

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**INTERAKCE TKÁŇOVÝCH SYSTÉMŮ**  
**S PŘÍPRAVKEM MDOC™**

**Hradec Králové 2009**

**Mgr. Gabriela Jamborová**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

*Jamburova!*

Farmaceutická fakulta UK  
Hradec Králové  
knihovna  
Pr.č. 1 w 75 118

V úvodu této práce bych ráda poděkovala panu Doc. RNDr. V. Semeckému, CSc. za odborné vedení, námět disertační práce i poskytnuté rady. Dále bych chtěla moc poděkovat Doc. P. Nachtigalovi, PhD. za konzultace, trpělivost, veškerou pomoc, slova podpory i podněty k zamyšlení, Ing. J. Briestenskému za poskytnutý přípravek MDOC<sup>TM</sup>, MUDr. P. Lochmannovi za materiály i cenné rady v rámci studie na prasečím modelu, celému kolektivu z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN v Hradci Králové za poskytnutí výsledků biochemických analýz a také p. Pavlíně Jabůrkové za skvělou atmosféru a ochotu při přípravě preparátů pro histologickou analýzu. Děkuji i všem ostatním kolegům z Katedry biologických a lékařských věd za vytvoření vlnidného pracovního prostředí.

## Seznam zkratek

ADP	Adenosindifosfát
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintrifosfát
ATS	Ateroskleróza
BCR	Receptor lymfocytu B
CCL-2	Monocytární chemotaktický protein 2
CD	Cluster of differentiation
CCR2	Receptor monocytárního chemotaktického faktoru 2
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CFU	Colony forming unit
CSF	Colony stimulating factor
Cyr61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
ECM	Extracelulární matrix
EDGF	Endothelial growth factor
EGF	Epidermal growth factor
ET-1, 2, 3	Endotelin 1, 2, 3
ETA, ETB	Endotelinové receptory A, B
Fas	Apoptózu signalizující molekula
FGF	Fibroblast growth factor
GP	Glykoproteiny
HA	Kyselina hyaluronová
HB-EGF	Heparin binding epidermal growth factor
HDL	High density lipoproteins
HDR	Host defence response
3-HMG CoA reductáza	3-hydroxymethylglutaryl koenzym A reductáza
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IDF	Insoluble dietary fiber
IGF-1	Insulin like growth factor - 1
IL-1	Interleukin-1
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
KGF	Keratinocyte growth factor
LAP	Lymphocyte activation gene-3 associated protein
LDL	Low density lipoproteins
LR	LDL-receptor related protein
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LTBP -TGF- $\beta$	Latent TGF- $\beta$ binding protein
LT	Leukotrieny
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MDGF	Macrophage derived growth factor
MDOCTM	Mikrodispergovaná oxidovaná celulózaTM
MIP-1 $\alpha$ , MIP- $\beta$	Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ , $\beta$
MMPs	Matrixové metaloproteinázy
NGF	Nerve growth factor
OC	Oxidovaná celulóza
ORC	Oxidovaná regenerovaná celulóza
OxLDL	Oxidized low-density lipoproteins



qRT-PCR	Kvantitativní polymerázová řetězová rce s reverzní transkripcí
PAF	Platelet activated factor
PAGA	Polyanhydroglucuronic acid
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PDGF	Platelet derived growth factor
PMNL	Polymorfonukleární leukocyty
ppm	parts per milion
PVA	Polyvinylalkohol
SCFA	Short chain fatty acids
SDF	Soluble dietary fiber
SSI	Surgical Site Infections
TAG	Triacylglyceridy
T <sub>C</sub> lymfocyty	Cytotoxické lymfocyty
TCR	Receptor lymfocytu T
TF	Tkáňový faktor
TGF- $\alpha$ , $\beta$	Transforming growth factor $\alpha$ , $\beta$
TGF- $\beta$ RI, II	Receptor pro transformující růstový faktor $\beta$ I, II
T <sub>H</sub> lymfocyty	Helper lymphocytes
T <sub>S</sub> lymfocyty	Supresorové lymfocyty
TIMPs	Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TNF RI, RII	Receptory pro tumor nekrotizující faktor I, II
uPA	urokinase-type plasminogen activator
uPAR	urokinase plazminogen activator receptor
VCAM	Vascular cell adhesive molecule
VEGF	Vascular epidermal growth factor
VLA	Very late antigens
VLDL	Very low density lipoproteins
vWf	von Willebrandův faktor

<b>Obsah</b>	
<b>Seznam zkratk</b>	1
1. <b>Úvod</b>	5
2. <b>Kožní systém</b>	8
3. <b>Hojení kožních ran</b>	12
3.1. Zánětlivá fáze	12
3.2. Proliferační fáze	18
3.3. Remodelace mezibuněčné hmoty	20
3.4. Maturační fáze a tvorba jizvy	22
4. <b>Regulace procesu hojení</b>	23
4.1. Transformující růstový faktor $\beta$ (TGF- $\beta$ )	24
4.2. Tumor nekrosis factor (TNF- $\alpha$ )	25
4.3. Monocytární chemotaktický protein (MCP-1)	26
5. <b>Využití zvířecích experimentálních modelů v procesu hojení ran</b>	28
6. <b>Současný pohled na léčbu akutních kožních poranění</b>	30
6.1. Mikrodispergovaná oxidovaná celulóza MDOC <sup>TM</sup>	31
7. <b>Cíle předkládané disertační práce</b>	34
8. <b>Materiál a metodika</b>	35
8.1. Experimentální navození akutní zánětlivé reakce	35
8.2. Makroskopická a histologická analýza	36
8.3. Imunohistochemická analýza	37
9. <b>Výsledky makroskopické analýzy</b>	38
10. <b>Výsledky histologické analýzy</b>	44
11. <b>Výsledky imunohistochemické analýzy</b>	49
11.1. Imunohistochemické barvení TNFR I	49
11.2. Imunohistochemické barvení TGF $\beta$ RII	49
11.3. Imunohistochemické barvení CCR2	50
12. <b>Studium vlivu derivátu MDOC<sup>TM</sup> na proces hojení u infikované kožní rány</b>	57
13. <b>Materiál a metodika</b>	59
13.1. Experimentální vytvoření modelu infikované kožní rány	59
13.2. Makroskopická a histologická analýza	60
13.3. Mikrobiologická analýza	60
14. <b>Výsledky</b>	61
15. <b>Závěr</b>	70
16. <b>Diskuze</b>	71
17. <b>Ateroskleróza</b>	77
17.1. Patofyziologie aterosklerotického procesu	77
18. <b>Adhezní molekuly a jejich role v aterosklerotickém procesu</b>	79
18.1. Imunoglobulinová skupina adhezních molekul	79
19. <b>Myší experimentální modely v ateroskleróze</b>	81
20. <b>Vybrané metody stereologie</b>	83
21. <b>Vláknina</b>	84
21.1. Význam a účinky vlákniny	84
21.2. Typy dietní vlákniny	86
22. <b>Sledování vlivu MDOC<sup>TM</sup> na aterogenní parametry u apo-E deficientních myší</b>	87
22.1. Biochemická analýza	88
22.2. Histologická analýza	88
22.3. Stereologická analýza	89
22.4. Statistické zhodnocení	89



23.	<b>Objasnění mechanismu hypolipidemického efektu MDOC™ u samic kmene C57BL/6J</b>	90
23.1.	Stanovení absorpce cholesterolu v tenkém střevě	90
23.2.	Objasnění mechanismu účinku MDOC™ v tenkém střevě	91
23.3.	Zhodnocení schopnosti fermentace přípravku MDOC™	91
23.4.	Určení celkové dietní vlákniny v přípravku MDOC™	92
23.5.	Stanovení eliminace žlučových kyselin ve stolici	92
23.6.	Stanovení celkového cholesterolu v játrech	92
23.7.	Statistické zhodnocení	93
24.	<b>Výsledky sledování vlivu MDOC™ na aterogenní parametry u myších modelů aterosklerózy</b>	94
24.1.	Výsledky studie po podání 50 mg/kg/den MDOC™ ve standardní dietě u apoE-deficientních myší	94
24.2.	Výsledky studie po podání 5% MDOC™ v aterogenní dietě u apoE/LDLR DKO deficientních myší	97
24.3.	Výsledky studie po podání 5% MDOC v aterogenní dietě u apoE-deficientních myší	99
25.	<b>Výsledky objasnění mechanismu hypolipidemického efektu MDOC™ u samic myšího kmene C57BL/6J</b>	103
25.1.	Stanovení absorpce cholesterolu v tenkém střevě metodou kapalinové scintilační spektrometrie s užitím <sup>3</sup> H-cholesterolu	103
25.2.	Určení mechanismu účinku MDOC™ v tenkém střevě	104
25.3.	Fotometrické stanovení množství žlučových kyselin ve stolici	104
25.4.	Stanovení obsahu cholesterolu v játrech	105
25.5.	Vliv MDOC™ na proces fermentace in vivo	106
25.6.	Vliv MDOC™ na proces fermentace in vitro	106
25.7.	Určení obsahu vlákniny v přípravku MDOC™	107
26.	<b>Diskuze</b>	108
27.	<b>Souhrn</b>	113
28.	<b>Summary</b>	118
29.	<b>Seznam literatury</b>	123

## 1. Úvod

Porušením kožního krytu dochází k celkovému narušení integrity tělesného povrchu a k aktivaci procesu hojení (1). Nárůst počtu kožních poranění je způsoben zvyšujícím se počtem úrazů i prodlužujícím se lidským věkem. Nehojící se rána je velmi často komplikací řady onemocnění, např. chronické žilní insuficience, *diabetu mellitu*, zhoubných nádorů či aterosklerózy tepen dolních končetin (2). Cílem ošetřování kožních defektů je proto dosáhnout v krátkém časovém intervalu funkční regenerace, případně reparace poškozené tkáně. Prohloubení patofyziologických poznatků funkční regenerace a reparace tkáně přispělo k významnému zdokonalení konzervativního i radikálního způsobu ošetřování a léčby poranění měkkých tkání.

Ke studiu procesu hojení existuje několik přístupů, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*: i.) podrobná histologická a morfoloická analýza umožňuje zjištění dynamiky průběhu procesu hojení např. po lokálním podání účinného přípravku; ii.) s využitím imunohistochemických metod je možné tyto markery lokalizovat v tkáňových řezech na základě interakce antigen-protilátka. Lze tedy hodnotit míru exprese vybraných prozánětlivých působků v jednotlivých fázích hojení; iii.) molekulárně biologická analýza regulačních mechanismů a interakcí mezi kooperujícími buňkami, cytokiny a růstovými faktory přispěla ke zkrácení léčebné doby hojení a také ke snížení počtu nezhojených kožních poranění (2).

Ošetření a léčba rány jsou komplexním procesem. Dříve používaný přístup hojení rány na bázi suché terapie je v současnosti nahrazován tzv. vlhkým hojením, který spočívá ve využití nových poznatků o patofyziologii hojení a současném použití moderních technologií a metod. V klinické praxi patří k základním postupům ošetřování použití tzv. krycích terapeutických obvazů. Příznivou vlastností těchto materiálů při správné aplikaci, je schopnost modulace terapeutického procesu, zejména zásahem do buněčných aktivit, zajištění adekvátní vlhkosti a respektování fyziologických podmínek hojení. Vlhké prostředí v ráně je spojeno s přirozenou teplotou, mírně kyselým pH, čímž jsou zajištěny ideální podmínky pro tvorbu granulační tkáně a nového epitelu. Tyto materiály v kombinaci s dalšími terapeuticky účinnými látkami (např. stříbro, aktivní uhlí, jód atd.) vykazují také baktericidní či bakteriostatické účinky, což umožňuje ponechat materiál na ráně i několik dní bez prokázaných závažných nežádoucích účinků. Existuje několik skupin (např. hydrogely, aktivní uhlí, algináty, hydrokoloidy, polymery, polyuretanové pěny) indikovaných na určitou fázi hojení, které se mohou účinkem překrývat. Hojně jsou používány lokální

makromolekulární přípravky, které ovlivňují zejména remodelační proces a podprují kvalitní tvorbu jizvy. Mezi důležité v léčbě akutních i chronických kožních poranění patří makromolekuly (deriváty) odvozené od oxidované celulózy (OC), která se v lékařské praxi používá již od 40. let 20. století jako lokální hemostyptikum. Purifikací OC vzniká vysoce čistá oxidovaná regenerovaná celulóza (ORC) s téměř nulovou toxicitou, komplexní biodegradabilitou a standardními fyzikálními i chemickými vlastnostmi (3). Podílí se na zachování integrity mikroprostředí rány zajištěním vlhkého prostředí, snížením pH, stimulací zánětlivých elementů (4), cytokinů i podpůrných růstových faktorů. Dále interakcí s matrixovými meteloproteinázami (MMPs) podporuje novotvorbu tkáně. ORC se nejčastěji používá v mikrokrystalické formě a ve formě textilie. Slouží také jako makromolekulární nosič, na který mohou být navázány ionty ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) či antibiotická léčiva.

