí spojených s DM typu 2 [16]. Onemocnění poukazuje na familiární dědičnost [14]. DM typu 2 se z genetického hlediska dělí na monogenní a polygenní.

Monogenní formy jsou důsledkem vzácných mutací v jednom genu a jsou charakteristické poruchou sekrece inzulinu [12]. Monogenní formy DM typu 2 se mohou dále dělit na 3 podskupiny a to diabetes mellitus typu 2 diagnostikovaný v mládí (MODY), na DM typu 2 způsobený mitochondriálními mutacemi často doprovázený sluchovou abnormalitou a vzácné případy mutací genu inzulinu [12,15]. MODY familiární podtyp DM typu 2 je autozomálně dominantní dědičností. Bylo objeveno šest specifických mutací v různých genech, které jsou zapojeny do MODY profilu, včetně glukokinázy a pěti transkripčních faktorů [15]. Tyto geny ovlivňují expresi jiných genů prostřednictvím regulace jejich syntézy mRNA. Výjimkou je MODY2 forma spojená s glukokinázou – klíčovým regulačním enzymem β -buněk. V mitochondriální DNA je popsáno mnoho mutací, které jsou spojené s DM typu 2. Nejčastější z nich je A3243G substituce v genu leucinu tRNA. Tři monogenní formy diabetes mellitus typu 2 charakterizované těžkou inzulinovou rezistencí jsou důsledkem mutací v receptorech aktivovaných peroxisomovými proliferátory (PPAR γ), ATK2 a genů inzulinového receptoru [12].

Identifikace genů zodpovědných za běžnější polygenní formy DM typu 2 nenabyla takového významu jako u forem monogenních [10]. Tyto formy DM typu 2 se vyskytují jak s poruchou sekrece inzulínu tak inzulínovou rezistencí. Klinický obraz je vytvořen vzájemným působením environmentálních a genetických faktorů [12]. Genetické studie zjistily přes 40 genetických variant, které zvyšují riziko DM typu 2, ale pouze 10 % bylo přímo spojeno s nemocí [10]. Tyto polymorfismy mohou být lokalizovány jak u pacientů s diabetes mellitus typu 2, tak i u zdravé populace. Sekvenční rozdíly v několika genech byly spojeny s polygenní formou DM typu 2, například kalpain 10, PPAR γ a KCJN11 [12,16].

Vzhledem k existenci silné genetické rozmanitosti mezi světovou populací v důsledku biologických vlastností, kulturní historie a stravovacích návyků jsou studie velmi obtížné. Dokončení *Human Genome Project* v roce 2003 usnadnilo genetický výzkum spojený s DM typu 2 a očekává se, že v nejbližší budoucnosti bude identifikováno více genů spojených s DM typu 2 [16].

2.3.2.2 Epidemiologie

DM typu 2 zaujímá v 21. století přední příčku nejčastějších onemocnění postihujících lidi na celém světě a 5. místo, co se týče úmrtnosti. Mezinárodní diabetická federace v roce 2011 zaznamenala 366 milionů lidí s diabetes mellitus typu 2. Podle jejich statistických údajů toto číslo stále roste a v roce 2030 by se mohlo pohybovat okolo 552 milionů [16].

Nejčastější výskyt je zaznamenán v USA, Indii a Číně. Počet lidí s DM typu 2 v USA je vyšší mezi etnickými menšinami (afričtí, domorodí a hispánští Američané) oproti běžné populaci [16]. Údaje u různých etnických skupin žijících ve stejné zemi se mohou lišit. Je známo, že u emigrantů je výskyt větší ve srovnání s domorodci [14]. Existují i populace s extrémně vysokým výskytem DM typu 2. Mezi ně patří třeba praví Pima indiáni, u kterých se toto onemocnění připisuje především genetickým faktorům. Rozdíly ve výskytu DM typu 2 v různých geografických a kulturních oblastech jsou také spojeny s životním stylem a stravou [12]. S přibývajícím výskytem nadváhy a obezity se zvyšuje počet případů diabetes mellitus typu 2 i u dětí a mladých dospělých [17].

2.3.2.3 Komplikace

Klinický obraz a komplikace DM typu 2 se navzájem prolínají. Prvotní metabolickou abnormalitou v přítomnosti obezity je inzulínová rezistence. Ta má za následek řadu změn

v klinickém obraze. V první fázi dochází k hyperinzulinemii, která má snahu kompenzovat inzulinovou rezistenci, ale po určitém čase funkce β -buněk selže a dochází k rozvoji DM typu 2 [15,17]. Hyperinzulinemie je výrazným ukazatelem vývoje DM typu 2 [15]. Nastupuje hyperglykemie, počáteční hyperinzulinemie přechází v hypoinzulinemii, dochází k atrofii a snížení počtu β -buněk. Kromě toho je přítomna vysoká koncentrace triacylglycerolů a nízká hladina HDL cholesterolu [12,14]. Klinický obraz můžeme rozdělit do tří skupin na asymptomatický (glykosurie, hyperglykemie v rutinním vyšetření), mírné příznaky (noční pomočování, polydipsie) a závažné příznaky (polyurie, úbytek hmotnosti, glykosurie, ketóza, diabetická ketoacidóza) [17].

Mezi komplikace u pacientů s MODY typem diabetes mellitus typu 2 mohou patřit různá cystická onemocnění ledvin, často doprovázena chronickými komplikacemi DM. Dále byly popsány lipidové abnormality, renální tubulopatie, abnormality ledvin a dělohy. Vzácné mutace v genu pro PPAR γ způsobující syndrom těžké inzulinové rezistence jsou doprovázeny částečnou lipodystrofií, hypertenzí a jaterní steatózou. Inzulinová rezistence může vést ke kožním změnám jako je akantóza. Dále má za následek zvýšení růstového hormonu v pubertě [12]. Postupem času se zvyšuje proliferace hladkých svalových buněk v cévách, tvorba kolagenu, produkce růstových faktorů a zánětlivých cytokinů [15]. Hyperinzulinemie zvyšuje množství androgenů, které jsou nedílnou součástí hormonální nerovnováhy u syndromu polycystických ovarií, který končí neplodností [18]. DM typu 2 přispívá k rozvoji cévních mozkových příhod, ischemickým chorobám dolních končetin (obr. 2) a amputacím [16]. Je také přítomen metabolický syndrom, který zvyšuje pravděpodobnost ischemické choroby srdeční. Volné mastné kyseliny ovlivňují vaskulární reaktivitu a mají za následek endoteliální dysfunkci. Zvýšené hladiny adiponektinu a jiných adipocytokinů mohou také hrát nějakou roli, ale jejich úloha ještě není přesně známa [18]. Mezi následky dlouhodobých účinků diabetes mellitus řadíme mikrovaskulární, makrovaskulární a neurologické komplikace [10,11,16]. Mezi makrovaskulární komplikace patří ateroskleróza koronárních tepen, která je běžná u většiny lidí s DM typu 2 a je nejčastější příčinou úmrtí [13]. Dále se zde vyskytuje hypertenze, koronární ischemická choroba srdeční, onemocnění periferních cév, mozková cévní onemocnění [16]. Mikrovaskulární komplikace postihují kapiláry v celém těle. Cílovými orgány poškození jsou především oči a ledviny. Diabetická retinopatie je nejčastější příčinou slepoty [13,19]. Neuropatie mohou vést ke vzniku vředů na nohou a špatnému hojení kožních ran. U diabetiků jsou přítomny časté stafylokokové infekce [16,20]. Chronickým komplikacím DM se dá předejít jednoduchou kontrolou hladiny glukózy

v krvi. Bohužel i v současné době se tato opatření ve společnosti nevyskytují tak, jak by měla a mnoho lidí nadále trpí závažnými komplikacemi [13].



Obr. 2 – Ischemický defekt u nemocného se syndromem diabetické nohy [21]

2.4 HOJENÍ RAN

Hojení ran je děj, který slouží k opravě a uzavření poškozené tkáně a obnově funkce kůže [22]. Jedná se o složitý dynamický proces zahrnující několik fází, které se navzájem prolínají [23]. Proces hojení ran začíná bezprostředně po poranění tkáně a vyžaduje řádnou kontrolu. Té se účastní několik typů buněk (neutrofilů, monocytů, makrofágů, keratinocytů) a mnoho dalších komponent jako cytokiny, růstové faktory, proteinázy, zejména matrix metaloproteinázy a další složky extracelulární matrix (ECM). Kromě jednotlivých funkcí, které zajišťují je důležitá i jejich vzájemná interakce [23-26].

Hojení ran však ovlivňuje i řada negativních faktorů, které mohou být příčinou patologického procesu hojení. Sem patří faktory systémové (věk, zdravotní stav, přidružená onemocnění) a faktory lokální (velikost rány, lokalizace, infekce) [27].

Podle rozsahu poškozené tkáně a dalších parametrů rozdělujeme proces hojení na dva typy a to primární hojení (*per primam*) a sekundární hojení (*per secundam*). Primární hojení je fyziologický proces hojení akutních ran. U chronických ran dochází k patologickému procesu hojení a jedná se o hojení sekundární [22,27].

2.4.1 Primární hojení

Hojení akutních ran se skládá ze tří až pěti fází, které se překrývají v čase a prostoru. Mezi jednotlivé fáze můžeme zařadit hemostázu a koagulaci, zánět, proliferační fázi, neovaskularizaci a angiogenezi a poslední remodelační fázi [28-30].

2.4.1.1 Fáze exsudativní

První etapa je věnována hemostáze a koagulaci, která nastane bezprostředně po poranění a trvá několik hodin. Kromě toho je v této fázi zahájen zánětlivý proces. Při poškození tkáně a cév nejprve dochází k agregaci trombocytů a vytvoření fibrinové sraženiny, která je tvořena molekulami fibrinu, fibronektinem, vitronektinem a trombospondinem [19,27,29,30,31]. Fibrinová sraženina zajišťuje hemostázu, ale současně také slouží jako matrix pro dočasnou infiltraci buněk [28]. Trombocyty vylučují několik rozpustných faktorů, včetně růstového faktoru destiček (PDGF), který zahajuje chemotaxi neutrofilů, makrofágů a fibroblastů [19,25]. Dále produkují inzulinu podobný růstový faktor (IGF-1), epidermální růstový faktor (EGF), transformující růstový faktor alfa ($TGF\alpha$) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) [22,23].