Při řešení experimentální části předkládané dizertační práce byla použita mikrodispergovaná oxidovaná celulóza (MDOC™). MDOC™ vzniká oxidací surové celulózy s následným hydrolytickým zpracováním (patent GB2335921, I. Santar et al., Altracel Pharmaceuticals Ltd, Dublin, Ireland). Tento bílý biodegradabilní prášek s nulovou toxicitou (5) je od roku 1998 v lékařské praxi používán jako účinné hemostyptikum. Jedná se o kopolymer polyanhydroglukosy a polyanhydroglukuronové kyseliny (PAGA) či její soli ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ). *In vivo* studii na myším modelu byl po intraperitoneální aplikaci  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  soli MDOC™ potvrzen imunomodulační efekt ve smyslu zvýšení počtu buněčných populací (periferních monocytů a B-lymfocytů) (4). *In vitro* studii na buněčných kulturách myších splenocytů a lidských periferních leukocytů, byla po podání  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  soli MDOC™ pozorována stimulace spontánní proliferace; použitím cytokinových assayů byla také potvrzena zvýšení TNF- $\alpha$  (4). Na experimentálním modelu hyperlipoproteinémie (králičí model) byl po krátkodobém podávání MDOC™ ve stravě prokázán mírný hypolipidemický účinek (pilotní studie, nepublikovaná data KBLV, FaF). Tento účinek byl navíc po krátkodobém podávání MDOC™ v dietě pozorován u myšího apoE-deficientního modelu (6). Přesný mechanismus hypolipidemického působení MDOC™ je předmětem dalšího studia, ale předpokládá se, že je obdobný jako u jiných druhů rozpustné dietní celulózy. Experimentálními studii je prokázáno, že celulóza a její deriváty působí snížení vstřebávání tuků znesnadněním jejich emulgace (7) a zpomalení zpětného vstřebávání žlučových kyselin a tím i snížení koncentrace v játrech ze žlučových kyselin *de novo* vzniklého cholesterolu (8). MDOC™ substance může být např. vhodnou součástí tzv. funkčních potravin pro pacienty s hyperlipoproteinémií. Pohled na recentní statistické údaje řadí choroby oběhového systému jako vedoucí příčinu úmrtnosti v České republice. Díky

novým poznatkům o rizikových faktorech a možnostech jejich ovlivnění moderními léky i vývojem revaskularizačních léčebných metod má úmrtnost klesající tendenci. Současným léčebným trendem je v první řadě farmakologická léčba pro úpravu složek plazmatického lipidového spektra a kombinace režimových a dietních opatření, tzn. úprava životního stylu.

Předkládaná disertační práce se zabývá:

- Testováním vlivu lokálně aplikovaného přípravku MDOC™ u experimentálně navozeného akutního zánětu kůže na modelu laboratorního potkana a prasete domácího.
- Sledováním vlivu perorálně podávané MDOC™ na hladiny lipidů a aterogenezi u myšího modelu aterosklerózy.



## 2. Kožní systém

Kůže (*cutis*) je anatomicky i fyziologicky specializovanou hraniční vrstvou tvořící zevní povrch lidského těla (9). Hlavní funkcí je ochrana organismu před nepříznivými vlivy (např. infekce, dehydratace, ultrafialové záření) a zajištění komunikace se zevním prostředím. Obranná reakce je založena na vzájemné kooperaci přirozených bariér, imunitního systému a aktivaci buněčných i humorálních složek. Kožní systém se také podílí na regulaci tělesné teploty, metabolických pochodů i exkreci odpadových látek (1).

Kůže se skládá z epidermis (pokožky) neboli zevní epitelové vrstvy ektodermového původu, z dermis (škáry, corium), vnitřní vazivové vrstvy původem z mezodermu a hypodermis (podkožní řídké vazivové tkáň, *tela subcutanea*), která může obsahovat polštář tukových buněk, tzv. *panniculus adiposus* (10). Dermis je s epidermis spojena nepravidelně pomocí papilárních výběžků, které alternují s tzv. epidermálními lištami. Hypodermis připojuje kůži volně k přilehlým tkáním a anatomicky odpovídá povrchové fascii. Dle tloušťky epidermis se rozlišuje tlustý (dlaně, plosky nohou) a tenký typ kůže (ostatní části těla) (11).

Epidermis se skládá převážně z rohovějícího vrstevnatého dlaždicovitého epitelu, který je neustále produkován keratinocyty, jenž se průběžně odlučují. Dále epidermis obsahuje méně časté buněčné typy; melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky. Slouží jako ochranná bariéra proti mechanickému poškození, vysychání a pronikání nežádoucích mikrobu (12). V epidermis kůže tlustého typu lze rozlišit pět vrstev: i) *stratum basale*, ii) *stratum spinosum*, iii) *stratum granulosum*, iv) *stratum lucidum* a v) *stratum corneum*. V kůži tenkého typu je *stratum granulosum* a *stratum lucidum* někdy málo patrné a *stratum corneum* je poměrně tenké (13).

*Stratum basale* (*stratum germinativum*) se skládá z jedné vrstvy bazofilních cylindrických až kubických buněk uložených na bazální lamině dermo-epidermálního rozhraní. Dlouhé osy těchto buněk směřují kolmo k *lamině basalis* a jejich boční a horní povrchy jsou mezi sebou propojeny velkým množstvím desmozomů. *Stratum basale* je charakteristické intenzivní mitotickou aktivitou a spolu s přiléhající částí následující vrstvy je zodpovědné za neustálou výměnu epidermálních buněk. Všechny elementy této vrstvy obsahují filamenta o průměru kolem 10nm (tzv. cytokeratiny). Směrem vzhůru počet cytokeratinů v buňkách narůstá a ve *stratum corneum* tvoří až polovinu jejich celkového obsahu bílkovin (11).

*Stratum spinosum* je složeno z kubických či lehce oploštělých buněk s centrálně uloženým jádrem. Jejich cytoplazma obsahuje ostnitě výběžky cytokeratiny, které končí v desmozomech, což propůjčuje buňkám charakteristický vzhled. Svazky filament hrají důležitou roli při zachování soudržnosti mezi buňkami a odolnosti proti oděru. Veškerá mitotická aktivita probíhá v tzv. *stratum germinativum Malphigi*, které zahrnuje *stratum basale* i *stratum spinosum*.

*Stratum granulosum* se skládá ze tří až pěti vrstev oploštělých polygonálních buněk s centrálně uloženým jádrem a cytoplazmou vyplněnou bazofilními keratohyalinovými granulemi (bohaté na histidin a cystein). Dále se zde nachází malé ovoidní až tyčinkovité útvary s lamelárními granulemi (viditelná v elektronovém mikroskopu), která jsou tvořena lipidovou dvouvrstvou a svůj obsah uvolňují do mezibuněčných prostor, což působí jako tmel proti průniku cizorodých látek.

*Stratum lucidum* je více výrazná u tlustého typu kůže a je složena z tenké vrstvy extrémně zploštělých eosinofilních buněk. Organely ani jádra nejsou zřetelná a cytoplazmu tvoří hustě uspořádaná filamenta. Sousedící buňky jsou spojeny viditelnými desmozomy.

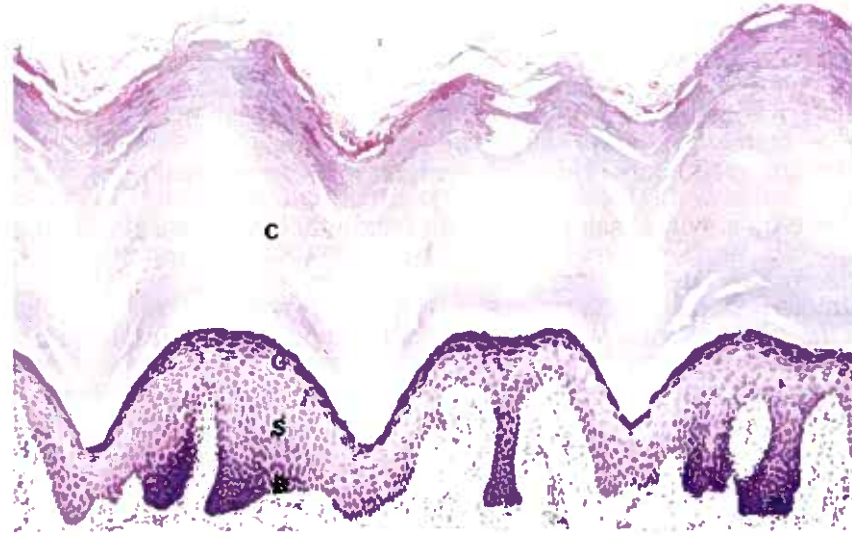
*Stratum corneum* neboli rohová vrstva je tvořena 15-20 vrstvami oploštělých bezjaderných zrohovatělých buněk, které mají cytoplazmu vyplněnou skleroproteinem keratinem. Keratin obsahuje nejméně šest různých polypeptidů, přičemž se vždy tři polypeptidové řetězce obtáčejí kolem sebe a vytvářejí podjednotky tonofilament. V keratinizovaných buňkách není již patrné jádro ani cytoplazmatické organely. Na vymizení cytoplazmatických organel se podílejí lysozomální hydrolytické enzymy. V nejpovrchnější vrstvě ztrácejí keratinizované buňky vzájemné spojení a v malých skupinkách se odlupují. Tato vrstva je označována jako *stratum disjunctum* (13). V kůži tenkého typu je *stratum granulosum* a *stratum lucidum* vyvinuto méně a *stratum corneum* bývá poměrně tenké (11).

K obnově epidermis dochází obvykle za 15-30 dnů mitotickou aktivitou buněk *stratum germinativum*. Specializované buňky epidermis melanocyty, původem z neurální lišty se nachází pod a mezi elementy *stratum basale* a ve vlasových folikulech. Produkují tmavohnědý pigment eumelanin. Mají okrouhlý tvar těla, ze kterého vysílají nepravidelné výběžky mezi buňky *stratum basale* a *spinosum*. K okolním přilehlým keratinocytům jsou připojeny desmozomy, hemidesmozomy jsou poutány k bazální lamině. Obsahují velké množství malých mitochondrií, Golgiho komplex a drsné endoplazmatické retikulum. Pomocí tyrosinázy přeměňují tyrozin přes meziproducty a syntetizují melanin. Melanocyty melanin syntetizují, nicméně jeho hlavní zásobárnou jsou epitelové buňky.



**Obr. 1 Histologická stavba epidermis.** V epidermis kůže tlustého typu lze rozlišit pět vrstev. *Stratum basale* (B) je složeno z melanocytů a jedné vrstvy mateřských keratinocytů o vysoké mitotické aktivitě. *Stratum spinosum* (S) obsahuje buňky spojené desmozomy, vyznačující se vysokou produkcí keratinu a proteinových vláken. *Stratum granulosum* (G) je tvořeno vrstvami polygonálních buněk s keratohyalinovými granulemi, jejichž obsah funguje jako tmel proti pronikání cizorodých látek. Rohová vrstva tzv. *Stratum corneum* (C) představuje vrstvy oploštělých keratinizovaných buněk, přičemž elementy bez jader uložené nejsvrchněji průběžně podléhají deskvamaci. Barvení hematoxylin&eosin, origin. zvětšení 100x.

Převzato z <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Integumentary/Integum.htm>.

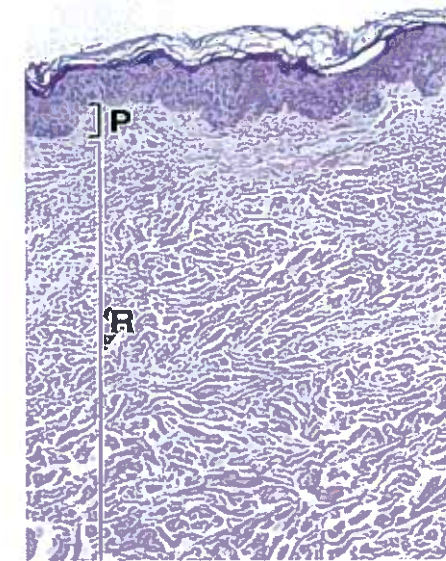


V keratinocytech melaninová granula splývají s lysozomy, což je příčinou vymizení melaninu z povrchových epitelových buněk. Ve *stratum spinosum* jsou zastoupeny také Langerhansovy buňky. Tyto elementy hvězdicovitého tvaru patří k buňkám monocytomakrofágové linie, které váží a prezentují antigeny T-lymfocytům. Významnou roli hrají zejména v kožních imunitních reakcích. Merkelovy buňky jsou dalšími epidermálními epitelovými elementy s malými tmavými granulemi v cytoplazmě. Při jejich bázi se nachází volná nervová zakončení, která vytváří rozšířené terminální disky. Tyto buňky poté slouží jako sensorické mechanoreceptory (11).

Dermis (škára) je složena z vaziva, které propojuje epidermis s přilehlým podkožím (hypodermis). Její povrch je nepravidelný hlavně v místech, kde je kůže vystavována častým tlakům. Je tvořena četnými výběžky tzv. dermálními papilami, které alternují s výběžky epidermis tzv. epidermálními lištami. Mezi epidermis a papilární vrstvou škáry je vždy vyvinuta bazální lamina, pod kterou se nachází síť retikulárních vláken (*lamina reticularis*) a dohromady tvoří tzv. bazální membránu. Dermis se dělí na dvě vrstvy s nezřetelným rozhraním, *stratum papillare* a *reticulare*.

**Obr. 2 Histologické stavba dermis.** Dermis se skládá se ze dvou vazivových vrstev. *Stratum papillare* (P) neboli řídkého vazivo a *Stratum reticulare* (R) husté vazivo s vysokým obsahem kolagenních vláken a proteoglykanů. Barvení hematoxylin&eosin, origin. zvětšení 60x.

Převzato z <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Integumentary/Integum.htm>.



*Stratum papillare* tvoří řídké vazivo, ze kterého vystupují speciální kotevní kolagenová vlákna, která se upínají do bazální laminy a vážou dermis k epidermis. V této vrstvě se také nachází buňky, tzn. fibroblasty, mastocyty, vcestovalé leukocyty i makrofágy.

*Stratum reticulare* je složeno z neuspořádaného hustého vaziva (kolagen typu I.) s menším zastoupením buněk. Ve velké míře se zde vyskytují glykosaminoglykany (zejména dermatansulfát), jejichž obsah se v různých oblastech dermis liší. Krevní cévy vytváří plexus malých arterií a vén propojený s povrchovým subpapilárním plexem terminálních arterií, kapilár a venul. Tato bohatá cévní síť pomáhá regulovat tělesnou teplotu a vyživuje přilehlou bezcévnou epidermis. Dermis obsahuje četná elastická vlákna, lymfatické cévy i epidermální deriváty (vlasové folikuly, potní i mazové žlázy) a nervová zakončení tvořená sensorickými a autonomními nervovými vlákny sympatiku. Parasympatické zásobení zde zcela chybí. Aferentní nervová vlákna tvoří povrchovou dermální pletěň s volnými zakončeními, oplétají vlasové folikuly a zajišťují inervaci opouzdřených sensorických orgánů (Meissnerových a Vater-Pacciniho tělísek) (14).

Podkožní vazivo neboli *tela subcutanea* je tenkou vrstvou, která se skládá z řídkého vaziva, které volně připojuje kůži k přilehlým orgánům. Často obsahuje tukové buňky, jejichž velikost závisí na stavu výživy jedince (14).

### 3. Hojení kožních ran

Rána je definována jako porušení souvislosti kůže, sliznice nebo povrchu orgánu vzniklé působením zevních faktorů. Tyto faktory mohou být původu mechanického, termického, chemického i radiačního (11).

Hojení kožních ran je sledem kaskádovitě probíhajících dynamických dějů, při kterých dochází k aktivaci buněčných i enzymových systémů. Skládá se ze čtyř hlavních fází, které jsou definovány převládajícím procesem. Jedná se hemostázu, zánětlivou reakci, proliferační a remodelační proces (15). Tato stadia jsou typicky vyjádřena u hojení ran *per primam intentionem*, kdy dochází u neinfikované rány s rovnými okraji přiloženými k sobě ke zhojení za kratší dobu s charakteristicky sníženou tvorbou granulační tkáně a minimálními nároky na množství nových epitelů epidermis. Hojení *per secundam intentionem* je typické pro popáleniny, rány otevřené a zvláště pak pro rány infikované. Tyto rány jsou charakteristické tvorbou granulací a končí překrytím defektu po spontánní migraci epitelových buněk (2). V místě postižení dochází k interakci cytokinů, růstových faktorů, epiteliálních i mezenchymálních buněk s rezidentními a rekrutovanými hematopoetickými buňkami a složkami extracelulární matrix (ECM). Cílem je vytvořit nový povrch a obnovit napětí poškozené tkáně (1).

Celý proces hojení je ovlivňován řadou faktorů, které lze rozdělit na vnější a vnitřní. Mezi vnitřní faktory patří např. imunitní reakce, přítomnost vitamínů, stopových prvků, přidružené choroby krve a cév. Z vnějších faktorů je to především způsob ošetřování postiženého místa, vliv stresu a medikace (16).

Abnormality v patologickém procesu hojení akutní rány mohou vést přes stadium dlouhodobého nehojícího se defektu až ke vzniku rány chronické. Zpomalení v hojení může nastat v případě neadekvátního prodloužení zánětlivé reakce či angiogenní odpovědi. Naopak příliš rychlým průběhem může dojít k rozvoji fibroproliferativních stavů tzn. tvorbě keloidů či hypertrofické jizvy, které jsou charakteristické abnormální akumulací kolagenu v místě poranění, což je způsobeno zejména nedostatečnou eliminací granulační tkáně (2).

#### 3.1. Zánětlivá fáze

Proces hojení ran zahrnuje terminální fázi zánětlivé odpovědi a spolu s reakcemi obranného zánětu tvoří tzv. obrannou odpověď organismu (HDR-Host Defense Response) (11). Nástup časné imunitní reakce je potřebný k zábraně vstupu infekce do organismu a je velmi žádoucí součástí HDR, s cílem zachování homeostázy. Spolu s imunitními obrannými

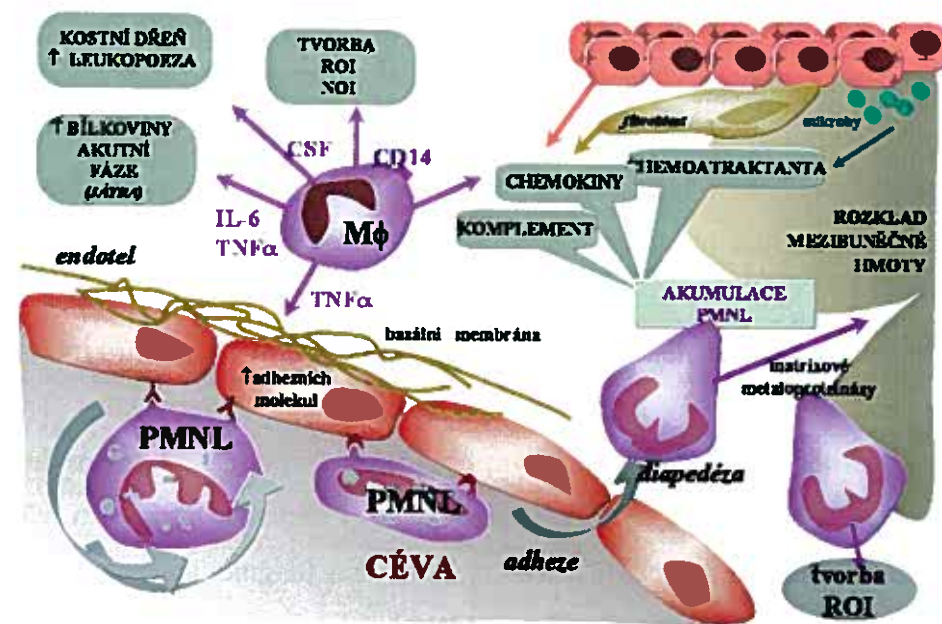
mechanismy, ve kterých převažuje buněčná složka (17) hraje důležitou roli také neuroendokrinní regulační systém, který se podílí na rozpoznání dalších nežádoucích změn z vnějšího i vnitřního prostředí (18). Zánětlivé procesy mají v počátečních fázích pozitivní vliv na regenerační aktivitu, avšak probíhá-li zánět déle, jsou regenerační mechanismy potlačeny a výsledkem je vytvoření jizvy. Lokální zánětlivá reakce během procesu hojení ran není vždy stejná, ale odvíjí se od řady přídatných okolností. Poznatky o prodloužení hojení ran a nežádoucích negativních regulačních mechanismech lokální zánětlivé reakce jsou stále častěji předmětem studia řady experimentálních studií (19).

Zánětlivou reakci lze zcela uměle rozdělit na tři vzájemně se prolínající fáze, iniciační, vrcholnou a pozdní (18). Iniciační fáze nastupuje během několika vteřin po porušení kožního krytu s časovým omezením na hodiny až dny (18). Charakteristickým rysem této fáze je rychlá amplifikace imunitní odpovědi. Nejdříve dochází k dočasné vazokonstrikci (10 až 15 minut) lokálním působením adrenalinu a vazoaktivních aminů (prostaglandiny, tromboxany) (2). V průběhu několika minut je aktivována primární hemostáza a koagulační systém. Hlavními elementy této fáze jsou trombocyty, které vytváří primární hemostatickou zátku (20). Jsou to bezbarvé bezjaderné reaktivní elementy s řadou receptorů typu glykoproteinů (GP) (např. von Willebrandův faktor VIII (vWf), fibrinogen, fibronectin). Trombocyty se vyznačují negativně nabitým fosfolipidovým povrchem a vysokým obsahem denzních (např. ADP, ATP, Ca<sup>2+</sup>) a  $\alpha$  granulí (např. destičkový růstový faktor 4, fibrinogen, vWf, faktor 5), důležitých pro koagulační reakci (17). Krevní koagulum funguje jako tzv. provizorní matrix pro zachycení a migraci buněčných elementů (1) a jako obrana proti invazi mikrobů (21). Důležitou složkou provizorní matrix jsou z granulí uvolněné cytokiny, růstové faktory a proteiny. Fibronectin spolu s fibrinem podporuje migraci, adhezi trombocytů i endotelových buněk v provizorní matrix. Při procesu hojení je syntetizován fibroblasty i makrofágy. Experimentálními studiemi u myšího modelu s absencí fibrinogenu byla prokázána nekontrolovaná migrace epiteliálních buněk, což v důsledku vedlo ke snížení pevnosti a pružnosti rány (1). Sekundární hemostáza je zahájena aktivací vnější (tkáňový faktor VII., tissue factor TF) nebo vnitřní (Hagemanův faktor XII.) koagulační cesty. Cílem je vytvoření fibrinové sítě, tzn. definitivní krevní zátky a rozpuštění krevního koagula. Kromě zástavy krvácení se trombocyty v procesu hojení ran účastní zánětlivé fáze, reepitelizace, fibroplazie a také procesu angiogeneze. Sekrecí růstových faktorů jako je transformující růstový faktor  $\beta$  a  $\alpha$  (TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ ) a destičkový růstový faktor (PDGF) podporují regeneraci nově vytvořené tkáně (17). V případě úplné absence trombocytů nedochází k narušení všech fází procesu



hojení, jak potvrzují experimentální studie provedené na hlodavcích, nicméně prozánětlivá odpověď je nedostatečná, což se manifestuje snížením počtu makrofágů a T-lymfocytů (2).

**Obr. 3. Schématické znázornění časné zánětlivé reakce.** Bezprostředně po poranění dochází aktivací hemostatických mechanismů k iniciaci procesu srážení a vytvoření fibrinového koagula. Polymorfonukleární leukocyty (PMNL) vlivem chemoatraktivních působků cíleně migrují a adherují k obnaženému endotelu cévy a diapedézou vstupují do místa poranění. S určitým časovým zpožděním se do vytvořené primitivní matrix dostávají buňky monocytomakrofágové linie, které fagocytózou a tvorbou kyslíkových radikálů odstraňují z rány nežádoucí materiál. Spolu s PMNL představují významný zdroj proteolytických enzymů, kterými rozkládají proteiny extracelulární mezibuněčné hmoty, což je nezbytné pro další vývoj procesu hojení. Převzato a upraveno z publikace (18).



Vrcholná a tzv. pozdní zánětlivá fáze jsou typické migrací a hromaděním buněk ve vytvořené mezibuněčné hmotě neboli provizorní matrix. Regulace migrace je zprostředkována chemoatraktivními látkami endogenního i exogenního původu, které podle momentálních potřeb organismu zajistí cílenou kumulaci buněk v postiženém místě. Mezi nejvýznamnější zástupce chemokinů patří TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ , epidermální růstový faktor (EGF), PDGF a insulinu podobný růstový faktor (IGF-1) (22), dále fibroblastový růstový faktor (FGF-2) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), které působí na řadu elementů včetně fibroblastů, keratinocytů a endotelových buněk během celého procesu hojení (23). Experimentálními studiemi bylo potvrzeno, že tyto působky fungují jako spouštěče reparačního procesu (21).

Prvním typem buněk rekrutovaných do místa poranění (hodiny) jsou neutrofilní granulocyty (PMNL) (24). Za normálních okolností cirkulují v obvodové krvi jako neaktivní

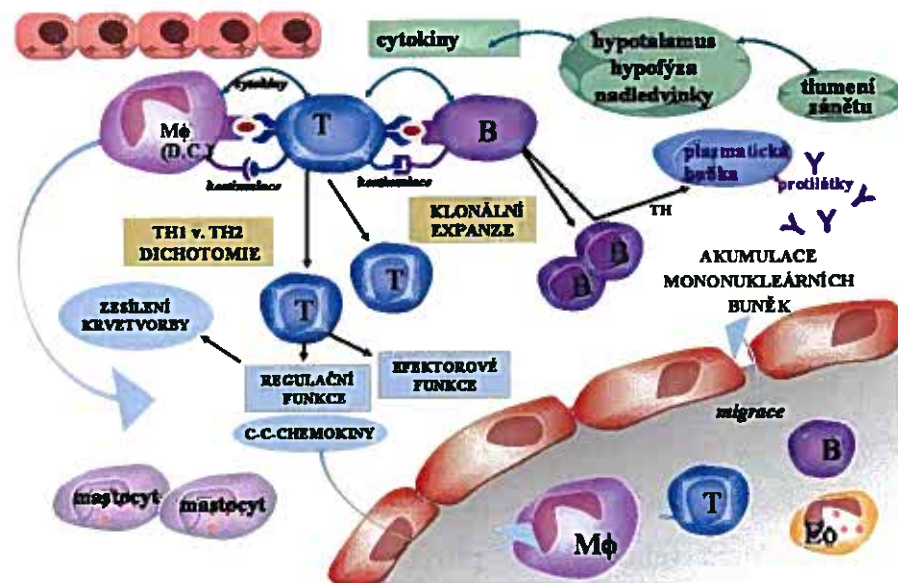
buňky. Vlivem chemoatraktantů z rozpadlých bakterií, degradačních produktů fibrinu, fibrinogenu a dalších složek ECM adherují k obnažené endotelové výstelce a diapedézou přestupují do místa poranění (17). Usměrněný pohyb je spojen také se zvýšenou expresí adhezních molekul na endoteliích a působením dalších chemoatraktantů, např. tumor nekrosis faktoru (TNF- $\alpha$ ), leukotrienů (LT) a interleukinů (IL-1) (2). PMNL jsou v ECM přítomny několik dnů, přičemž u infikované rány mohou setrvat i delší dobu, což přispívá ke zpomalení procesu hojení (17). Hlavní funkcí je fagocytóza buněčného odpadu (tvorbou aktivních forem kyslíku), cizích partikulí a bakterií (25). PMNL produkují proteolytické enzymy tzv. matrixové metaloproteinázy (MMPs) a aktivátory plazminogenu, které jsou nezbytné k degradaci ECM a její remodelaci (26). Jsou také bohatým zdrojem prozánětlivých cytokinů, jako je IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  a růstových faktorů (např. PDGF, VEGF) důležitých pro novotvorbu tkáně (11, 27).