Trombocyty a leukocyty uvolňují cytokiny a růstové faktory, jako interleukiny ($IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$) a tumor nekrotizující faktor alfa ($TNF-\alpha$), které aktivují zánětlivý proces. Současně dochází k sekreci účinných antimikrobiálních látek a proteináz neutrofilů [29]. Neutrofilů jsou postupně nahrazovány monocyty, které mají stejnou funkci [30,31]. Neutrofilů a makrofágů mají za úkol vyčistit ránu a odstranit patogenní materiál.

Trombocyty společně s makrofágy produkují transformující růstový faktor beta ($TGF\beta$), který umožňuje aktivaci fibroblastů a jejich migraci do granulační tkáně. Současně dochází k množení keratinocytů a jejich přesunu z okraje rány (reepitelizace) [25,26,28]. Tento proces je aktivován signální dráhou v epitelu, kde endoteliální buňky u okraje rány uvolňují velké množství cytokinů a růstových faktorů EGF, růstový faktor keratinocytů (KGF), IGF-1 a nervový růstový faktor (NGF) [25,29]. Dochází k oddělení hemidesmozomů mezi epidermis a bazální membránou, uvolnění mezibuněčných desmozomů pomocí kolagenáz a elastáz a keratinocyty migrují podél fibrinové sraženiny do středu rány [26,29]. Na tomto ději se dále podílejí tři hlavní molekulární složky – růstové faktory, integrity a matrix metaloproteinázy (MMPs) [26]. Aktivované MMPs podporují degradaci bílkovin ECM v ráně, což usnadňuje buněčnou migraci [23]. Kromě migrace keratinocytů, na které se

MMPs (MMP-1, -2, -3, a -10) podílejí, hrají významnou roli i v migraci fibroblastů (MMP-1, -2, -3 a -13) [32]. Proces pokračuje do doby, než dojde ke vzájemnému kontaktu buněk a poté je pomocí GTPáz posunovačů vypnut [26]. Tímto krokem dochází k přechodu zánětlivé fáze do fáze proliferační [28].

2.4.1.2 Fáze proliferační

Proliferační fáze začíná 3 – 10 den po zranění [29]. Tento krok zahrnuje vytvoření granulační tkáně spolu s novotvorbou cév a proliferaci fibroblastů [22,27]. Na novotvorbě cév se podílí komplex buněčných, humorálních a molekulárních dějů. Iniciátory obnovy cévního systému jsou růstové faktory VEGF, PDGF, bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a serinová proteináza trombin [25,29,31]. Proliferace fibroblastů a syntéza matrix je stimulována PDGF a TGF β [26].

2.4.1.3 Fáze remodelační

Během této fáze dochází k odstranění sraženiny, postupné involuci granulační tkáně, rozkladu kolagenu a jeho reorganizaci do velkých svazků, které se křížově pojí. Fibrinová sraženina je nahrazena fibronektinem, následně kolagenem III, který je postupně přeměněn na silnější kolagen I. Diferenciace fibroblastů na myofibroblasty umožňuje kontrakci a vytvoření kompaktní tkáně, která se jeví jako jizva. Výsledná jizva dosahuje jen asi 80 % pevnosti normální kůže [22,28]. Přestavba probíhá od 21. dne až do 1 roku [29].

Zatímco funkce buněk zapojených do procesu hojení jsou dobře známy, biochemické reakce vedoucí k aktivaci těchto buněk nebyly ještě řádně prozkoumány. Přestože přesné mechanismy jsou nejasné, je známo, že imunitní systém hraje zásadní roli v regulaci těchto procesů [30].

Cílem primárního hojení není dokonalá regenerace poškozené tkáně. Především jde o rovnováhu mezi rychlým uzavřením rány a dobrou opravou tkáně [28]. Součástí kůže jsou komponenty, jako jsou vlasové folikuly nebo potní žlázy, které se už nikdy úplně po úrazu nezotaví [29].

2.4.2 Sekundární hojení

Chronická rána je definována jako rána, u které došlo k porušení kontinuity a s ní související funkce kůže a která i přes adekvátní léčbu neprojevuje po dobu 6 týdnů schopnost hojení [22,32,33]. Je výsledkem selhání fyziologického procesu hojení, který je v několika místech narušen, neprobíhá v daném pořadí a čase [28]. Hojí se výstavbou nové granulační tkáně s následnou epitelizací, případně dochází k tvorbě nehojivého chronického defektu [22]. Mezi rizikové faktory, které mohou přispět k rozvoji chronické rány, patří cévní onemocnění, diabetes mellitus (obr. 3), alkohol, nikotin a stáří. Chronické rány se vyskytují u jedinců s defekty, které buď brání hojení, nebo pokračují v patologickém procesu hojení [30]. Mezi chronické rány řadíme: bércové ulcerace, dekubity, diabetické defekty (syndrom diabetické nohy), exulcerující malignity, kožní vředy a *per secundam* se hojící operační rány [33].

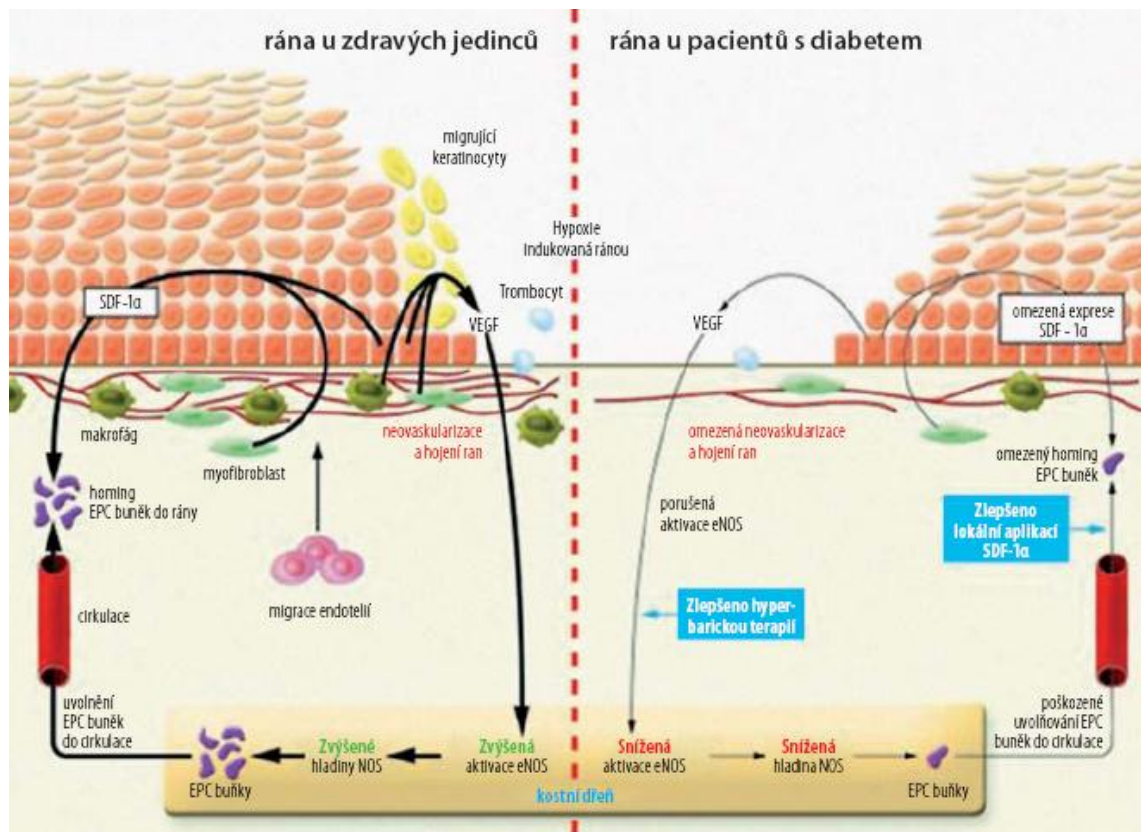
Hojení chronických ran je nekoordinovaný proces, při němž hojení neprobíhá podle základního schématu. Často dochází k prodloužení některých fází, především fáze exsudativní a proliferační, a k následnému pozastavení hojení [23]. Každé fáze procesu hojení se účastní cytokiny, růstové faktory, proteinázy a endokrinní hormony, jejichž rovnováha a funkce u chronických ran jsou porušeny. V prostředí chronických ran mají buňky sníženou mitotickou aktivitu [22]. Ačkoli etiologie chronických ran není zcela známa, byly popsány tři hlavní rozdíly mezi hojením akutních a chronických rán a to snížení aktivity růstových faktorů, zvýšení činnosti proteináz a zvýšený výskyt starších fibroblastů [28,31].

Opakované trauma nebo ischemie tkáně vede k prodloužení doby zánětu se zmnožením neutrofilů, makrofágů a mastocytů, které ve vyšším množství produkují prozánětlivé cytokiny, které se podílejí na udržení zánětu [23]. Jsou zvýšeny hodnoty zejména TNF α , IL-1 a IL-6 [22]. Zástava krvácení a prvotní oprava ran je u hojení chronických ran opožděna [34]. Studie prokázaly, že vysoký obsah tuku působí negativně na hojení ran, zejména díky prodloužení zánětlivé fáze. Současně je prokázáno, že způsobuje menší kontrakce a zhoršenou reepitelizaci, což ukazuje na zpožděnou migraci keratinocytů. Tuková tkáň je spojena se zvýšením prozánětlivých mediátorů jako TNF- α , různých IL, včetně IL-1 β , IL-6 a IL-8, se zpožděnou epitelální a buněčnou proliferací, s diferenciací myofibroblastů, s poruchou tvorby granulační tkáně a angiogeneze a také s poruchou syntézy a ukládání kolagenu [19,24]. Proteinázová aktivita u chronických ran je podstatně vyšší než u ran akutních. Množství proteináz stoupá a zároveň se objevuje nedostatek jejich inhibitorů. Změna jejich poměru se mění v průběhu hojení. Tato nerovnováha způsobuje degradaci ECM