Druhým typem buněk v ráně jsou monocyty, které se zde dostávají chemotaktickým působením cytokinů, např. monocytárního chemotaktického faktoru (MCP-1), makrofágového inflamatorního proteinu (MIP-1) a růstových faktorů (TGF- $\beta$ , IL-1, TNF- $\alpha$ ), které jsou uvolňovány z aktivovaných endotelových, epitelových a mezenchymálních buněk (28, 29, 30). Mezi specifické chemoatraktanty monocytů patří také degradační složky ECM. V tzv. pozdní zánětlivé fázi (48 až 72 hod) po poranění se působením růstových faktorů (PDGF, IL-2, TNF- $\alpha$ , interferon IFN- $\gamma$ ) transformují v makrofágy. Ty zde přetrvávají několik dnů až týdnů (2). V ostatních tkáních a orgánech jsou cíleně rozptýleny tak, aby poškozující podněty vedly bezprostředně k jejich aktivaci a rychlé migraci do postiženého místa. Vyznačují se mnoha funkcemi, které velmi snadno přizpůsobí aktuálnímu mikroprostředí (prezentace antigenů, zánětlivá odpověď, fagocytóza). Jsou považovány za nejdůležitější elementy regulace procesu hojení (17). Obsahují jedno až dvě jádra, která mohou splývat a vytvářet tzv. vícejaderné velké buňky (multinucleated giant cells) (31). Podle typu aktivace, klasická či alternativní cesta, se rozlišují dva typy makrofágů s odlišnými funkcemi (30). Působením opsonizujících částic, IFN- $\gamma$ , lipopolysacharidů, složky ECM dochází ke vzniku klasických makrofágů, které degradují ECM, především prostřednictvím MMPs (kolagenáza, metaloelastáza, gelatináza B, stromelyzin). Fagocytováním postiženého místa vytváří prostor pro tvorbu nového epitelu a pojivové tkáně (32). IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  působí aktivaci makrofágů tzv. alternativní cestou, které produkcí protizánětlivých působků stimulují angiogenezi a přispívají k syntéze ECM. Přítomnost obou těchto typů je tedy pro správný průběh hojení nezbytná. Makrofágy dále produkují růstové faktory (PDGF, FGF, VEGF,



TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ ) a podporují tvorbu granulační tkáně, migraci buněk a proliferaci fibroblastů (2). Nedostatek makrofágů se projevuje sníženou tvorbou debridementu, nedostatečnou proliferací fibroblastů či nepřiměřeným angiogenním procesem (25). Naopak jejich neadekvátní aktivaci dochází k rozvoji chronického zánětu (30). Tyto elementy jsou označovány za významné buňky zánětlivé a reparační fáze (25).

**Obr. 4. Schéma průběhu vrcholné zánětlivé fáze.** Tato fáze zánětu je velmi důležitá pro dokončení obrany organismu a vytvoření podmínek pro rozvoj imunologické paměti, která zajistí efektivní rozvoj obranné reakce v příštím setkání se škodlivou noxou. Převládá zde aktivita specifické imunity, kdy proliferací klonů B a T lymfocytů dochází ke klonální expanzi. Těmto buňkám jsou předkládány zpracované nebezpečné antigeny, což vede k tvorbě protilátek. Důležitou součástí těchto reakcí je obnova mezibuněčné hmoty a cévního zásobení, která je ovlivněna především cytokiny a adhezními interakcemi. Převzato a upraveno z publikace (18).



Pozdní vrcholná fáze zánětlivé reakce je charakteristická založením imunologické paměti, která se efektivně uplatní při dalším kontaktu se škodlivou noxou. Nezbytnou buněčnou populaci zde představují lymfocyty. Hlavními zástupci lymfocytů recirkulujících v krvi a tkáních jsou pomocné  $T_H$  ( $CD4^+$ ) a  $T_C$  cytotoxické ( $CD8^+$ ) buňky. K  $T_C$  lymfocytům jsou některými autory řazeny také tzv. supresorové  $T_S$  lymfocyty, které tlumí aktivitu ostatních populací. Majoritní subpopulace obou typů T lymfocytů (asi 95%) je vybavena receptory pro antigeny  $\alpha/\beta$  typu, minoritní subpopulace receptory typu  $\gamma/\delta$  hraje významnou úlohu v obraně kůže a sliznic, při které dochází k předkládání zpracovaných exogenních antigenních fragmentů prostřednictvím HLA molekul I. a II. třídy (33). Nedostatek obou

skupin lymfocytů se projevuje defekty v procesu hojení. Deplece  $CD4^+$  lymfocytů snižuje pevnost rány, zatímco nedostatek  $CD8^+$  lymfocytů naopak pevnost rány zvyšuje (2).

Dalším buněčným typem v procesu hojení jsou fibrocyty. Jedná se pravděpodobně o klidová stadia fibroblastů. Tvoří asi 10% buněk z celého zánětlivého infiltrátu a v procesu hojení přispívají produkcí kolagenu I., chemokinů jako je MIP-1 $\alpha$ , MIP- $\beta$ , MCP-1 a IL-8 i růstových faktorů. Jejich produkce je regulována pomocí IL-1 a TNF- $\alpha$  (2).

Eosinofilní granulocyty svým cytotoxickým potenciálem působí především proti extracelulárním parazitům a produkcí TGF- $\alpha$  podporují reepitelizaci rány. Důležitost těchto buněk v procesu hojení není dosud přesně prozkoumána (2).

Buněčná populace mastocytů se za normálních okolností nachází ve velkém množství na kožních a epitelových rozhraních. Podílí se na rozvoji časné zánětlivé odpovědi, kdy prostřednictvím humorálních prozánětlivých působků (histamin, LT, prostaglandiny a cytokiny) podporují koagulaci a cílený kumulaci leukocytů do místa poranění. Dále stimuluje proliferaci fibroblastů, endotelových buněk a keratinocytů. Produkci MMPs zasahují do procesu remodelace a tvorby jizvy (34).

V průběhu jednotlivých fází zánětlivé reakce se uplatňuje řada regulačních mediátorů (35). Např. kyselina arachidonová je prekurzorem tzv. fosfolipázového systému epitelových buněk, jenž jsou zdrojem zánětlivých mediátorů (prostaglandiny, tromboxany, LT, eikosanoidy) modulující aktivitu endotelových a hladkých svalových buněk. Nejvýznamnějším zástupcem je tzv. destičky aktivující faktor (PAF) syntetizovaný trombocyty, neutrofily, bazofily, eozinofily i makrofágy. Působí aktivaci zánětlivých buněk v místě poranění, vazodilataci a exudaci plazmy do extracelulárních prostorů (34). Dalším významným mediátorem regulace zánětlivé reakce je histamin. Vzniká z histidinu a je uskladněn v granulích mastocytů a bazofilů (36). Po vazbě na  $H_1$  receptory působí vazodilataci a podílí se na exudaci krevní plazmy. Zesiluje také expresi intracelulární adhezní molekuly (ICAM) na epitelových a endotelových buňkách a podporuje adhezi eosinofilních granulocytů a makrofágů. Serotonin působí vazodilatačně a podobně jako histamin je schopen zvýšit exudaci plazmy do extravazálních prostorů. Je uskladněn v granulích trombocytů (37).

Endoteliny představují skupinu strukturálně příbuzných vazoaktivních peptidů, označovaných jako ET-1, ET-2 a ET-3 a syntetizovaných především buňkami endotelu. Působí po vazbě na specifické endotelinové receptory (ETA a ETB). ETA je exprimován na fibroblastech a hladkých svalových buňkách, zatímco ETB je navíc exprimován na buňkách

endotelu a makrofázích (38). Nejvýznamnější zástupce ET-1 se podílí na extravazaci plazmy, proliferaci fibroblastů, produkci ECM a aktivaci zánětlivé reakce. Bylo zjištěno, že lidské keratinocyty, makrofágy a monocyty tyto peptidy produkují po stimulaci TNF- $\alpha$ , IL-1 či IL-6 (39). V místě poranění jsou dále uvolňovány vazoaktivní peptidy tzv. kalikrein-kininového systému. Vznikají z prekurzorových proteinů kininogenů enzymatickým působením kalikreinů. Spolu s hemokoagulačním systémem se uplatňují při řízení krevního průtoku (dilatace arterií, zvýšení permeability venul) a v regulaci zánětlivé odpovědi. Podporují např. diapedézu neutrofilů otevřením mezibuněčných spojů endotelových buněk a zvyšují syntézu TNF- $\alpha$  a IL-1 produkovaného makrofágy (40). Nejdůležitějším zástupcem je bradykinin a tzv. kalidin, které stimulují syntézu prozánětlivých cytokinů (IL-1 a IL-8).

### 3.2. Proliferační fáze

Proliferační fáze procesu hojení ran se vyznačuje několika stadii: formací permeabilní bariéry (granulační tkáň a procesem reepitelizace), novotvorbou cév (angiogenezi) a zpevněním nově vytvořené tkáň (fibroplazii) (17).

Změna primitivní matrix v granulační tkáň je zahájena tři až čtyři dny po poranění a kulminuje mezi sedmým až desátým dnem (11). Jedná se o přirozený děj probíhající již v embryonálním období (41). Vzniká prorůstáním endoteliálních provazců do ECM, jejich změnou v kapilární síť s následným anastomozováním. Tento proces je regulován proangiogenními faktory, mezi které patří FGF a VEGF (42). VEGF je klíčovým mediátorem při maturaci této tkáň a je produkovan keratinocyty (43). FGF se uplatňuje během prvních dnů novotvorby cév a je uvolňován porušenými endotelovými buňkami a makrofágy (44). Degradaci proteinů ECM MMPs vznikají fragmenty peptidů a působí chemotakticky na fibroblasty. V této fázi se také uplatňují buňky monocytomakrofágové linie, které uvolňují další proangiogenní stimuly. Stimulací endotelových buněk FGF faktorem je uvolněn aktivátor plazminogenu a prokolagenáza (2), vzniká plazmin, který spolu s kolagenázou (MMP-1) rozrušuje bazální laminu, což umožní aktivovaným endotelovým buňkám dále migrovat a zakládat nové cévy. Jestliže je rána zcela vyplněna novou granulační tkáň, proces angiogeneze ustává a dochází k apoptóze většiny buněk. Na jejich zániku se podílí řada složek ECM (např. trombospondin 1 a 2, angiostatin, angiopoetin) (2).

Granulační tkáň je také důležitým prostředím pro ukotvení vcestovalých buněk a také zásobárnou cytokinů, růstových faktorů (PDGF a TGF- $\beta$ ) a dalších molekul (fibrin, fibronektin, kyselina hyaluronová) (21).