a umožňuje zmnožení bakterií, které dále proces hojení zpomalují. Bakterie omezují proliferaci a migraci fibroblastů, endotelových buněk, keratinocytů, lymfocytů, makrofágů a také stimulují produkci MMPs [23,28,34]. Čím vyšší je mikrobiální znečištění, tím pomalejší je rychlost hojení nebo dochází k úplnému zastavení procesu hojení [34]. Chronické rány jsou charakteristické zvýšením hladiny MMP-2 a MMP-9 a současně sníženou hladinou tkáňového inhibitoru matrix metaloproteináz (TIMP-1) [32]. Přehnaný zánět nebo trauma tkáně má za následek spuštění aktivace neutrofilů. V akutní ráně se aktivované neutrofilové prakticky po prvních hodinách nevyskytují, zatímco v chronické ráně jsou neutrofilové přítomny během celého procesu hojení. Aktivované neutrofilové stimulují sekreci matrix metaloproteináz (MMP-8 a -9) a neutrofilní elastázy. Ty systematicky degradují proteiny ECM, opožďují proces buněčné proliferace a hojení ran [34]. Výrazně je snížena hladina růstových faktorů EGF, KGF, PDGF a IGF [32]. Ty jsou jednak degradovány aktivitou proteáz nebo mohou být „vychytávány“ molekulami extracelulární matrix [22,23]. Zjistilo se, že fibroblasty nereagují na růstové faktory, což má za následek sníženou migraci a proliferaci těchto buněk, které mají důležitou roli v expresi růstových faktorů FGF, TGFβ, růstového faktoru destiček a při tvorbě granulační tkáně [22,26,34]. Často přehlíženým faktorem přispívajícím k prodlouženému hojení ran, je změna hladiny oxidu dusnatého (NO) [34]. Další roli v sekundárním hojení ran hraje aktivace komplementu. I přes pozitivní účinky komplementu bylo zjištěno, že nevhodná aktivace komplementu může způsobit apoptózu buněk, zvýšit zánět a tím přispět k poruše hojení ran. V chronických ranách byly prokázány zvýšené hladiny složek komplementu C1q, C3, C3d. Zvýšené hladiny C-reaktivního proteinu, neutrofilů a makrofágů ukazují na dlouhodobý zánět. Přetrvávající aktivace komplementu je také spojena s opožděným hojením ran u starších pacientů [30]. V důsledku buněčné senescence (fibroblasty, keratinocyty, makrofágy) je kůže ve starším věku náchylnější k rozvoji chronické rány. Bolest vyplývající z traumatu tkáně, infekce, převazů a špatné vlhkosti prostředí rány komplikuje proces hojení ran [32].

Mezi poruchy hojení by se dalo zařadit i fibrotické onemocnění, které je však narozdíl od sekundárního hojení chronických ran charakteristické abnormálním zvýšením procesu hojení, kdy dochází k nadměrné tvorbě komponent ECM a výsledkem je tvorba koloidních a hypertrofických jizev [26,29].

Většina chronických ran dobře reaguje na konvenční léčbu, nicméně u malé populace pacientů s chronickou ránou k hojení nedochází navzdory nejlepší péči [32].



Obr. 3 – Srovnání procesu hojení ran u zdravých jedinců a pacientů s diabetes mellitus [21]

2.4.3 Vliv diabetes mellitus na hojení ran

Kůže diabetika má horší biomechanické vlastnosti, což ji činí více náchylnou k poškození [21,35]. Bylo identifikováno více než 100 faktorů, které přispívají ke zhoršenému hojení ran u diabetiků [36].

U diabetických pacientů, jsou ovlivněny všechny fáze hojení ran [37]. Dochází ke změně zánětlivé odpovědi. Ta je charakteristická pomalým nástupem, delším průběhem s trvalým projevem zánětlivých cytokinů makrofágů jako je chemotaktický protein monocytů-1 (MPC-1) a inhibiční cytokiny makrofágů-2 (MIC-2) a zvýšenou incidencí infekce [20,35,38, 39]. Pacienti s DM často nejsou schopni bojovat s infekcí kvůli porušené imunitní odpovědi. Řada studií poukázala na některé mikroorganismy, které vykazují zvýšenou přilnavost k diabetickým buňkám [37,40]. Navíc první tři dny hojení jsou charakteristické sníženým množstvím neutrofilů a po třech dnech, kdyby neutrofilů měly být nahrazeny makrofágy a lymfocyty je zaznamenán jejich vyšší počet. Porucha zánětlivé fáze způsobuje selhání v následném růstu fibroblastů a syntéze kolagenu [38]. V pozdějších fázích hojení přetrvávají v diabetické ráně zánětlivé buňky, které způsobují patologické hojení,

v důsledku zvýšené exprese IL-1 β , TNF- α a matrix metaloproteináz [37]. Dále dochází k opožděné kontrakci, poruše produkce růstových faktorů, defektu angiogeneze, k nerovnováze mezi hromaděním extracelulárních komponent a jejich přestavbě pomocí MMPs [35-37,40]. Hladiny MMP-2 jsou zvýšené, ale poměr MMP2 a TIMP-2 je zachován, na rozdíl od MMP-9 a TIMP-1, kde je zvýšené množství MMP-9. Je patrná zvýšená činnost kolagenáz [35]. DM typu 2 má za následek dysfunkci endoteliálních buněk, poruchy vazodilatace, poruchy proliferačních, migračních a syntetických schopností, přilnavosti a diapedézy leukocytů [40]. Endoteliální dysfunkce je spojena se sníženou produkcí NO, zvýšenou agregací trombocytů, zvýšenou expresí adhezních molekul, chemokinů a cytokinů a vyšší produkcí reaktivních forem kyslíku z endotelu [19,37,39,40]. Dalším patologickým procesem je inaktivace endoteliálního relaxačního faktoru (EDRF), snížení signalizace VEGF, vyšší hladiny produktů glykace a zvýšená adheze leukocytů k endotelu [21,37,40]. Ovlivněna může být také vaskulogeneze, protože proangiogení účinky mononukleárních buněk kostní dřeni a endoteliálních progenitorových buněk (EPC) jsou sniženy [36,40]. Nedostatek EPC je pravděpodobně způsoben v důsledku poruch eNOS-NO kaskády v kostní dřeni [37,39]. Neuropatie může snížit schopnost vnímat všelijaké menší úrazy (puchýře, vředy) [20,39]. Diabetičtí jedinci mají obvykle aterosklerotické cévy, které zmenšují průtok krve, což vede k narušení hojení ran a oxygenace [40]. Další studie potvrzují sníženou chemotaxi polymorfonukleárních leukocytů a neutrofilů a s tím spojené snížení fagocytózy. Je ohrožena chemotaxe a fagocytární vlastnosti monocytů [20,21,37,40]. Je zaznamenána porucha funkce makrofágů, snížené množství a špatná organizace granulační tkáně, porucha migrace a proliferace keratinocytů a fibroblastů [36]. Zpomalený nástup diferenciaci myofibroblastů a zvýšený výskyt apoptózy jsou viděny během nevhodných fází hojení. Keratinocyty projevují absenci migrace, hyperproliferaci a neúplnou diferenciaci. Fibroblasty prokazují fenotypovou změnu, snížení migrace a proliferace [37]. Je patrná nerovnováha v syntéze a degradaci kolagenu. Pokles kolagenu typu I a zvýšený výskyt kolagenu typu III. Větší tuhost a snížená pružnost kůže je pravděpodobně způsobena sníženým ukládáním kolagenu [35,37]. Navíc jsou diabetické rány tužší díky vyššímu hromaděním kolagenu a nižšímu množství růstových faktorů, jako je PDGF a EGF [37].

2.4.4 Léčba sekundárních ran

Chronické rány u zdravých jedinců jsou vzácné. Nicméně u ohrožených pacientů rozvoj nehojících se ran představuje zvýšenou zátěž současných systémů zdravotnické péče.

To se nadále zhoršuje s celosvětově rostoucím výskytem nemoci diabetes mellitus a jiných onemocnění. Celoživotní výskyt vředů na nohou u diabetiků se odhaduje na 15 % až 25 %. Jiné nehojící se kožní léze způsobené různou příčinou jsou odhadovány na 35,5 %. Bohužel selhání současných léčebných strategií chronických ran často vede k amputaci končetin, což je dále spojeno s 14,7% pooperační mortalitou. Objev nových alternativních léčebných postupů pro nehojící se rány je rozhodující pro snížení utrpení pacienta a nákladů spojených s léčbou [28,31].

Léčba ran se liší v závislosti na typu poranění, etiologii, velikosti a umístění rány. Kromě toho musí být brány v úvahu vnější faktory [32]. Nové léčebné postupy zdůrazňují potřebu débridement, který zajistí odstranění nekrotické tkáně, rozsáhlého zánětu a bakteriálního biofilmu [31,33,34,41]. Po vyčištění rány se aplikují farmaceutické léky a biologické materiály, které stimulují okolní zdravou tkáň a podporují hojení ran [32,41]. Studie na experimentálních zvířecích modelech ukázaly, že aplikace růstových faktorů může urychlit normální proces hojení. Růstové faktory byly již dříve použity u lidí k léčbě nehojících se ran. Mezi nejčastěji studované růstové faktory se řadí EGF, FGF, PDGF, TGF α a TGF β [25,31]. Růstové faktory však mají omezenou klinickou účinnost. Úspěšné terapie může být dosaženo až tehdy, jsou-li zánětlivé procesy a hladina proteináz pod kontrolou [34]. Dalším léčebným prostředkem může být periostin, kterému je v současné době věnována velká pozornost a plazma bohatá na trombocyty, která se používá k léčbě chronických ran více než 20 let [28]. Jako biologické materiály se využívají nové funkční obvazy, které zaznamenaly obrovský rozvoj. Ty zajišťují terapii rány, snižují výskyt nehojících se ran a podporují proces hojení [31,33].

V současnosti neexistuje žádný „zázračný lék“ na hojení všech typů chronických ran. Jedním z důležitých kroků úspěšné léčby se zdá být vyrovnávání faktorů, které se podílí na normální hojení ran [32]. Růstové faktory pomáhají regulovat mnoho činností zapojených do léčení. Zjištění přesné role a funkce růstových faktorů nabízí dobrou alternativu pro léčbu v budoucnosti. Útlum aktivace komplementu pomocí specifických inhibitorů je považován za inovační strategii ošetřování ran. Ačkoliv klinické studie o účincích těchto inhibitorů na hojení ran jsou omezené, dostupné údaje ukazují, že snížení aktivace komplementu může zlepšit hojení ran. Navíc ke zmírnění aktivace komplementu mohou být využity bezpečné a účinné látky získané z různých mikroorganismů, léčivých červů, jejich larev a rostlin [25]. Kromě toho studie kmenových buněk a pokroky v tkáňovém inženýrství nabízejí nové léčebné možnosti v hojení ran [25,29,41].

U nehojících se ran by měl být sledován celkový stav (DM, hypertenze, kouření), lokální situace rány (bakterie, vlhkost, edém), specializované místní intervence (MMPs, biofilm, hyperbarická terapie, snížení bolestí, obvazy) a systémová kontrola (antimikrobiální látky, bolest). Řada faktorů lokálních a systémových, vnitřních a vnějších může mít totiž dopad na hojení ran a přerušení normálního sledu událostí [31,34,41].

Chceme-li objevit nové a cílenější léčebné postupy, je třeba nejprve porozumět molekulární biologii fyziologického hojení ran. Pacient si zaslouží nejen rychlý, nekomplikovaný proces hojení ran, ale také dobrý konečný estetický výsledek [27,29].

2.5 MATRIX METALOPROTEINÁZY

Matrix metaloproteinázy jsou členy velké rodiny enzymů (endopeptidáz), jejichž katalytická aktivita je přísně regulována [26,42-45]. Patří do skupiny zinek dependentních metaloproteináz [46]. V současné době existuje 26 enzymů s různou substrátovou specifitou a strukturou, které mají společné vlastnosti. U prvních tří členů byla identifikována jejich schopnost rozkládat kolagen, želatinu a proteoglykan [45,47-50].

2.5.1 Struktura matrix metaloproteináz

MMPs mají charakteristickou multidomenní strukturu. Skládají se z prodomény, katalytické domény, závěsné oblasti a domény hemopexinu [50,51]. Signální peptid řídí jejich vylučování z buňky, propeptid má zásadní význam pro udržení pro-MMPs v latentní formě. Katalytické domény obsahují vazebné místo pro Zn^{2+} . Závěsná oblast spojuje katalytickou doménu s hemopexinem. Tato oblast určuje substrátovou specifitost MMPs, zprostředkovává interakce s endogenními inhibitory a hraje určitou roli v kolagenolýze [49]. Výjimku tvoří MMP-7, MMP-23 a MMP-26. Například MMP membránového typu (MT-MMP) mají navíc transmembránové a cytosolické domény kotvené k buněčné membráně. Mezi další komponenty patří glykosylfosfatidylinositol (GPI) v MMP-17 a MMP-25 a želatinu vázající domény v MMP-2 a MMP-9 [50].

2.5.2 Regulace matrix metaloproteináz

Jsou vylučovány jako neaktivní proenzymy (zymogeny) z buňky nebo zůstávají vázané na buněčnou membránu. K jejich aktivaci dochází v extracelulárním prostoru

[26,42,43,50]. Funkce MMPs je přísně kontrolována na úrovni transkripce, sekrece, aktivace a inhibice aktivovaného enzymu [49]. K aktivaci matrix metaloproteináz dochází odstraněním prodomény, což vede k odhalení aktivního místa enzymu, které obsahuje zinek [50,51]. Aktivované MMPs se mohou ovlivňovat dalších MMPs [50]. Většina z těchto enzymů se vyskytuje v nízkých hladinách v tkáni [49]. Expresi většiny MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13 a MMP-19) lze navodit u několika typů buněk (keratinocyty, fibroblasty, endoteliální buňky, lymfocyty, monocyty a makrofágy) v reakci na cytokiny a růstové faktory (interleukiny, interferony, EGF, KGF, FGF, VEGF, PDGF, IL-1, TNF- α , TGF- β), hormony, onkogeny a kontakt buněk s ECM nebo jinými typy buněk [49,50,52,53]. Největší aktivitu mají při neutrálním pH extracelulárního prostoru [42,43,52].

Proteolytická aktivita matrix metaloproteináz je regulována aktivací a inhibicí pomocí specifických inhibitorů TIMPs a nespecifických proteinázových inhibitorů jako α 1-proteináza, α 2-makroglobulin a trombospondin-1 a -2 [49-51,53]. TIMPs jsou endogenní proteinové inhibitory MMPs [54]. V současné době jsou známy čtyři TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4), které brzdí veškeré MMPs [45,49,50]. TIMP-1, -2 a -3 jsou exprimovány epiteliálními buňkami i fibroblasty [50]. TIMP-1 inhibuje aktivitu většiny MMPs, s výjimkou MT1-MMP a MMP-2 [49,51]. TIMP-2 inhibuje aktivitu většiny matrix metaloproteináz, s výjimkou MMP-9 a latentní formy pro-MMP-2. TIMP-3 inhibuje aktivitu MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 a MMP-13. TIMP-4 je nejnověji objeveným inhibitorem. Inhibuje aktivitu MT1-MMP, MMP-2, MMP-9, a MMP-7. Exprese TIMP-4 je častá v srdci, ale i v místech poranění tkáně [49]. Pochopení principu inhibice a objevení dalších účinných specifických inhibitorů MMPs představuje výzvu pro rozvoj nových léčebných postupů [49,50,53].

2.5.3 Funkce matrix metaloproteináz

MMPs jsou zapojeny do mnoha biologických a patologických dějů. Ačkoli přesná role všech MMPs ještě nebyla objasněna, několik matrix metaloproteináz a jejich funkce byly detailně popsány [43,55]. Proteolytická degradace extracelulární matrix MMPs hraje klíčovou roli v řadě fyziologických i patologických procesů [26,42,44,45,47,48,52]. MMPs jsou dále zapojeny do zpracování, aktivace, nebo deaktivace různých faktorů. MMPs zaujímají ústřední roli v embryogenezi a za normálních fyziologických podmínek ovlivňují proliferaci buněk, apoptózu, zánět, buněčnou migraci, remodelaci a hojení ran, angiogenezi a klíčové reprodukční děje (ovulace, implantace embrya, menstruace a proliferace endometria)

[26,45,46,49-51,54]. Kromě ECM ovlivňují matrix metaloproteinázy i různé druhy molekul na povrchu buněk. Podílejí se na tvorbě buněčných receptorů a imunologických procesech [51].

Případná ztráta kontroly činnosti a rovnováhy mezi MMPs a TIMPs může mít za následek různé nemoci jako nefritida, tkáňové vředy, fibróza a endometrióza [49-51]. Kromě účasti v homeostáze a remodelaci pojivové tkáně, proteolytické aktivity MMPs významně přispívají k poškození tkáně, které se vyskytuje u chronických zánětlivých onemocnění (revmatoidní artritida, osteoartritida, kardiovaskulární choroby, Alzheimerova choroba, autoimunitní onemocnění a invaze nádorů) [45,50-52,54]. MMPs hrají významnou roli v patogenezi aterosklerózy, podílejí se na cévních komplikacích včetně nestabilní anginy pectoris a aneuryzmatu břišní aorty. Dále jsou zapojeny v patogenezi diabetes mellitus, kde způsobují diabetické komplikace [44,56]. Nerovnováha ve výskytu matrix metaloproteináz v oblasti rány může přispět k patogenezi špatně se hojících ran [26].

2.5.4 Skupiny matrix metaloproteináz

Na základě substrátové specifity, podobné sekvence a mírně odlišné kvartérní struktury lze MMPs rozdělit do šesti různých podskupin: kolagenázy, gelatinázy, stromelysiny, matrilysiny, membránové MMP a ostatní MMPs (tab. 2) [43,45,50,52,53].

Třída kolagenáz zahrnuje kolagenázu-1 (MMP-1), kolagenázu-2 (MMP-8) a kolagenázu-3 (MMP-13). Jde o neutrální proteinázy, které degradují neporušené spirály fibrilárního kolagenů typu I, II, III, V a XI v extracelulárním prostoru [48-54].

Do skupiny gelatináz se řadí gelatináza A (MMP-2) a gelatináza B (MMP-9) [51]. Ty jsou zodpovědné za degradaci kolagenu typu IV, V, VII, X, XI a XIV, želatiny, elastinu, proteoglykanů, myelinu, fibronektinu, fibrilinu-1 a prekurzorů TNF- α a IL-1b [49,53]. Gelatinázy mají důležitou roli v degradaci ECM a remodelaci v různých fyziologických procesech, jako je hojení ran [49,51-53].

Mezi stromelysiny patří tři enzymy, stromelysin-1 (MMP-3), stromelysin-2 (MMP-10) a stromelysin-3 (MMP-11). Jedná se o enzymy degradující kolagen typu IV a IX, laminin, fibronectin, elastin a proteoglykany. MMP-11 rozkládá inhibitory serinové proteinázy, α 1-proteináza a α 1-antitrypsin. MMP-11 je exprimována v děloze, placentě a v atrofující mléčné žláze [48,49,51-53].

Matrilysiny jsou nazývané také jako endometaloproteinázy. Do této kategorie se řadí matrilysin-1 (MMP-7) a matrilysin-2 (MMP-26). Jsou to nejmenší MMP a jejich struktura je

charakteristická nedostatkem domény hemopexinu [49-51]. Matrilysiny společně s MMP-9 a MMP-12 jsou schopné štěpit lidský plazminogen a zajistit tak výrobu angiostatinového fragmentu, který slouží jako cirkulující inhibitor angiogeneze [49]. MMP-7 štěpí kromě celé řady ECM komponent (fibronektin, laminin, nidogen, kolagen typu IV, proteoglykany) i β 4 integrin. MMP-7 také hraje roli v přirozené imunitě v plicích, střevě, kdy aktivuje antibakteriální peptidy (prodefensiny) [49,50]. MMP-26 *in vitro* degraduje kolagen typu IV, fibronektin, fibrinogen, vitronektin, denaturuje kolagen typu I – IV, α 1-antitrypsin, α 2-makroglobulin [49].

MMP membránového typu jsou transmembránové nebo ukotvené proteiny [49]. Lze je rozdělit do šesti skupin. Typ I transmembránové proteiny (MMP-14, MMP-15, MMP-16 a MMP-24) a GPI ukotvené proteiny (MMP-17 a MMP-25). Všechny MT-MMP s výjimkou MMP-17 jsou schopné aktivovat pro-MMP-2 a trávit několik molekul ECM [50,51,53]. MMP-17 hraje roli v regulaci povrchových proteinů buňky (TNF- α -konvertující enzym a GPI-kotvící enzym). MMP-17 se účastní zánětlivých procesů, ale její skutečná role ještě není přesně známa [49,50]. MMP-24 aktivuje latentní MMP-2 a převážně se vyskytuje v mozku, ledvinách, slinivce břišní a plicích [49].

Do skupiny ostatních MMPs patří MMP-12, MMP-18, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27 a MMP 28 [49,50]. MMP-21 byla zjištěna především ve vaječnicích, ledvinách, játrech, plicích, placentě, mozku a leukocytech periferní krve. MMP-21 má důležitou funkci v embryogenezi, zejména v nervových buňkách. MMP-22 neobsahuje signální peptid, doménu hemopexinu, postrádá cysteinový spínač v prodoměně a doménách hemopexinu. Místo toho má domény bohaté na cystein následované imunoglobulinovými doménami. Je štěpena v Golgiho aparátu a aktivní enzym se uvolňuje do extracelulárního prostoru [49]. MMP-23 se nachází hlavně v reprodukční tkáni [49,51]. MMP-27 degraduje kasein. Je exprimována ve varlatech, střevě, plicích a kůži. To naznačuje, že MMP-27 může hrát roli v tkáňové homeostáze [49]. MMP-28 se nachází v lidské placentě, což poukazuje na možnou účast v procesech remodelace tkáně v placentě [49,50]. MMP-28 se vyskytuje zejména v keratinocytech. Předpokládá se, že je zapojena do procesu hemostázy a hojení ran [51].