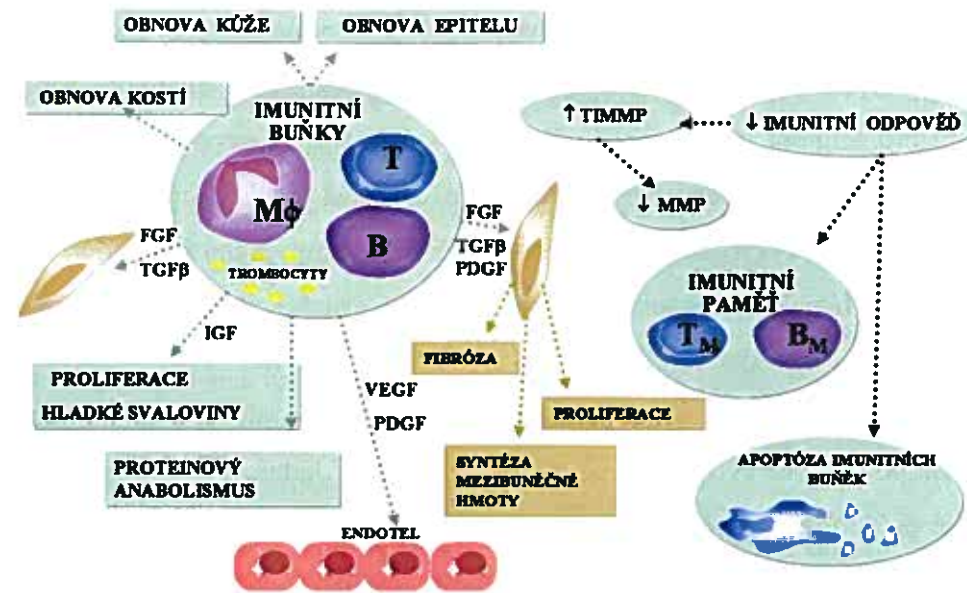
V hlubších vrstvách rány dochází k proliferaci fibroblastů především působením růstových faktorů makrofágů (TGF- $\beta$ ) (45). Fibroblasty jsou mladou vývojovou linií se značnou mitotickou aktivitou a schopností regenerace. Mají vřetenovitý tvar těla s vysokým obsahem aktinu a myozinu. Působením cytokinů syntetizují složky ECM a tyto naopak regulují expresi příslušných genů pro správnou funkci fibroblastů (21). Aktivované fibroblasty jsou zdrojem proteinů nezbytných pro remodelaci matrix (kolagenových vláken typu III. a I., aktinových vláken, desminu a vimentinu), které také slouží k ukotvení vcestovaných buněk (46). Stejně jako keratinocyty mají tyto elementy schopnost exprese integrinů pro migraci v ráně (např.  $\alpha 5 \beta 1$ ) (26), kde snižují expresi receptorů pro kolagen a naopak zvyšují expresi receptorů pro vazbu složek ECM. Za 4-5 dnů po poranění se vyznačují největší syntetickou aktivitou. Nasyntetizovaná kolagenní vlákna jsou orientována náhodně a až v pozdější fázi jsou organizována do pevných svazků. Proces fibroplazie vrcholí mezi sedmým až čtrnáctým dnem (26).

Reepitelizace rány začíná paralelně s procesem fibroplazie a angiogeneze nebo o něco dříve (tzn. po třech až čtyřech dnech po poranění) (26). Jedná se o proces obnovení celistvosti porušené epidermis migrací bazálních keratinocytů z obou intaktních konců rány (17). Pro obnovu poškozené epidermis je také důležitá určitá zásoba vlasových folikulů a žláz v blízkém okolí rány (2). Za normálních podmínek tvoří keratinocyty propojenou cytoskeletální síť a pomocí integrinů se váží k lamininu *laminy basalis* (21). Při migraci v ráně mění tvar, vytváří pseudopodia a aktinmyozinový aparát, stávají se zdrojem MMPs a rozrušují fibrinová vlákna aktivací plazminu (2). Keratinocyty proliferují za podpory růstových faktorů jako je EGF, TGF- $\alpha$ , heparin vázícího epidermálního růstového faktoru či růstového faktoru pro keratinocyty (KGF) (2). Tento proces stimulují také filamenta typu konexinů a keratinů, jejichž exprese je patrná již 2 až 3 hodiny po poranění (2). Na inhibici jejich proliferace se podílí TGF- $\beta$  (47).

Kolem sedmého až desátého dne po poranění je proces reepitelizace ukončen a keratinocyty se navrací k původnímu fenotypu. Experimentálními studii na zvířecích modelech bylo prokázáno, že rychlost reepitelizace závisí na zajištění dostatečné vlhkosti v mikroprostředí rány. Vyschnutí postiženého místa má za následek prohloubení rány a zpomalení hojícího procesu (21).



**Obr. 5. Přehled kooperace imunitních složek s ostatními tkáňovými systémy během procesu hojení.** Bezprostředně po narušení integrity kůže dochází k aktivaci koagulačního systému krve, trombocytů a k uvolnění cytokinů, které jsou nezbytnou součástí po celou dobu tkáňové reparace. Vlivem chemokinů se do místa poranění dostávají granulocyty a makrofágy, které zajišťují ochranu před invadujícími organismy. Později dochází k vytvoření granulační tkáně a dominující buněčnou populací se stávají migrující fibroblasty, které tvoří extracelulární matrix a tvorbou angiogenetických působků zajišťují novotvorbu cév. V pozdní fázi hojení se zvyšuje podíl lymfocytů, které zajišťují efektorové i regulační funkce. Převzato a upraveno z publikace (18).



### 3.3. Remodelace mezibuněčné hmoty

Největší komponentou dermis je ECM, skupina různorodých makromolekul (glykosaminoglykanů, glykoproteinů, fibrózních proteinů), buněčných elementů volných i fixních a cytokinů. V procesu hojení ran hraje důležitou úlohu jako informační systém, v němž buňky komunikují a vytvářejí chemické signály. Působí také v obraně proti invazi mikroorganismů z vnějšího prostředí, umožňuje přísun živin, elektrolytů, vody a odvod produktů metabolismu. Komponenty ECM mají rovněž vliv na buněčný fenotyp, a to prostřednictvím receptorů matrix (integriny). Zvláštní formou ECM je tenká vrstva tzv. *lamina basalis* oddělující populaci epitelových buněk od pojivové tkáně. Nachází se mezi epidermis a dermis a je složena z velkého množství lamininů a kolagenů (48).

Glykosaminoglykany (heparansulfát, dermatansulfát, keratansulfát) jsou dlouhé nevětvené polysacharidy s opakujícími se disacharidy s jedním ze dvou aminocukrů (N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin). Sulfátové a karboxylové skupiny cukerných zbytků poskytují silné negativní náboje, které váží osmoticky aktivní ionty ( $\text{Na}^+$ ) a vodu, což vede k bobtnání a tvorbě turgoru. Mezi nejvýznamnější patří chondroitinsulfát, dermatansulfát, keratansulfát a další. Kyselina hyaluronová (HA) je složena z opakujících se disacharidových

jednotek ( $\beta$ -D-glukuronová kyselina-(1-3)- $\beta$ -N-acetyl-D-glukosamin) spojených  $\beta$ -(1-4) glykosidickou vazbou. Účastní se řady fyziologických procesů již během embryonálního období (49). Obklopuje proliferující buňky a inhibuje adhezi buňky k buňce, čímž podporuje jejich migraci. Vyznačuje se vysokou afinitou k vodě, je odbourávána lysosomálními glykosidázami až na jednotky monomerů, tzn. glukózu a kyselinu glukuronovou. V současné době je díky hydratačním a elastickým vlastnostem velmi populární v různých formách v kosmetickém průmyslu, v léčbě kožních poranění a oční chirurgii (50,51).

Elastin, jehož základem je zesíťovaný tropoelastin, patří mezi fibrózní proteiny ECM. Elastická vlákna se vyznačují díky vysokému obsahu hydrofobních aminokyselin schopností opakovaného napínání a smršťování kůže. Jsou pokryta mikrofibrilami z různých glykoproteinů a vytváří tak další strukturní molekuly (např. fibrilin či fibronectin), účastníci se adheze, migrace a průniku buněk do místa postižení (48).

Kolagen je hlavním nerozpustným proteinem ECM. V kůži a při hojení rány se uplatňuje především typ I. a III. Po desátém dnu po poranění jsou syntetizována kolagenní vlákna typu I., která vytváří svazky mezi sebou a ostatními proteiny. Jejich produkce je regulována serinovými proteinázami (koagulační faktory a proteinázy obsažené v granulích leukocytů) a MMPs. Velmi významný je urokinázový aktivátor plazminogenu (uPA), který s membránovým receptorem (uPAR) a specifickými inhibitory (PAI) sehraje klíčovou úlohu v rozkladu a remodelaci složek ECM. Hlavním substrátem uPA je plazminogen, který se přeměnou v serinovou proteázu (plazmin) účastní fibrinolýzy a degradace ECM. Biologické účinky proteináz jsou tlumeny v plazmě  $\alpha_2$ -makroglobulinem a tzv. serpiny. Mezi serpiny patří např. C1-inhibitor,  $\alpha_1$ -antichymotrypsin, antitrombin,  $\alpha_1$ -antitrypsin a inhibitor aktivátoru plazminogenu. MMPs jsou velkou skupinou strukturně podobných latentních enzymů, které jsou aktivovány nejčastěji až na buněčném povrchu. Mezi nejvýznamnější zástupce uplatňující se v hojení ran patří MMP-10 (stromelysin-2), MMP-1 (intersticiální kolagenáza) uvolňovaná bazálními keratinocyty, která štěpí nativní kolageny a kolagen typu I. a III. a usnadňuje tak migraci buněk. MMP-9 (gelatináza) štěpí kolageny *laminy basalis* (IV.). Pro správný průběh kvalitního hojení je důležitá rovnováha mezi MMPs a tkáňovými inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMPs) (52).

Proteoglykany jsou velmi heterogenní složkou ECM a jsou složeny z cetrálního vysokomolekulárního proteinu na který je vázán glykosaminoglykan. Tyto hydrofilní složky bobtnají, agregují do supramolekulových útvarů a vyplňují prostory mezi buňkami a kolagenními vlákny. Mezi hlavní zástupce patří biglykan, dekorin a fibromodulin. Většina z nich nese negativní náboj, kterým se váží na další molekuly ECM či adhezivní molekuly (48).



### 3.4. Maturační fáze a tvorba jizvy

Maturační fáze procesu hojení se klinicky manifestuje kontrakcí rány a zvýšením pevnosti okolní tkáně (2). Celý proces je závislý na kontinuální syntéze a přiměřené degradaci kolagenu a může trvat několik měsíců až let (53). Hlavními mediátory kontrakce rány jsou myofibroblasty, které mají schopnost smrštění a prodloužení (17). Vznikají již během formace granulační tkáně z fibroblastů působením PDGF a TGF- $\beta$ . Obsahují svazky aktinových filament a syntetizují silná kontraktilní vlákna (21). Degradace kolagenu je regulována MMPs a TIMPs (52), jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole. Maximální syntéza kolagenních vláken fibroblasty nastává kolem tří týdnů po poranění a je regulována cytokiny (např. INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) (17). Na regulaci kontrakce rány se podílí také nervový růstový faktor (NGF), který stimuluje myofibroblasty k produkci  $\alpha$ -aktinu (54). Naopak IL-8 tento proces inhibuje, což vysvětluje prodloužení hojícího procesu u ran s nepřiměřenou zánětlivou fází (55).

Během tří týdnů dosahují rány asi 20% pevnosti důsledkem rychlé kumulace nově syntetizovaného kolagenu, který je již uspořádán ve funkční pevné přičně pospojované svazky. Za šest týdnů dosahuje postižené místo v pevnosti kolem 80 až 90%. Tenzní napětí zhojené rány se zvyšuje až do jednoho roku od vzniku poškození (2). V tomto časovém rozmezí již převládá odbourávání kolagenu, které je řízeno růstovými faktory (TGF- $\beta$ , PDGF, IL-1 a Cyr61 na cystein bohatý angiogenní induktor). Populace fibroblastů a myofibroblastů podléhá apoptóze, za vzniku jizvy. Jizva představuje relativně avaskulární a acelulární masu kolagenu, která slouží k obnovení tkáňové integrity, síly a funkce (1).

### 4. Regulace procesu hojení

Cytokiny zahrnují variabilní skupinu solubilních proteinů a peptidů a jako účinné regulátory se uplatňují již během embryogeneze a organogeneze. Účastní se mnoha fyziologických dějů zahrnujících buněčný růst a diferenciaci, hematopoézu, hojení ran či obnovu tkání. Jejich důležitou úlohou je modulace funkční aktivity jednotlivých buněk a tkání za fyziologických i patofyziologických podmínek. Umožňují přenos signálů a podílí se tak na komunikaci buněk s okolním prostředím (17). Téměř všichni zástupci vykazují několikeré biologické aktivity (pleiotropní účinky), přičemž se často ve svých aktivitách překrývají (35).

Mezi cytokiny se řadí skupiny látek označovaných jako růstové faktory, kolonie stimulující faktory (CSF), IL, lymfokiny, monokiny, chemokiny a INF (44). V klinické medicíně jsou hojně využívány a aplikovány v léčbě řady imunitních, především prozánětlivých onemocnění. Míra jejich produkce imunitními buňkami je závislá především na antigenním stimulu, který ji vyvolal (35).

Cytokiny jsou buňkami produkovány klasickými sekrečními cestami ve formě volné nebo častěji vázané na membrány. Rovnováha mezi solubilními a membránovými formami je sama o sobě regulujícím faktorem. Většina nebývá skladována v buňkách, vyjma TGF- $\beta$  a PDGF (v granulích trombocytů). Jejich produkce je konstitutivní nebo častěji ovlivnitelná s regulací na úrovni genové exprese podle okamžité potřeby organismu či konkrétní tkáně (26). Vazbou na specifický membránový receptor cílové buňky nenavozují odpověď přímo, ale stimuluje nebo inhibuje produkci specifických DNA vázaných proteinů, které kontrolují expresi dalších genů. Cytokiny působí přes receptory, což jsou transmembránové proteiny nebo proteinové komplexy, jejichž extracelulární části jsou obvykle multidoménové a složené z tzv. modulů. Podle přítomnosti určitých domén jsou pak receptory dále tříděny do skupin (rodina I-V tzv. receptor family), nejčastěji na základě homologní struktury extracelulárních domén. Extracelulární domény jsou zodpovědné za vazbu cytokinů a cytoplazmatické části odpovídají za iniciaci intracelulárního působení. Některé receptory jsou z membrány odštěpeny, cirkulují v plazmě a slouží k vyvázání a inhibici volných cytokinů. Většina receptorů pro cytokiny na membráně předá buňce po navázání ligandu signál prostřednictvím tyrozinkinázové aktivity cytoplazmatické domény a poté dochází k internalizaci a degradaci receptoru i s navázaným cytokinem. Tento proces souvisí s regulací počtu receptorů na buňce (down regulace), přičemž počet a zastoupení receptorů s vysokou či naopak nízkou afinitou je jedním ze zásadních parametrů určujících citlivost buňky k danému faktoru (35). Komplexní vzájemně provázaný účinek cytokinů v organismu je označován jako tzv. cytokinní síť (18).