Tab. 2 – Klasifikace matrix metaloproteináz [upraveno podle 32,46,49,50]

MMP	Jiný název	Chromozom	Substrát
<i>Kolagenázy</i>			
MMP-1	kolagenáza-1	11q22-q23	kolagen (I, II, III, VII, VIII, X), želatina, agrekan, L-selektin, IL-1 β proteoglykan, entaktin, ovostatin, MMP-2, MMP-9
MMP-8	kolagenáza-2	11q21-q22.3	kolagen (I, II, III, V, VII, VIII, X), želatina, agrekan, fibronektin
MMP-13	kolagenáza-3	11q22.3	kolagen (I, II, III, IV, IX, X, XIV), želatina, plasminogen, agrekan, perlekan, fibronektin, osteonectin, MMP-9
<i>Gelatinázy</i>			
MMP-2	gelatináza A	16q13-q21	kolagen (I, IV, V, VII, X, XI, XIV), želatina, elastin, fibronektin, agrekan, MBP, osteonectin, laminin-1, MMP-1, MMP-9, MMP-13
MMP-9	gelatináza B	20q11.2-q13.1	kolagen (I, III, IV, V, VII, X, XIV), želatina, entaktin, agrekan, elastin, fibronektin, osteonectin, plasminogen; MBP, IL-1 β
<i>Stromelysiny</i>			
MMP-3	stromelysin-1	11q23	kolagen (III, IV, V, IX, X), želatina, agrekan, perlekan, dekorin, laminin, elastin, kasein, osteonectin, ovostatin, entaktin, plasminogen, MBP; IL-1 β , MMP-2/TIMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13
MMP-10	stromelysin-2	11q22.3-q23	kolagen (III, IV, V, IX, X), želatina, kasein, agrekan, elastin, MMP-1, MMP-8
MMP-11	stromelysin-3	22q11.2	kolagen IV, laminin, fibronektin, želatina, (kasein)
<i>Matrilysiny</i>			
MMP-7	matrilysin-1	11q21-q22	kolagen (IV, X), želatina, agrekan, dekorin, fibronektin, laminin, entaktin, elastin, kasein, transferin, plasminogen, MBP, β 4-integrin, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-9/TIMP-1
MMP-26	matrilysin-2	11p15.4	želatina I α , P1, fibrinogen, fibronektin, vitronektin
<i>MT-MMP</i>			
MMP-14	MT1-MMP	14q11-q12	kolagen (I, II, III), želatina, kasein, fibronektin, laminin, vitronektin, entaktin, proteoglykany, MMP-2, MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	15q13-q21	fibronektin, entaktin, laminin, perlekan, MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	8q21	kolagen III, želatina, kasein, fibronektin, MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	12q24.3	fibrin, fibrinogen, prekurzor TNF
MMP-24	MT5-MMP	20q11.2	progelatináza A
MMP-25	MT6-MMP	16p13.3	kolagen IV, progelatináza A, fibrin, fibronektin, želatina

MMP	Jiný název	Chromozom	Substrát
<i>Ostatní MMP</i>			
MMP-12	metaloelastáza	11q22.2-q22.3	kolagen IV, želatina, elastin, kasein, fibronektin, vitronektin, laminin, entaktin, MBP, fibrinogen, fibrin, plasminogen
MMP-18	kolagenáza-4	neznámý	kolagen (I, II, III, VIII, X), želatina, agrekan
MMP-19	RASI-I	12q14	želatina, agrekan, fibronektin
MMP-20	enamelysin	11q22.3	amelogenin, agrekan
MMP-21	XMMP	10q26.3-1p36.3	neznámý
MMP-22	femalysin	1p36.3	neznámý
MMP-23	CA-MMP	1p36.3	neznámý
MMP-27	CMMP	11q24	neznámý
MMP-28	epilysin	17q11-17q21.1	kasein

2.5.5 Vybrané matrix metaloproteinázy účastníci se hojení ran

Hojení ran zahrnuje řadu událostí, které vyžadují degradaci extracelulární matrix, migraci buněk, přestavbu granulační tkáně, tkáňovou remodelaci a řadu jiných procesů, které jsou řízeny matrix metaloproteinázami [52,53,55,57]. Přísná regulace MMPs je tedy důležitá pro normální hojení akutních ran [43]. V kožních ranách jsou MMPs produkovány keratinocyty, fibroblasty, makrofágy a endotelovými buňkami. K syntéze MMPs dochází během několika hodin po úrazu. Mezi nejčastější matrix metaloproteinázy účastníci se hojení ran patří kolagenázy, gelatinázy a stromelysiny, především MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 a MMP-10 [26,53,54]. Určité MMPs jsou lokalizovány na konkrétních místech v ráně a jsou produkovány v různých časech a fázích hojení ran (obr. 4) [50].

2.5.5.1 MMP-1, MMP-2, MMP-9 a MMP-10

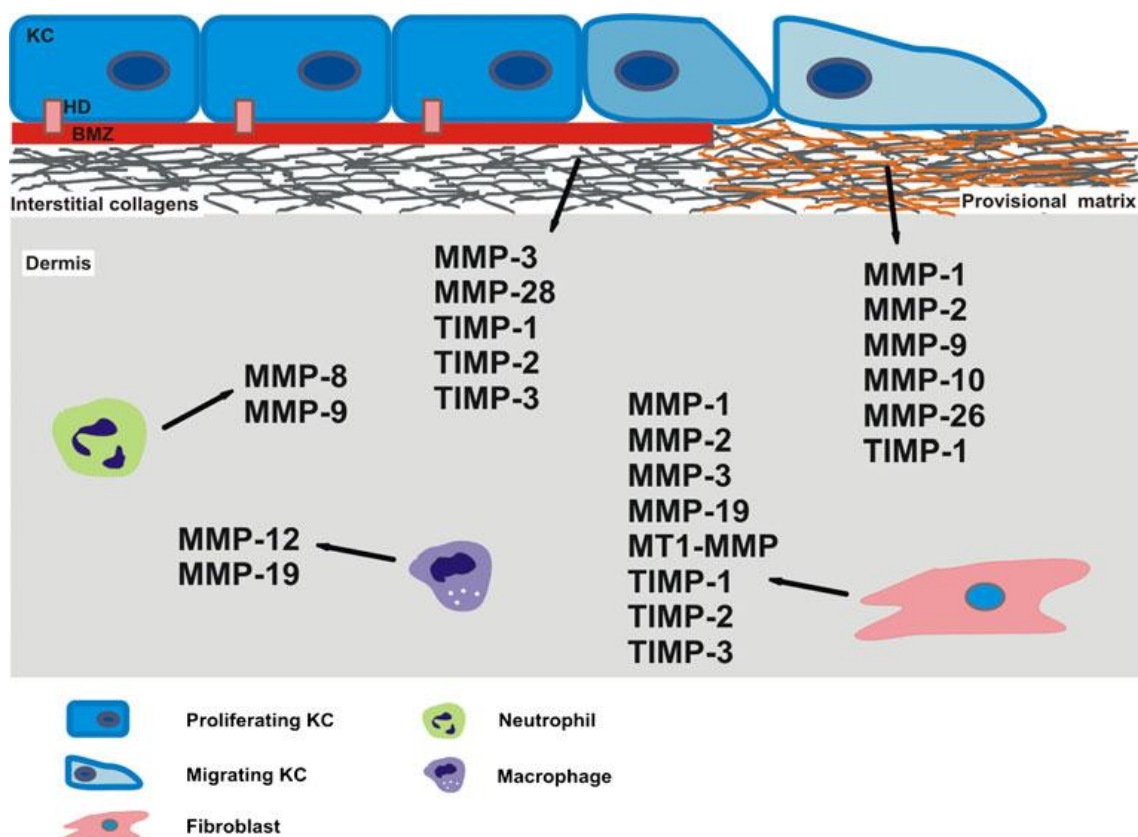
MMP-1 patří mezi kolagenázy, které katalyzují degradaci nativního vláknitého kolagenu typu I, II a III [42,52]. MMP-1 je produkována různými typy buněk jako fibroblasty, keratinocyty, endotelovými buňkami, makrofágy, hepatocyty, chondrocyty a osteoblasty [42,47,49,53,54,57]. V keratinocytech je exprese MMP-1 řízena kontaktem s kolagenem typu I, který je zprostředkován $\alpha 2\beta 1$ integrinem nebo je regulována depozicí lamininu-1 při reorganizaci bazální membrány (BM) [26,50,53]. Exprese MMP-1 může být také modulována četnými prozánětlivými mediátory. Cytokiny jako interleukin-1, tumor nekrotizující faktor- α a růstový faktor destiček, stejně jako epidermální růstový faktor, ovlivňují přítomnost MMP-1 ve fibroblastech [50]. Po zranění je MMP-1 přítomna v keratinocytech, které hraničí s ránou

a umožňuje jejich migraci [26,50,52]. MMP-1 se vyskytuje především na okraji rány [42]. Syntéza kolagenáz je nezbytná pro tvorbu a následnou degradaci kolagenu v průběhu začátku opravného procesu. MMP-1 je však produkována i v pozdějších fázích, což ukazuje, že se účastní i dlouhodobých remodelačních procesu hojení ran [42,50]. MMP-1 produkce je rovněž důležitá pro reepitalizaci rány [43,52].

MMP-2 štěpí kolagen typu IV, který je hlavní složkou BM. Podílí se na degradaci kolagenu a některých glykoproteinů ECM [47,49,54]. MMP-2 hydrolyzuje také peptidy v kolagenu typu I, II a III [51]. MMP-2 je exprimována řadou buněk, včetně fibroblastů, keratinocytů, endotelových buněk, chondrocytů, osteoblastů a monocytů [26,43,47,49,53,54]. Produkce MMP-2 je stimulována TNF- α a β [49]. Množství MMP-2 zůstává stabilní během procesu hojení ran, což může poukazovat na roli MMP-2 ve fázi dlouhodobé přestavby [26]. MMP-2 se podílí na angiogenezi a generování matrixových fragmentů, které slouží jako lešení pro migraci buněk a signály pro chemotaxi [43]. MMP-2 umožňuje migraci keratinocytů. Ve skutečnosti role MMP-2 během hojení ran není ještě příliš jasná [50].