V procesu hojení ran se cytokiny podílí téměř na všech fázích. Ovlivňují např. aktivaci a migraci buněk do postiženého místa, stimulaci syntézy proteinů nezbytných pro tvorbu ECM přispívají k rozvoji procesu reparace (56). Některé cytokiny, např. IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF hrají klíčovou roli v iniciaci akutní zánětlivé reakce (35).

Pro studium akutního hojení rány na modelu potkana laboratorního jsme zvolili zástupce ze skupiny růstových faktorů a cytokinů, které považujeme za důležité v rámci procesu epidermální a dermální regenerace, konkrétně TNFR1, TGF $\beta$  RII a CCR2.

#### 4.1. Transformující růstový faktor $\beta$ (TGF- $\beta$ )

TGF- $\beta$  patří do tzv. rodiny transformujících růstových faktorů (TGF $\beta$ s superfamily), ke které se dále řadí aktiviny a morfogenetické proteiny. Jde o multifunkční peptidy regulující růst a diferenciaci buněk již během embryonálního období (57, 58). U savců existují tři strukturně podobné izoformy: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 a TGF- $\beta$ 3. Tyto izoformy jsou sekretovány z buněk jako velké či malé latentní komplexy, přičemž nejstudovanější izoformou je TGF- $\beta$ 1. Malé komplexy se skládají z aktivní TGF- $\beta$  formy a tzv. prodomény LAP (latency associated protein) proteinu. Velké komplexy obsahují aktivní TGF- $\beta$  jednotku, LAP a tzv. LTBP (latent TGF- $\beta$  binding protein) neboli protein o vysoké molekulární hmotnosti. LTBP proteiny hrají hlavní funkci v navázání TGF- $\beta$  na ECM. Komplex pro- a peptidu je uvolňován z buňky a skladován v ECM před enzymatickou aktivací. Extracelulární disociací vzniká biologicky aktivní TGF- $\beta$  forma, tzn. homodimer (25 kDa) spojený disulfidickým můstkem. Každá buňka těla včetně endotelových buněk, monocytů a makrofágů produkuje TGF- $\beta$  a má pro něj receptor (47). Buněčné odpovědi vyvolané TGF- $\beta$  jsou velmi různorodé a někdy i částečně protikladné. Tento nesoulad je dán rozličnými okolnostmi, např. druhem buňky, fází buněčného cyklu, typem receptorů atd. (59).

Autokrinní a parakrinní účinky tohoto faktoru jsou přenášeny cestou povrchových receptorů. Existuje několik detailně popsanych receptorů pro TGF- $\beta$ , z nichž nejdůležitější je RI, RII a RIII. Typ RI a RII jsou transmembránové proteiny s cytoplazmatickou serin/threonin kinázovou doménou. TGF- $\beta$  vazbou na receptory působí jejich aktivaci a ty posléze aktivují cytoplazmatickou doménu. Fosforylovaný receptor typu I. tím získává kinázovou aktivitu a přenáší signál vzniklý vazbou TGF- $\beta$  do nitra buňky tak, že fosforyluje a tedy aktivuje členy tzv. Smad rodiny intracelulárních proteinů. Tato početná skupina proteinů se dělí na tři třídy (fosforylované Smad, ko-Smad a tzv. inhibiční Smad). Fosforylované Smad jsou přímo fosforylovány aktivním receptorem typu I., ko-Smad nereagují přímo s receptorem, ale jsou

důležité pro signalizaci a tzv. inhibiční Smad inhibují TGF- $\beta$  signalizaci. Finálním krokem signalizační kaskády je translokace aktivních komplexů Smad do jádra, kde modulují expresi příslušných genů, většinou ve spolupráci s různými koaktivátory a ko-represory. Všechny kroky tvorby, aktivace a signalizace TGF- $\beta$  jsou regulovány, což mimo jiné vysvětluje rozmanité efekty TGF- $\beta$  jako jediné molekuly v různých tkáních.

V procesu hojení se TGF- $\beta$  podílí na rozvoji zánětlivé odpovědi, tvorbě granulační tkáně a procesu angiogeneze (60). Ihned po poranění tkáně je ve velkém množství uvolňován z  $\alpha$  granulí trombocytů, což působí chemotakticky na další buňky, zejména fibroblasty a monocyty, které jsou do rány přitahovány (57). Je také klíčovým regulátorem remodelace ECM, kdy působí především stimulaci syntézy proteinů této hmoty prostřednictvím fibroblastů (61). V experimentální studii na potkaním modelu byla po lokální aplikaci TGF- $\beta$  do rány potvrzena zvýšená produkce kolagenu i zvýšení počtu fibroblastů (62). Expres TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2 byla v procesu hojení imunohistochemicky prokázána ve všech vrstvách epidermis i dermis s největší intenzitou v lamině basalis (45), keratinocytech a cévách regenerované epidermis (57, 63). TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 2 jsou zodpovědné za proces tvorby jizvy, TGF- $\beta$ 3 naopak tento proces potlačuje (58).

TGF- $\beta$  je také regulátorem buněčného cyklu mnoha buněčných typů. U většiny buněk působí jako inhibitor cyklu dělení (buňky epitelové, endotelové a hematopoetické) a zastavuje jej v G1 fázi. Mezi další účinky TGF- $\beta$  patří indukce apoptózy, modulace imunitních a zánětlivých dějů (imunosupresivní efekt). Například fenotyp myši, které nemají nebo mají nefunkční gen pro TGF- $\beta$ 1 umírá *in utero* vlivem rozsáhlého zánětu, který je po podání TGF- $\beta$ 1 zvrácen (59).

#### 4.2. Tumor nekrosis faktor (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  (17kDa) patří mezi nejvýznamnější cytokiny přirozené imunity a poprvé byl identifikován v séru zvířat po lokální aplikaci bakteriálního endotoxinu. Jedná se o pleiotropní cytokin (35), který je považován za důležitý prozánětlivý mediátor akutní zánětlivé fáze (64). Existuje ve dvou izoformách s obdobnými účinky, označovaných jako TNF- $\alpha$  neboli kachektin a TNF- $\beta$  (18). TNF- $\beta$  nazývaný jako lymfotoxin je produkován převážně T lymfocyty (65). V procesu hojení je TNF- $\alpha$  buňkami produkován jako transmembránový polypeptidový prekurzor tvořený 236 aminokyselinami o molekulové hmotnosti 26 kDa. Za katalytického působení TNF- $\alpha$  konvertujícího enzymu je z N-koncové části polypeptidu odštěpeno 79 aminokyselin. Dojde k uvolnění TNF- $\alpha$  z vazby na buněčnou membránu do



podoby solubilního homotrimeru o molekulové hmotnosti 17,4 kDa. Induktory produkce TNF- $\alpha$  jsou antigeny nebo mitogeny, IL-3 (pro žírné buňky), vlastní TNF- $\alpha$ , GM-CSF, leukotrien B<sub>4</sub>, faktor aktivující destičky, INF- $\gamma$  ve spojení s lipopolysacharidy (pro mikrořagy). Hlavním zdrojem jsou monocyty, makrořagy, fibroblasty, T i B lymfocyty, epiteliální buňky, Langerhansovy buňky a mastocyty (66).

Efekt TNF- $\alpha$  na cílové buňky je zprostředkován vazbou na specifické receptory pro TNF (TNFR). Byly identifikovány dva typy vysokoafinních receptorů typu TNFR1 a TNFR2, které se liší molekulární hmotností (55 a 75 kDa). Vyskytují se na povrchu buněčných membrán téměř všech buněčných typů, v různém počtu od 1000 do 10 000 na buňku. Tyto receptory patří do tzv. TNF rodiny, kam se řadí také FAS (apoptózu signalizující molekula) a CD40 molekuly. TNFR jsou transmembránové glykoproteiny tvořené třemi doménami: extracelulární doménou bohatou na cystein zodpovědnou za vazbu ligandu, transmembránovou doménou a intracelulární doménou. Oba typy TNFR existují kromě membránově vázané formy rovněž ve formě volné, která představuje solubilní variantu extracelulární domény receptoru (35). Solubilní formy receptorů si ponechávají schopnost vázat TNF- $\alpha$  a mohou tak sloužit jako přirozený inhibitor TNF- $\alpha$  zabráněním jeho vazby na membránově vázaný TNFR.

V procesu hojení se TNF- $\alpha$  aktivuje oxidační procesy neutrofilů, což vede k jejich degranulaci. Je chemotaktický pro monocyty a spolu s IL-1 může zvyšovat kapacitu produkce dalších mediátorů zánětu (např. IL-6, IL-8) (35). Podporuje proliferaci keratinocytů a fibroblastů, a tím přispívá k formaci složek ECM. Stimuluje monocyty k produkci IL-1, který se vyznačuje podobnými účinky jako tento faktor. TNF- $\alpha$  je komitogenní pro thymocyty, indukuje expresi receptorů pro IL-2, zvyšuje spolu s IL-1 proliferaci B lymfocytů a produkci protilátek. Experimentální zvířecí studie potvrzují klíčovou úlohu TNF klíčovou úlohu v etiologii řady zánětlivých (zejména kožních) a také autoimunitních onemocnění (65).

### 4.3. Monocytární chemotaktický protein (MCP-1)

Skupina chemokinů zahrnuje několik druhů chemoatraktivních látek, které svým působením ovlivňují především migraci leukocytárních populací. Dělí se na podskupinu tzv. CXC chemokinů, kam patří např. IL-8, který ovlivňuje infiltraci neutrofilních granulocytů do postiženého místa a tzv. CC chemokinů, kam patří např. po předchozí stimulaci aktivované T lymfocyty exprimující a sekretující (RANTES) a monocytární chemotaktický protein 1 (MCP-1), které působí chemoatraktivně především na monocyty/makrořagy a T lymfocyty a

dále také na NK buňky, basofily či dendritické buňky. MCP-1 bývá někdy označován také jako CCL-2 chemokin (67). Sktruktura CC chemokinů je tvořena ze čtyř cysteinových zbytků, z nichž vždy dva jsou spojené k sobě. MCP-1 je v kožní tkáni produkovan lymfocyty, monocyty/makrořagy a endotelovými buňkami po předchozí stimulaci prozánětlivými stimuly (např. IL-1, TNF- $\alpha$ , bakteriální lipopolysacharidy) (68). Dalším významným zdrojem jsou keratinocyty a také fibroblasty (67). MCP-1 je důležitým regulačním faktorem časné zánětlivé fáze (69), působí chemoatraktivně na monocyty a stimuluje jejich přechod z krve do postižené tkáně. Existuje tzv. rodina transmembránových receptorů pro chemokiny spřažených s G proteiny, které se dělí na typy CCR a CXCR. Tyto receptory jsou přítomny na povrchu mnoha typů zánětlivých buněk, včetně buněk endotelu (70). MCP-1 působí prostřednictvím CCR2 receptoru, který existuje ve dvou izoformách A a B (44). CCR2 receptory jsou transmembránové proteiny. Jsou složeny z extracelulární amino-terminální domény a cytoplazmatické karboxy-terminální domény. Po vazbe MCP-1 na CCR2 receptor dochází k indukci uvolnění histaminu, influxu Ca<sup>2+</sup> iontů a dále se také MCP-1 podílí na regulaci exprese integrinů. Aktivita MCP-1 proteinu byla studována in vivo na zvířecích modelech (potkan, králík, pes), kdy výsledky studií potvrdily signifikantní zvýšení infiltrace monocytů v místech intradermální aplikace (69).



## 5. Využití zvířecích experimentálních modelů v procesu hojení ran

Vzhledem k platným etickým aspektům nelze ihned studovat přípravek potenciálně podporující proces hojení přímo na lidech, ale je nutné využívat zvířecích modelů, které jsou pro studium těchto mechanismů nejbližší. V tomto kontextu je podstatným úkolem najít takový model, ve kterém se mechanismus navozených procesů co nejvíce shoduje se situací u člověka a má navíc další výhody, především jeho snadná dostupnost, manipulace, homogenita apod. Průběh procesu hojení ran u člověka je v mnoha aspektech velmi specifický, co se týče imunitní odpovědi, fyziologie a popřípadě ovlivnění přidruženými vnitřními i vnějšími faktory. Neexistuje zatím žádný ideální zvířecí model, který by splňoval všechna kritéria, proto se pro specifické studie procesu hojení využívají různé živočišné druhy, např. laboratorní potkan, prase domácí či laboratorní myš. Tyto v experimentálních studiích zavedené druhy se snaží modelovat možné situace vyskytující se při hojení a jsou důležitým nástrojem pro zavedení vhodné léčebné strategie v klinické praxi. V této kapitole je krátce pojednáno o dvou nejvyužívanějších a námi preferovaných zvířecích modelech, laboratorním potkanovi a praseti domácím. Použití modelu laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) je výhodné z hlediska snadné dostupnosti, přiměřené velikosti, finanční nenáročnosti a relativně podobné stavby kožní struktury v porovnání s člověkem. Nevýhodou je přítomnost tkáně zvané *panniculus carnosus*, která spontánně vykazuje kontrakci rány, podporuje tvorbu kolagenu a přispívá a urychluje tak hojení kožního defektu (71).