MMP-9 v kyselém prostředí štěpí kolagen typu I a účastní se remodelace kolagenní ECM. MMP-9 je produkována běžným alveolárními makrofágy, polymorfonukleárními leukocyty, keratinocyty a osteoklasty [26,43,49,52-54]. V keratinocytech je MMP-9 regulována TGF- β , TNF- α a IL-1 β [26,50]. V počátečních fázích opravy je MMP-9 soustředěna v ráně a později se přesouvá do okrajů rány [43,48,50]. MMP-9 se účastní angiogeneze [49]. Přesná role MMP-9 při hojení ran je nejasná, ale může být zapojena do oddělení keratinocytů od membrány před migrací. Dále se může podílet na trávení matrix neutrofilů a makrofágy během odstraňování nekrotické tkáně [43,50].

MMP-10 úzce souvisí s MMP-3 a degraduje celou řadu proteinů ECM [51]. Je převážně vylučována keratinocyty [54]. Exprese MMP-10 je ovlivněna IL-1 a PDGF a regulována cytokiny jako EGF, TGF- β 1 a TNF- α [52,50]. Zvýšená exprese je viděna v epidermis. MMP-10 zaujímá různé role v opravě rány. Kontroluje migraci keratinocytů, přispívá k přestavbě nově vzniklé matrix a účastní se apoptózy keratinocytů. MMP-10 také aktivuje MMP-9 [26,50,52,54].



Obr. 4 – Exprese a buněčný zdroj MMPs a TIMPs v hojení ran. Uvolněním hemidesmozomů (HD) ze zóny bazální membrány (BMZ) dochází ke změně fenotypu keratinocytů (KC), které zůstávají v kontaktu s prozatímní matrix rány z fibronektinu a fibrinu (oranžová). Pod bazální membránou se nachází intersticiální matrix složená především z kolagenu typu I (šedá). Rozdíly v projevu MMPs a jejich inhibitory se zdají být důležité pro hojení ran, některé MMPs jsou exprimovány migrujícími keratinocyty na hraně s ránou, zatímco jiné jsou viděny v proliferující populaci keratinocytů přilehlých k okraji rány. MMPs exprimované fibroblasty a zánětlivými buňkami jako jsou neutrofily a makrofágy také přispívají k regulaci procesu hojení ran [50]

2.5.5.2 MMP-3

MMP-3 a MMP-10 jsou si velmi podobné s ohledem na konstrukci a substrátovou specifitu, přičemž MMP-3 se vyznačuje vyšší proteolytickou činností [48,50-52]. MMP-3 a MMP-10 degradují širokou škálu ECM proteinů, kolagen typu IV, V, IX, a X, proteoglykany, želatinu, fibronektin, laminin a fibrilin-1 [42,49,51,52,54,55]. MMP-3 a MMP-10 jsou syntetizovány fibroblasty a epiteliálními buňkami [49,54]. MMP-3 je produkována především fibroblasty a v menší míře keratinocyty a aktivovanými makrofágy [50,52,55,57]. Výroba MMP-3 je snadno stimulována řadou růstových faktorů a cytokinů, včetně IL-1 a PDGF [52]. MMP-3 se nachází v prostředí, kde dochází k aktivní přestavbě extracelulární matrix [55]. K syntéze MMP-3 dochází s vyšší úrovní v ráně než na periférii

[42,43]. MMP-3 je rozhodující pro normální kontrakci rány, je zásadní pro organizaci vícebuněčné aktinové sítě a podílí se na přestavbě BM [43,48,50,52,53,55]. V dermis MMP-3 společně s kolagenázami ovlivňuje opravu tkáně ve více fázích, včetně přestavby a odstranění granulační tkáně a při tvorbě jizvy [52]. MMP-3 štěpí α 1-proteinázu, TNF- α prekurzor, myelin, degraduje a inaktivuje IL-1 β [45,49]. MMP-3 je součástí proteolytické kaskády, která aktivuje pro-MMPs. Aktivuje pro-MMP-1 v plně aktivní MMP-1 [42,51,52,55]. I když tento enzym má širokou substrátovou specifitost a pH optimum, jedná se o neutrální matrix metaloproteinázu. MMP-3 však může zvýšit v některých procesech svoji aktivitu v kyselém pH [47].

MMPs mají i řadu jiných funkcí. MMP-2 podporuje růst axonů, MMP-9 je odpovědná za endochondrální kostní formace, MMP-3 reguluje větvení mléčné žlázy při morfogenezi a mnoho dalších funkcí [45,49].

Změněná funkce a regulace MMPs je zapojena do mnoha onemocnění charakterizovaných abnormální procesy hojení [50,55]. U chronických ran byla prokázána zvýšená kolagenolytická činnost, zvýšené hladiny kolagenáz, gelatináz a stromelysinů a snížená exprese TIMPs [43,50,53,57]. Klinický význam mají naopak i snížené hladiny matrix metaloproteináz a zvýšené TIMPs, které byly zaznamenány u diabetických komplikací [53,56].

2.6 ZVÍŘECÍ MODELY DIABETES MELLITUS TYPU 2

Se zvyšujícím se počtem některých onemocnění se snaží vědci o objevení nových postupů pro pochopení mechanismů vzniku těchto nemocí [58]. Výzkum na člověku je z etických důvodů naprosto nepřístupný [59]. Některé laboratoře jako je Charles Rivers zahrnují řadu zvířecích modelů, která jsou šlechtěna pro výzkum různých onemocnění [58]. Mezi takové nemoci se řadí i DM, kde zvířecí modely zajistily velký přínos k pochopení onemocnění, vzhledem k složitosti samotného onemocnění a špatnému pochopení této nemoci u lidí. Kromě etiologie se zdá být důležité i prozkoumání příčin komplikací spojených s DM typu 2 [60].

V současné době existuje řada zvířecích modelů pro diabetes mellitus typu 2. Ten u nich může být vyvolán spontánně, podáním příslušných chemických látek, dietní stravou, chirurgickými zásahy a jejich kombinacemi. Za posledních několik let byly tyto zvířecí modely vyvinuty především genetickým inženýrstvím [59]. Většina modelů jsou hlodavci,

jako například ob/ob myš, db/db myši, KK myš, KK/A^y myš, Zucker fatty potkan, SHR/N-cp potkan, JCR/LA-cp potkan, OLETF potkan, *Psammomys obesus*, aj. V současné době je ale také zapotřebí i jiných typů zvířat (králíci, prasata, opice, psi), které jako model lépe vystihnou člověka [59,60]. Musíme však brát na vědomí, že žádný zvířecí druh přesně nenapodobí průběh lidského DM typu 2.

Velké množství zvířecích modelů vyvinutých pro různé typy nemocí a jejich nedostatečná charakteristika má za následek obtížný výběr správného modelu pro danou studii [59].

2.6.1 Potkan ZDF (Zucker Diabetic Fatty)

Pochopení patofyziologie a etiologie diabetes mellitus způsobeného obezitou vyžaduje dostupnost zvířecího modelu a přístupnost jeho tkání pro studie. Zvířecí model Zucker Diabetic Fatty (ZDF) potkan představuje dobré řešení pro pochopení tohoto onemocnění [61].

ZDF potkan byl objeven během let 1974 až 1975 Dr. Walterem Shawem v Eli Lilly výzkumné laboratoři v Indianapolis. Ke vzniku tohoto druhu došlo mutací v kolonii outbredních „Zucker“ potkanů. V roce 1977 se tato skupina potkanů přestěhovala do laboratoře Dr. Julia Clarka na Univerzitní lékařskou školu v Indianě (IUMS). O 4 roky později byla skupina identifikována. Dr. Richard Peterson na IUMS provedl za účelem zkvalitnění vlastností tohoto typu potkana příbuzenskou plemenitbu pomocí důkladně vybraných párů. Roku 1985 byla uznána inbrední linie ZDF potkana, 1991 a následně 2001 zařazena mezi genetické modely [58].

Přesné označení ZDF/GmiCrl-fa/fa. Rozšíření kolonií probíhá polygammím rozmnožováním v rámci zachování druhu. Délka březosti se pohybuje mezi 21 až 24 dny. Počet mláďat je 8 – 12 a k odstavení dochází ve věku 21 dnů. Tento typ potkana má černou hlavu a černý pruh po celé délce zad (obr. 5) [62]. Je charakteristický přítomností DM typu 2, hyperglykemií, hyperinzulinemií, hypertenzí, hypertriacylglycerolemií, hypercholesterolemií, zhoršeným hojení ran, neuropatií, inzulinovou rezistencí [60,63].

Genetická mutace vyskytující se u ZDF potkanů je tzv. Glu 269 Pro mutace v extracelulární doméně leptinového receptoru, která způsobí jeho zkrácení [61,62]. Ta je spojena s leptinovou rezistencí, což má za následek obezitu a zvýšený obsah tuku v ostrůvkách β -buněk [61].

Samec Zucker Diabetic Fatty potkana je oproti samici široce využívaným modelem pro DM typu 2 [63]. Vlivem genetické mutace a diety Purina 5008 je samec ZDF potkana

schopen napodobit průběh diabetes mellitus typu 2 jako u člověka. Homozygotní recesivní samci na rozdíl od homozygotních dominantních a heterozygotních jedinců jsou obézní a mají zvýšenou hladinu glukózy na lačno [62]. U samic ZDF ke vzniku diabetu při dietě Purina 5008 nedochází. Tato dieta způsobuje pouze rozvoj metabolického syndromu [58]. Nicméně samice jsou obézní, inzulin rezistentní a mohou sloužit jako kontrola [59]. Byla provedena řada studií s cílem objevit stravu, která u samic ZDF potkana vyvolá DM typu 2. Předběžná zjištění naznačovala, že dieta bohatá na tuky by mohla vést ke vzniku onemocnění. Na základě těchto poznatků se došlo k závěru, že obézní samice Zucker Diabetic Fatty potkana by mohla dobře posloužit jako model DM typu 2 u žen pro studium dietních vlivů [63]. Nakonec Charles River objevila dietu RD 12468, která splňovala požadovaná kritéria pro vznik plnohodnotného DM typu 2 u samic [58].