Model velkého laboratorního zvířete, prasete domácího (*Sus scrofa domestica*) je vhodný pro studium procesu hojení především z důvodu značné anatomicko-funkční podobnosti kožního systému v porovnání se stavbou kůže člověka (72, 73). Výhody tohoto modelu zahrnují obdobný časový průběh jednotlivých fází procesu hojení, včetně doby obnovení epidermální vrstvy (30 dnů) a kinetiky epidermální proliferace (14 dnů). Stejně jako člověk nemá prase vyvinutou kožní strukturu *panniculus carnosus*, která samovolně přispívá kontrakci k urychlení hojení rány (74). Proces reepitelizace u prasete probíhá převážně migrací epidermálních buněk z obou okrajů rány (75). Epidermis je bohatá na zastoupení Langerhansových buněk a je složena ze čtyř vrstev jako u člověka, chybí zde pouze *stratum lucidum*. Celkově se složení a obsah lipidů i proteinů blíží lidskému. Dermis tvoří *stratum reticulare* a *papillare*, které jsou od sebe nezřetelně ohraničeny a vzájemně se prolínají. Podkožní tuková vrstva nabývá tloušťky 12mm s obdobným obsahem tukových buněk v porovnání s lidským jedincem. V kůži prasete nejsou zastoupeny ekrinní žlázy, apokrinní žlázy přiléhají k chlupovým folikulům a na rozdíl od člověka jsou umístěny po celém povrchu

těla. Prase domácí je také jediným savcem s podobným řídkým ochlupením (72). Mezi nevýhody tohoto modelu patří vysoké náklady a náročnější koordinace experimentů, spojená s obtížnější manipulací se zvířaty a v neposlední řadě přesné dodržování standardních procesů v metodice studií (76). Tento model je využíván např. k podrobné histologické analýze průběhu jednotlivých fází procesu hojení za různých patologických podmínek (diabetické rány, hluboká kožní poranění, kontaminované incize, popáleniny apod.). Při hodnocení kožních defektů se sleduje zastoupení buněčných populací, míra reepitelizace a regenerace epidermis, přítomnost zánětlivé reakce, velikost granulační tkáně, angiogeneze, fibroplazie, biodegradace aplikovaného materiálu atd. (76, 73).

Dle způsobu provedení rány se tyto zavedené modely kožního hojení dělí na tzv. excize či incize. U excizí je odstraněna podstatná část tkáně, která musí být nahrazena tkání novou. Na tomto modelu lze zachytit všechny fáze hojení a je vhodný zejména pro studium biochemických a histologických parametrů. Naopak incize jsou vytvořeny ostrým táhlým řezem, který má za následek rychlé otevření rány s minimálním poškozením okolní tkáně. Tento typ rány je charakteristický rychlou extravazací plazmy, vcestováním krevních buněk, vytvořením krevního koagula s tvorbou fibrinové zátky a přemostěním a uzavřením okrajů rány (74).

V současné době již existuje řada fungujících zvířecích modelů, které simulují různé typy ran (s rannou infekcí, nekrózou, tvorbou ulcerací a další), jejichž použití se cíleně volí dle studované fáze hojení (např. epitelizace, angiogeneze, zánětlivá reakce, tvorba ECM) (77).

## 6. Současný pohled na léčbu kožních poranění

Cílem léčby kožních poranění je v co nejkratším čase dosáhnout funkční reparace poškozené tkáně nebo v některých případech pouze její regenerace (např. u lehkých poranění typu odřenin). Ošetření a léčba rány jsou komplexním procesem. Nejdříve se hodnotí aktuální stav poranění (nekrotizující, suchá, infikovaná, secernující rána atd.), fáze hojení a podle toho se volí vhodný typ krytí. Vyžaduje-li to zdravotní stav pacienta je nutno také dodat nutriční výživu (vitamíny či stopové prvky) (21, 71). V praxi je možné použít lékové formy (masti, roztoky, gely, pasty, atd.), které obsahují farmakologicky účinnou látku, a to v kombinaci s krycím materiálem (např. gázové čtverce, obinadla). Tento konvenční dlouhá léta používaný přístup hojení na bázi „suché terapie“, se stává již zastaralým, především z důvodu nutnosti častého převazování ran, což je spojeno s traumatizací pacienta a menší úspěšností léčby. Dnes preferovaný tzv. moderní přístup hojení rány spočívá ve využití nových poznatků o patofyziologii hojení a současném použití nových technologií a metod.

Cílem moderní léčby na bázi vlhké terapie, která je na trhu zastoupena velkým množstvím obvazových materiálů je použití krytí s vhodnými vlastnostmi. Příznivou vlastností těchto materiálů při správné aplikaci, je schopnost modulace terapeutického procesu zejména zásahem do buněčných aktivit. Tzn. schopných udržet v ráně vlhké prostředí, vytvořit optimální pH, bránit infekci, eliminovat prozánětlivé faktory (např. volné kyslíkové radikály, proteinázy či cytokiny) a konečně i zvýšit lokální koncentraci růstových působků (78). V současné době existuje několik skupin těchto materiálů, např. hydrogely, aktivní uhlí, algináty, hydrokoloidy, polymery či polyuretanové pěny, které jsou indikovány na konkrétní typ rány či fázi hojení. V kombinaci s terapeuticky účinnými látkami (např. stříbro, jód) vykazují také baktericidní či bakteriostatické účinky, což umožňuje ponechat krytí na ráně i několik dní. tento postup ošetřování je charakteristický jednoduchým použitím a šetrností vůči pacientovi. Je také nealergizující, bezpečný a navíc relativně ekonomicky nenáročný v případě hodnocení celého průběhu léčby. Představuje tedy velmi účinný způsob ošetřování, který zároveň zkracuje dobu terapie (79).

V klinické praxi se dostávají do popředí hydrofilní materiály jako je karboxycelulóza (hydrokoloidy) či jiné polysacharidy (algináty) a to buď samostatně nebo v kombinaci např. s kolagenem (80, 81). Moderními technologiemi mohou být zpracovány do různých variant textilní formy, které jsou při aplikaci na ránu schopné zabránit následné infekci. Navíc je známo, že absorbují sekret z rány a podporují tak migraci a proliferaci keratinocytů, tvorbu ECM, endotelií a přispívají k obnovení porušené rovnováhy mezi reparačními a degradačními

procesy v ráně, a tím hojící proces příznivě ovlivňují (56). U některých přípravků je nevýhodou nízká degradabilita a ukládání ve tkáních a buňkách monocytomakrofágového systému (82).

Rány hojící se *per primam intentionem* obvykle nevyžadují žádnou zvláštní péči. Naopak rány hojící se *per secundam intentionem* představují pro pacienta větší zátěž, a proto je nutno zvážit použití krytí dle konkrétního typu (dekubity, vředy, otevřené chirurgické rány, vředy, lacerace apod.) (71).

V současné době se používají lokální léčivé přípravky s farmakologicky účinnou látkou (např. antibiotika, dezinficiencia) zejména za účelem potlačení infekčních komplikací v průběhu hojení (83, 84). Rozvojem moderních přístupů nanobiotechnologie byl započat nový trend výroby tzv. biodegradabilních nosičů, které svými vlastnostmi a funkcemi nabízejí zcela nové možnosti krycích materiálů (53). Jako nosiče terapeutických látek lze použít např. hydrofilní ko/polymery (např. metakryláty), liposomální struktury, koloidní roztoky vitamínů, minerálů, potravinových doplňků i léčiv (antibiotika a další). Tyto materiály mají řadu dalších výhod např. postupně účinnou látku uvolňovat do okolí, eliminovat vliv působení fyziologicky vznikajících volných kyslíkových radikálů v ráně atd. (78).

Lokální použití růstových faktorů a cytokinů nepředstavuje z klinického hlediska v hojení ran příliš velký benefit (85). Nevýhodou je rychlá degradace a nutné podání několika faktorů současně pro dosažení žádaného efektu. Nicméně lokální aplikací těchto přípravků lze ovlivnit konkrétní fázi hojení, což se využívá na experimentálních zvířecích modelech ke studiu poranění různé etiologie. Navíc je možné je aplikovat např. pro stimulaci angiogeneze (např. PDGF), tvorbu granulační tkáně či podpoření procesu reepitelizace (86, 79).

### 6.1. Mikrodispergovaná oxidovaná celulóza MDOC™

Mikrodispergovaná oxidovaná celulóza (MDOC™) je patentem irské firmy Alltracel (Patent Alltracel Pharmaceuticals, I.Santar et al GB2335921) a od roku 1998 se v medicíně používá jako biokompatibilní resorbovatelné hemostatikum. Tento nový přípravek je hypoalergenní a nevyvolává negativní imunitní reakce organismu, a to ani po opakovaných aplikacích. Jedná se o zcela biodegradabilní materiál s nízkou toxicitou (87, 4).

Celulóza neboli 1, 4 - (D-glukan) je základním strukturním polysacharidem buněčných stěn vyšších rostlin, který se dále vyskytuje v houbách a zelených řasách. Čistou celulózu představují vlákna z bavlníku, tzv. technická forma se získává ze dřeva. Její vlákna jsou pevná a nerozpustná, což je způsobeno přítomností četných vodíkových můstků v této



makromolekule (80, 88). Surová oxidovaná celulóza (OC) připravená procesem selektivní oxidace primární hydroxylové skupiny na pozici C6 s následně provedenou hydrolyzou umožňuje vznik vysoce čisté formy, označované jako MDOC™ (4). Jedná se o kopolymer složený z opakujících se jednotek polyanhydroglukuronové kyseliny (PAGA) a polyanhydroglukózy. Kyselina glukuronová je organismu vlastní látkou a její syntéza probíhá v játrech z glykogenu (80). Chemickou strukturou se podobá polysacharidům ECM, jako jsou glykosaminoglykany (např. heparin, kyselina hyaluronová či chondroitinsulfát) (48). OC, na rozdíl od svého prekursoru celulózy, která je odbouratelná pouze celulázami, je za fyziologických podmínek poměrně snadno hydrolyzovatelná enzymy ( $\beta$ -glukuronidáza a zřejmě také hyaluronidáza). Úplnou oxidací celulózy vzniká oxid uhličitý a voda. Její vlastnosti jsou určovány vznikajícími stabilními intramolekulárními a intermolekulárními vodíkovými vazbami. Tyto vazby pocházejí z četných hydroxylových (OH) skupin připadajících na jednotku celulózy. Celulóza se nerozpouští ve vodě ani v běžných organických rozpouštědlech, je rozpustná např. v roztocích mědi ( $\text{Cu}^{2+}$ ) s amoniakem nebo aminy. V roztoku tvoří makromolekulární agregáty (88).

Výrobní proces MDOC™ zahrnuje komplexní zpracování (hydrolyzu, frakcionaci) a čištění za účelem získání soli PAGA (nejčastěji  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) v mikrodispergované formě s velkým specifickým povrchem. Tato forma je charakteristická také homogenní velikostí částic (85% <math>30\mu\text{m}</math>, z toho 40% je <math>5\mu\text{m}</math>). Zbytek reziduí glukózy je konvertován na glukuronát, zatímco některé hydroxymetylenové skupiny ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) anhydroglukózy jsou oxidovány peroxidem vodíku za vzniku karboxylových skupin ( $\text{COOH}$ ), které pak tvoří podjednotky anhydroglukuronové kyseliny za vzniku kopolymeru anhydroglukózy a anhydroglukuronové kyseliny. Vysoká čistota a stabilita této substance je výsledkem dokonalého odstranění zbytkových produktů oxidačního procesu a destabilizujících skupin, převedením na stabilní primární a sekundární skupiny OH a sjednocením polymeračního stupně (87). Nekyselý charakter produktu je způsoben neutralizací  $\text{COO}^-$  skupin ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Na}^+$  v požadovaném poměru (4).

Experimentálními studiemi bylo potvrzeno, že deriváty MDOC™, konkrétně  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  sůl PAGA podporují rozvoj imunitní odpovědi organismu: *in vivo* studie provedená na myších potvrdila nárůst tvorby kolonie stimulujících jednotek (CFU) ve slezině o více než 50% po intraperitoneální aplikaci MDOC™. Dalšími *in vivo* studiemi na myším modelu byla po intraperitoneální aplikaci  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  soli MDOC™ potvrzena také proliferace monocytů a B-lymfocytů v periferní krvi (4). *In vitro* studiemi na buněčných kulturách myších splenocytů a lidských periferních leukocytů byla po přidání  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  soli MDOC™ (1mg/ml) pozorována

stimulace spontánní proliferace; použitím cytokinových assayů byla také zjištěna zvýšená produkce TNF- $\alpha$  (4). Nachtigal et al. ve studii na apo-E deficientních myších prokázal v dávce 50mg/kg/den mírný protizánětlivý a hypolipidemický účinek po krátkodobém podávání MDOC™ v dietě (6). Mechanismus účinku MDOC™ a její vliv na aktivaci procesu krevního srážení není dosud zcela objasněn, nicméně Křížová et al. (89) ve svých studiích potvrdila nepřímý efekt MDOC™ v aktivaci trombocytů za přítomnosti faktoru XII. a dále fakt, že MDOC™ svým negativně nabitým povrchem poskytuje prostředí pro vazbu koagulačních faktorů, což primárně působí aktivaci vnitřní cesty procesu krevního srážení a podporuje formaci trombinu (89, 90).