Obr. 5 – ZDF potkan [vlastní]

2.7 IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemická metoda slouží k identifikaci řady látek na mikroskopické úrovni [64]. Je jednou z nejcitlivějších histochemických metod [6]. K průkazu buněčných nebo tkáňových antigenů se využívá specifické reakce antigenu (protein, polysacharid, lipid) s protilátkou (nejčastěji IgG) za vzniku komplexu, který je následně vybraným způsobem označen [65]. Tento postup se ukázal jako nejvhodnější pro přesnou lokalizaci zkoumaného antigenu.

Označení komplexu antigen protilátka probíhá několika způsoby [8]:

Fluorescenční značení: zviditelnění antigenu fluorescenční látkou (FITC, rhodamin); vyhodnocení ve fluorescenčním mikroskopu; výhodou je možnost pozorování současně dvou i více různě značených antigenů

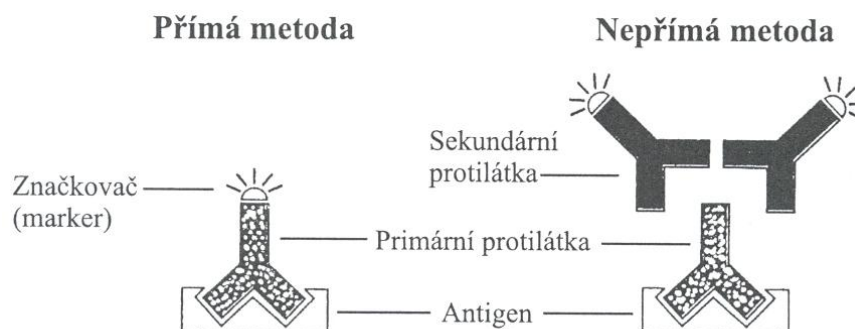
Značení enzymem: protilátka značená enzymem (křenuvová peroxidáza, alkalická fosfatáza); studium probíhá ve světelném nebo elektronovém mikroskopu

Značení barevnou elektrodenní substancí: jako značku lze použít zlaté částice nebo ferritin; průkaz ve světelném i elektronovém mikroskopu [3,8,65].

Imunohistochemie se dělí podle lokalizace antigenu na metody:

Přímá metoda: přímá vazba protilátky na antigen po inkubaci tkáně obsahující antigen v roztoku značené protilátky

Nepřímá metoda: inkubace tkáně s antigenem v roztoku neznačené protilátky (primární protilátka), po navázání primární protilátky na antigen následuje druhá inkubace v roztoku značené protilátky (sekundární protilátka), která se váže na primární protilátku; tato metoda je citlivější [6].



Obr. 6 – Princip imunohistochemických metod [8]

Specifické protilátky využívané při imunohistochemickém barvení se připravují ze séra laboratorního zvířete po jeho imunizaci specifickým antigenem. Jedná se o velmi náročnou přípravu, proto si většina laboratoří v současné době objednává již hotové protilátky od firem [64]. Na základě rozdílné výroby a výběru laboratorního zvířete existují dva typy protilátek a to polyklonální nebo monoklonální.

Pro získání dobrých imunohistochemických preparátů je důležité přesně dodržovat stanovené zásady barvení. Na výsledku se však kromě kroku barvení odrazí již samotné předchozí zpracování biologického materiálu [65].

3. CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce je studium procesu hojení ran u diabetických ZDF potkanů a role matrix metaloproteináz účastnících se hojení ran.

Teoretická část je zaměřena na problematiku hojení primárních a sekundárních ran a vlivu diabetes mellitus typu 2 na proces hojení. Zabývá se rolí vybraných matrix metaloproteináz, především MMP-3, při hojení ran. Dále se stručně zmiňuje o histologické struktuře kůže, diabetes mellitus, charakteristice ZDF potkana a imunohistochemii.

Experimentální část se věnuje histologické a imunohistochemické analýze kožních ran. V první části se zabývá odběrem a zpracováním biologického materiálu. Připravená tkáň je dále obarvena hematoxylin-eosinem. Pro lokalizaci MMP-3 je použito imunohistochemické barvení doplněné o výsledky z imunofluorescence.

Výsledková část obsahuje obrazovou dokumentaci zhotovených preparátů v různých časových intervalech hojení. Hodnotí rozdíly v histologické struktuře neporušené a porušené tkáně a expresi MMP-3 s ohledem na pohlaví zdravých a diabetických jedinců.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. VÝSLEDKY

6. DISKUZE

7. ZÁVĚR

K experimentu byl použit ZDF potkan, který je vhodným modelem pro studium diabetes mellitus typu 2 a jeho komplikací. Potkani byli rozděleni do skupin podle pohlaví a na zdravé a diabetické. Práce byla zaměřena na histologické studium hojení excizní kruhové rány v časových intervalech d1, d3, d5, d10 a po zahojení, tj. zhruba měsíc po vytvoření rány.

První část byla věnovaná histologické struktuře kůže ZDF potkana. Na preparátech barvených hematoxylinem-eosinem jsme porovnávali rozdíly mezi kůží potkaní a lidskou, kůží samců a samic, zdravými a diabetickými jedinci. Zjistili jsme, že kůže potkana ZDF je totožná s lidskou kůží až na výskyt potních žláz, které u potkanů nebyly spatřeny a svalů, které nejsou součástí lidské kůže. Odchytky mezi pohlavími byly zaznamenány pouze v tloušťce kůže, která je u samců větší vlivem silnější dermální vrstvy. Množství tuku u zdravých jedinců je daleko menší oproti diabetickým a s ohledem na pohlaví, je u diabetiků větší obsah tuku patrný u samic.

V další fázi jsme sledovali proces hojení. Mezi samicemi a samci stejných skupin nebyly zjištěny žádné významné rozdíly. Patrný byl rozdíl mezi zdravými a diabetickými jedinci, kdy u diabetických jedinců došlo k opožděnému nástupu a prodloužení zánětlivé fáze. Delší byla i fáze proliferační.

Poslední část byla zaměřena na přítomnost MMP-3 v ráně zdravých a diabetických potkanů ZDF v průběhu hojení. K lokalizaci MMP-3 bylo použito imunohistochemické barvení, doplněné o imunofluorescenční barvení. Výsledky potvrdily, že MMP-3 se v neporušené kůži nevyskytuje s výjimkou vlasových folikulů. Exprese MMP-3 byla jinak patrná ve všech časových intervalech bez rozdílů, zdali šlo o zdravého nebo diabetického jedince. Dále jsou ve výsledcích vidět buňky pozitivně obarvené na MMP-3, které jsme identifikovali jako žírné a plazmatické buňky. To nám poskytlo možný nový pohled na buněčnou syntézu MMP-3 i jiným typem buněk než fibroblasty a keratinocyty.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ZÁHEJSKÝ, J. Bariérová funkce kůže z pohledu klinické praxe. *Dermatológia pre prax*, 2007, 1 (3 – 4), s. 124 – 127.
- [2] TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. 4. přepracované a doplněné vydání, Praha : Grada, 2003. s. 417 – 422. ISBN 80-247-0512-5.
- [3] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; KELLEY, R. O. *Základy histologie*. 1. české vydání, Jinočany : H & H, 1997. s. 14 – 22, 339 – 351. ISBN 80-85787-37-7.
- [4] HOŘEJŠÍ, V.; BARTUŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 1. vydání, Praha : Triton, 1998. s. 26, 38, 139 – 140. ISBN 80-85875-73-X.
- [5] MARTÍNEK, J.; VACEK, Z. *Histologický atlas*. 1. vydání, Praha : Grada, 2009. s. 123 – 127. ISBN 978-80-247-2393-8.
- [6] PAULSEN, D. F. *Histologie a buněčná biologie*. 1. vydání, Jinočany : H & H, 2004. s. 26, 272 – 277. ISBN 80-7319-024-9.
- [7] VACEK, Z. *Histologie a histologická technika. Histologie I. část*. 1. vydání, Brno : IDV PZ, 1996. s. 99 – 109. ISBN 80-7013-201-9.
- [8] MALÍNSKÝ, J.; LICHNOVSKÝ, V.; MICHALÍKOVÁ, Z. *Přehled histologie člověka v obrazech I. díl*. 1. vydání, Olomouc : Univerzita Palackého, 2002. s. 26 – 27, 112 – 121. ISBN 80-244-0512-1.
- [9] KONRÁDOVÁ, V.; VAJNER, L.; UHLÍK, J. *Histologie – přednášky pro bakalářské studium*. 1. vydání, Praha Jinočany : H & H, 2005. s. 56 – 63. ISBN 80-7319-009-5.
- [10] POLONSKY, K. S. The Past 200 Years in Diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 2012, 367 (14), s. 1332 – 1340.

- [11] MUSIL, F. Diabetes mellitus – současná farmakoterapie. *Praktické lékařství*, 2008, 4 (4), s. 156 – 160.
- [12] MALECKI, M. T. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2005, 68 (1), s. S10 – S21.
- [13] GUTHRIE, R. A.; GUTHRIE, D. W. Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Critical Care Nursing Quarterly*, 2004, 27 (2), s. 113 – 125.
- [14] TREVISAN, R.; VEDOVATO, M.; TIENGO, A. The epidemiology of diabetes mellitus. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1998, 13 (8), s. 2 – 5.
- [15] DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical Clinics of North America*, 2004, 88 (4), s. 787 – 835.
- [16] SANGHERA, D. K.; BLACKETT, P. R. Type 2 Diabetes Genetics: Beyond GWAS. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 2012, 3 (5), s. 1 – 23.
- [17] SOLTÉSZ, G. Type 2 diabetes in children: An emerging clinical problem. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2006, 74 (2), s. S9 – S11.
- [18] GOLDSTEIN, B. J. Insulin Resistance as the Core Defect in Type 2 Diabetes Mellitus. *The American Journal of Cardiology*, 2002, 90 (5), s. 3 – 10.
- [19] MALÝ, J.; ŠIMKOVIČ, M.; PECKA, M. Hemokoagulace a renální insuficience, hemokoagulace a diabetes mellitus 2. typu. *Vnitřní lékařství*, 2008, 54 (5), s. 452 – 456.
- [20] HORÁČKOVÁ, J.; KOLESÁROVÁ, J.; HORÁČEK, J. M.; SOBOTKA, L. Infekce kůže a rány u diabetika. *Dermatologie pro praxi*, 2009, 3 (5), s. 225 – 228.
- [21] FEJFAROVÁ, V. Diabetes mellitus a hojení ran. *Interní medicína pro praxi*, 2010, 12 (7 a 8), s. 350 – 354.

- [22] POSPÍŠILOVÁ, A. Nové pohledy na hojení a léčbu ran. *Practicus*, 2011, 10 (5), s. 27 – 30.
- [23] GROFOVÁ, Z. Biologie rány. *Česká geriatrická revue*, 2006, 4 (3), s. 157 – 162.
- [24] NASCIMENTO, A. P; COSTA, A. M. A. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous woun healing. *British Journal of Nutrition*, 2006, 96 (06), s. 1069 – 1077.
- [25] GANAPATHY, N.; VENKATARAMAN, S. S.; DANIEL, R.; ARAVIND, R. J.; KUMARAKRISHNAN, V. B. Molecular biology of wound healing. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 2012, 4 (6), s. 334 – 337.
- [26] SANTORO, M. M; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research*, 2005, 304 (1), s. 274 – 286.
- [27] WALD, M. Hojení ran za patologických podmínek. *Interní medicína pro praxi*, 2002, 4 (10), s. 494 – 498.
- [28] ELLIOTT, CH. G.; HAMILTON, D. W. Deconstructing fibrosis research: do pro-fibrotic signals point the way for chronic dermal wound regeneration? *Journal of Cell Communication and Signalling*, 2011, 5 (4), s. 301 – 315.
- [29] REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. *Europe Surgical Research*, 2012, 49 (1), s. 35 – 43.
- [30] CAZANDER, G.; JUKEMA, G. N; NIBBERING, P. H. Complement Activation and Inhibition in Wound Healing. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, s. 1 – 14.
- [31] JIRKOVSKÁ, A. Hojení kožních afekcí u syndromu diabetické nohy při hospitalizaci. *Vnitřní lékařství*, 2006, 52 (5), s. 459 – 464.
- [32] TELGENHOFF, D.; SHROOT, B. Cellular senescence mechanism in chronic wound healing. *Cell Death & Differentiation*, 2005, 12 (7), s. 695 – 698.

- [33] MRÁZOVÁ, R.; POKORNÁ, A.; KREJCAR, M. Možnosti v hojení ran. *Medicina pro praxi*, 2012, 9 (2), s. 83 – 86.
- [34] WIDGEROW, A. D. When healing stops... *Wound Healing Southern Africa*, 2011, 4 (2), s. 86 – 93.
- [35] BERMUDEZ, D. M.; HERDRICH, B. J.; XU, J.; LIND, R. et al. Impaired Biomechanical Properties of Diabetic Skin: Implications in Pathogenesis of Diabetic Wound Complications. *The American Journal of Pathology*, 2011, 178 (5), s. 2215 – 2223.
- [36] BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117 (5), s. 1219 – 1222.
- [37] LE, N. N.; ROSE, M. B.; LEVINSON, H.; KLITZMAN, B. Implant Healing in Experimental Animal Models of Diabetes. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2011, 5 (3), s. 605 – 618.
- [38] KOMESU, M. CH.; TANGA, M. B.; BUTTROS, K. R.; NAKAO, C. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology*, 2004, 11 (2), s. 63 – 67.
- [39] LIU, Z. J.; VELAZQUEZ, O. C. Hyperoxia, Endothelial Progenitor Cell Mobilization, and Diabetic Wound Healing. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, 10 (11), s. 1869 – 1882.
- [40] KOLLURU, G. K.; BIR, S. C.; KEVIL, CH. G. Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing. *International Journal of Vascular Medicine*, 2012, s. 1 – 30.
- [41] FEJFAROVÁ, V.; JIRKOVSKÁ, A.; BÉM, R. Léčba ran při diabetu. *Interní medicína pro praxi*, 2010, 12 (12), s. 590 – 593.
- [42] GIRARD, M. T.; MATSUBARA, M.; KUBLIN, C.; TESSIER, M. J. et al. Stromal fibroblasts synthesize collagenase and stromelysin during long-term tissue remodeling. *Journal of Cell Science*, 1993, 104 (4), s. 1001 – 1011.

- [43] WALL, S. T.; BEVAN, D.; THOMAS, D. W.; HARDING, K. G. et al. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases During Impaired Wound Healing of the Diabetes Mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 119 (1), s. 91 – 98.
- [44] KUKAČKA, J.; ZIKMUNDOVÁ, K.; KOTAŠKA, K.; HALAČOVÁ, M. aj. PAPP-A a matrixové metaloproteinázy 3 a 9 u pacientů se smíšenou dyslipoproteinémií. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2007, 15 (2), s. 85 – 88.
- [45] HLADÍKOVÁ, M.; ŠTOURAC, P. Matrixové metaloproteinázy v patogenezi roztroušené sklerózy. *Česká a Slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2008, 71/104 (5), s. 530 – 536.
- [46] KUKAČKA, J.; KIZEK, R.; PRŮŠA, R. Budoucnost zinkových metaloproteinů v laboratorní medicíně. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2008, 16 (3), s. 161 – 170.
- [47] WILHELM, S. M.; SHAO, Z. H.; HOUSLEY, T. J.; SEPERACK, P. K. et al. Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1). Identification as the cartilage acid metalloprotease and effect of pH on catalytic properties and calcium affinity. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (29), s. 21906 – 21913.
- [48] GREEN, K. A.; ALMHOLT, K.; PLOUG, M.; RØNØ, B. et al. Profibrinolytic Effects of Metalloproteinases during Skin Wound Healing in the Absence of Plasminogen. *Journal of Investigative Dermatology*, 2008, 128 (8), s. 2092 – 2101.
- [49] AMĂLINEI, C.; CĂRUNTU, I. D.; BĂLAN, R. A. Biology of metalloproteinases. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 2007, 48 (4), s. 323 – 334.
- [50] MARTINS, V. L.; CALEY, M.; O'TOOLE, E. A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell & Tissue Research*, 2013, 351 (2), s. 255 – 268.
- [51] LIPKA, D.; BORATYŃSKI, J. Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2008, 62, s. 328 – 336.

- [52] SAARIALHO-KERE, U. K.; PENTLAND, A. P.; BIRKEDAL-HANSEN, H.; PARKS, W. C.; WELGUS, H. G. Distinct Populations of Basal Keratinocytes Express Stromelysin-1 and Stromelysin-2 in Chronic Wounds. *The Journal of Clinical Investigation*, 1994, 94 (1), s. 79 – 88.
- [53] LOBMANN, R.; SCHULTZ, G.; LEHNERT, H. Proteases and the Diabetic Foot Syndrome: Mechanism and Therapeutic Implications. *Diabetes Care*, 2005, 28 (2), s. 461 – 471.
- [54] TANDARA, A. A.; MUSTOE, T. A. MMP- and TIMP-secretion by human cutaneous keratinocytes and fibroblasts – impact of coculture and hydration. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2011, 64 (1), s. 108 – 116.
- [55] BULLARD, K. M.; LUND, L.; MUDGETT, J. S.; MELLIN, T. N. et al. Impaired Wound Contraction in Stromelysin-1 – Deficient Mice. *Annals of Surgery*, 1999, 230 (2), s. 260 – 265.
- [56] VAIDYA, H. B.; GIRI, S.; JAIN, M.; GOYAL, R. K. Decrease in serum matrix metalloproteinase-9 and metalloproteinase-3 levels in Zucker fa/fa obese rats after treatment with swertiamarin. *Experimental & Clinical Cardiology*, 2012, 17 (1), s. 12 – 16.
- [57] SUBRAMANIAM, K.; PECH, CH. M.; STACEY, M. C.; WALLACE, H. J. Induction of MMP-1, MMP-3 and TIMP-1 in normal dermal fibroblasts by chronic venous leg ulcer wound fluid*. *International Wound Journal*, 2008, 5 (1), s. 79 – 86.
- [58] MULDER, G. B.; LUO, S.; GRAMLICH, P. The Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rat. Diet Evaluation Study for the Induction of Type 2 Diabetes in Obese Female ZDF Rats (online). *Charles river*, 2010. Dostupný z:
http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_zdf_diet_eval_tech_sheet.pdf
(1. 3. 2013)
- [59] SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian Journal of Medical Research*, 2007, 125 (3), s. 451 – 472.

- [60] SHAFRIR, E. Contribution of animal models to the research of the causes of diabetes. *World Journal of Diabetes*, 2010, 1 (5), s. 137 – 140.
- [61] UNGER, R. H. How Obesity Causes Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 1997, 8 (7), s. 276 – 282.
- [62] ZDF RAT (online). *Charles river*, 2003. Dostupný z:
http://www.crj.co.jp/pdf/info_morbid_data/24/2909845/US-ZDF.pdf (1. 3. 2013)
- [63] CORSETTI, J. P.; SPARKS, J. D.; PETERSON, R. G.; SMITH, R. L.; SPARKS, CH. E. Effect of dietary fat on the development of non-insulin dependent diabetes mellitus in obese Zucker diabetic fatty and female rats. *Atherosclerosis*, 2000, 148 (2), s. 231 – 241.
- [64] VACEK, Z. *Histologie a histologická technika. Histologická technika II. část*. 1. vydání, Brno : IDV PZ, 1996. s. 159. ISBN 80-7013-202-7.
- [65] JIRKOVSKÁ, M. *Histologická technika*. 1. vydání, Praha : Galén, 2006. s. 45 – 49. ISBN 80-7262-263-4.
- [66] VIDINSKÝ, B.; GÁL, P.; TOPORCER, T.; LONGAUER, F. et al. Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats. *Acta Veterinaria Brno*, 2006, 75 (2), s. 197 – 202.
- [67] MENETREY, J.; KASEMKIJWATTANA, C.; DAY, C. S.; BOSCH, P. et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 2000, 82 (1), s. 131 – 137. Převzato z: Vidinský et al. (2006) [66].
- [68] RASIK, A. M.; SHUKLA, A.; PATNAIK, G. K.; DHAWAN, B. N. et al. Wound healing activity of latex of *Euphorbia neriifolia* Linn. *Indian Journal of Pharmacology*, 1996, 28 (2), s. 107 – 109. Převzato z: Vidinský et al. (2006) [66].

[69] WHELAN, H. T.; BUCHMANN, E. V.; DHOKALIA, A.; KANE, M. P. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *Journal of Clinical Laser Medicine Surgery*, 2003, 21 (2), s. 67 – 74. Převzato z: Vidinský et al. (2006) [66].

[70] CONNOLLY, A. J.; SUH D. Y.; HUNT T. K.; COUGHLIN S. R. Mice Lacking the Thrombin Receptor, PAR1, Have Normal Skin Wound Healing. *The American Journal of Pathology*, 1997, 151 (5), s. 1199 – 1204. Převzato z: Vidinský et al. (2006) [66].

[71] KÄHÄRI, V. M.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology*, 1997, 6 (5), s. 199 – 213.