## 7. Cíle předkládané disertační práce

Pro lepší přehlednost byla předkládaná disertační práce rozdělena na část zabývající se testováním efektu lokálně aplikovaného přípravku MDOC™ u experimentálně navozeného akutního zánětu kůže na modelu laboratorního potkana a prasete domácího a dále na studium vlivu perorálně podávaného přípravku MDOC™ na hladiny lipidů a aterogenezi u myšního modelu aterosklerózy.

Konkrétními cíli bylo:

1. Posoudit vliv přípravku mikrodispergované oxidované celulózy (MDOC™ resp. Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> PAGA) v procesu akutního hojení kožních poranění na modelu laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) pomocí světelné mikroskopie.
2. Porovnat účinnost jednotlivých forem MDOC™ (prášek, sprej, gel a textilie).
3. Sledovat případnou změnu exprese vybraných prozánětlivých markerů a zhodnotit dynamiku hojení v jednotlivých fázích s využitím imunohistochemických metod.
4. Vytvořit model tržně zhmožděné kožní rány na velkém laboratorním zvířeti (*Sus scrofa domestica*), pomocí světelné mikroskopie identifikovat kvalitativní a kvantitativní změny v jednotlivých fázích procesu hojení po lokální aplikaci PAGA v kombinaci s gentamicinem a dále ověřit účinnost PAGA u ranných infekcí vyvolaných bakteriálními kmeny (*St. aureus*, *Ps. aeruginosa* a *E. coli*).
5. Studovat potenciální hypolipidemické účinky MDOC™ u apoE-deficientních myší sledováním parametrů lipidového spektra v krvi a sledováním velikosti aterosklerotických plátů a exprese buněčné adhezni molekuly VCAM-1 v těchto lézích pomocí imunohistochemických a stereologických metod.
6. Zjistit možný mechanismus hypolipidemického působení MDOC™ a posoudit, zda může být tato substance řazena do skupiny tzv. rozpustné vlákniny.

## 8. Materiál a metodika

Experimenty byly provedeny na samcích laboratorního potkana (*Rattus norvegicus* var. *alba*) kmene Wistar (chovná stanice Velaz s. r. o., Únětice). Zvířata byla po celou dobu studie chována ve viváriu FaF UK za standardních podmínek s volným přístupem k vodě i krmivu (Velas a.s., Lysá nad Labem). Denně byl monitorován zdravotní stav, chování, spotřeba krmiva a pitné vody. Chov a zacházení s pokusnými zvířaty byly v souladu s pravidly schválenými Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání FaF UK.

### 8.1. Experimentální navození akutní zánětlivé reakce

Experimentální navození akutního zánětlivého procesu bylo provedeno na potkanech o hmotnosti 200-250g v den experimentu. Všechna zvířata byla operována v celkové anestézii za podmínek relativní asepsy intraperitoneální aplikací Ketaminu (Narkamon, 5%, Spofa, Česká republika), (30-50 mg na zvíře). Skupina dospělých samců potkanů zahrnovala celkem 30 zvířat, která byla po týdenní aklimatizaci náhodně rozdělena do pěti skupin po šesti. Kontrolní skupina (KO), sprej MDOC™ (A), mikrokrystalický prášek MDOC™ (B), gel MDOC™ (C), textilie MDOC™ (D), (Tab. 1.).

Šíje zvířete byla zbavena chlupů a očištěna od nežádoucích nečistot a chirurgickými nůžkami byl vytvořen standardní centrální kruhový defekt (o průměru 1,5 cm) zasahující na úroveň fascie svaloviny. Do ran byl aplikován přípravek MDOC™ resp. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> PAGA v jedné dávce (překrývající ránu), a to v různých formách (prášek, sprej, textilie, gel). Vyjma formy ve spreji, která byla pro dostatečný efekt aplikována třemi nástříky. Kožní defekt byl poté překryt sterilním krytím a na okrajích přichycen suturou. Z důvodu sejmutí krytí zvířetem byly rány nakonec ponechány volně. Kožní poranění u kontrolní skupiny byly ošetřeny pouze fyziologickým roztokem. Zvířata byla umístěna zpět do samostatných čistých boxů.



Tab. 1 Identifikace testovaných přípravků MDOC™

Název testovaného přípravku MDOC™	Složení	Lot No.	Expirace
MDOC™ prášek	Ca <sup>2+</sup> /Na <sup>+</sup> sůl 1,4 β-D-polyanhydroglukuronové kyseliny	2079	10-2009
MDOC™ gel	m.doc™ Poloxamer 405	KG 4A3	06-2007
MDOC™ spray (Blood Stop Haemostat)	m.doc™ Methylal Isopropanol LPG Aerosol	V05026	08-2008
MDOC™ textilie	m.doc™ PVA PES textilie	180506	05-2011
Kontrola	fyziologický roztok	-	-

## 8.2. Makroskopická a histologická analýza

Třetí, sedmý a čtrnáctý den po operaci byla provedena euthanasie zvířat předávkováním celkového inhalačního anestetika (Aether pro narcosi, Synthesia, Pardubice-Semtín) s následným přerušením míchy a zaznamenána hmotnost (váhy Scaltec, Sartorius AG, Goettingen, Německo). Okolí rány bylo oholeno a s přesností na milimetry byla změřena délka rány, popř. jizvy a zhotovena fotografie (Canon Inc, Malaysia). Standardní vzorek kožní tkáně, tzn. spodina rány s oběma intaktními okraji o velikosti přibližně 1,5 cm, byl ihned odebrán do fixačního roztoku (Bouinův roztok nebo 4% paraformaldehyd po dobu 48-72 hodin). Vzorky byly odvodněny acetonem (3x během 16 hodin), projasněny xylenem (2 x 15 minut) a po prosycení parafínem (56°C, 2x během dvou hodin) zality do bločků. Pro histologická barvení byly krájeny série podélných řezů o tloušťce 5-6 μm na diskovém mikrotomu Leica DSC1 (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Německo). Ve výše uvedeném intervalu odběru bylo provedeno makroskopické hodnocení ran, tzn. monitoring spodiny rány, charakter krusty, okrajů rány a velikost jizvy. Klasickou světelnou mikroskopií pomocí základního barvení (hematoxylin&eosin a zelený Massonův trichrom) hodnoceny další parametry, tzn. zastoupení a lokalizace buněk, rozsah reepitelizace, charakter granulační

tkáně, množství kolagenních vláken či novotvorba cév. Vše bylo vždy paralelně porovnáno s kontrolní skupinou a literárními údaji o fyziologickém průběhu akutního hojení.

## 8.3. Imunohistochemická analýza

Na diskovém mikrotomu Leica DSC1 (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Německo) byla pro imunohistochemickou analýzu krájena série podélných řezů (o tloušťce 5-6 μm) kožní tkáně ošetřené MDOC™ ve formě mikrokrystalického prášku a tkáně bez aplikace studovaného přípravku (kontrolní skupina). U všech experimentů bylo využito tzv. nepřímé imunohistochemické metody, při které byla na tkáňové řezy aplikována primární protilátka, která specificky rozeznala prokazovaný antigen. Sekundární protilátka značená enzymem (v našich podmínkách) se poté imunologickou vazbou navázala na protilátku primární. Specifické barvení bylo zviditelněno přidáním tzv. enzym-specifického substrátu. Ke studiu procesu hojení byli zvoleni zástupci ze skupiny chemokinů a růstových faktorů resp. jejich receptory, konkrétně TNF RI, TGF-β RII a CCR2. Expres byla hodnocena v zánětlivém buněčném infiltrátu, fibroblastech, epidermálních a endotelových buňkách ve třetím, sedmém a čtrnáctém dnu po poranění. Pro imunohistochemická barvení byla zvolena metoda EnVision. Ke značení antigenů byly použity následující chemikálie a protilátky v příslušných ředěních.

Eukitt (R), montovací médium (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo).

Rabbit Anti-Rat CCR2 (ab32383) (Abcam, Cambridge, Velká Británie), zředění 1:250.

Rabbit Anti-Rat TNF RI (ab19139) (Abcam, Cambridge, Velká Británie), zředění 1:100.

Mouse Anti-Rat TGF-β RII (L-21): sc-400 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), zředění 1:100.

DAB (diaminobenzidin-substrát pro peroxidázu) chromogen-3,3 diaminobenzidin, substrát-chromogen roztok (Dako, Carpenteria, USA), DAB v poměru 20 μl/ml pufru (pufr je součástí kitu).

Citrátový pufr (pH = 6,0), Kyselina citronová monohydrát (0,99 g), Citronan sodný (6,43 g), Destilovaná voda (ad 500,0 ml).

Goat sérum (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). Rat sérum (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). Goat anti-rabbit sekundární protilátka + 2% potkaní sérum. Goat anti-mouse sekundární protilátka + 2% potkaní sérum. Sekundární protilátka EnVision™, ready to use (DakoCytomation, Carpenteria, USA). BSA bovine serum albumin (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo).

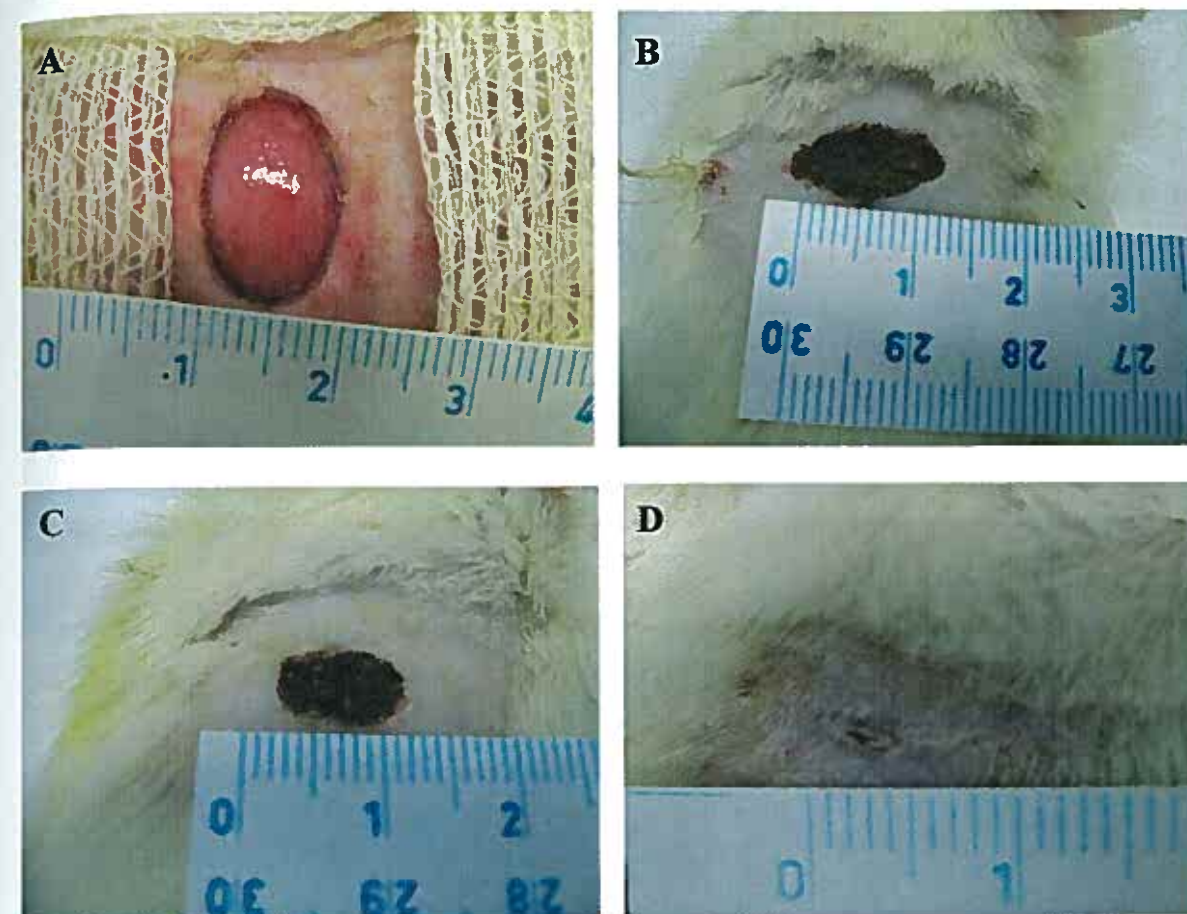
PBS (fosforečnanový pufr) - Chlorid sodný (80,0g), Chlorid draselný (2,0g), Hydrogenfosforečnan draselný (2,0g), Dihydrogenfosforečnan sodný (11,5g), Destilovaná voda (ad 1000,0 ml), pH = 6,8. Tento roztok se dále ředí 1:10 redestilovanou vodou, pH výsledného roztoku je 7,43 ± 0,01.

## 9. Výsledky makroskopické analýzy

Niže uvedená fotografická dokumentace ošetřených povrchových kožních poranění přípravkem MDOC™ poukázala na kompletní zhojení u všech aplikovaných forem. Nicméně makroskopickou analýzou ošetřených ran nebyly viditelné žádné rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou zvířat. Reprezentativní fotografie MDOC™ skupin a kontrolní skupiny jsou uvedeny níže.

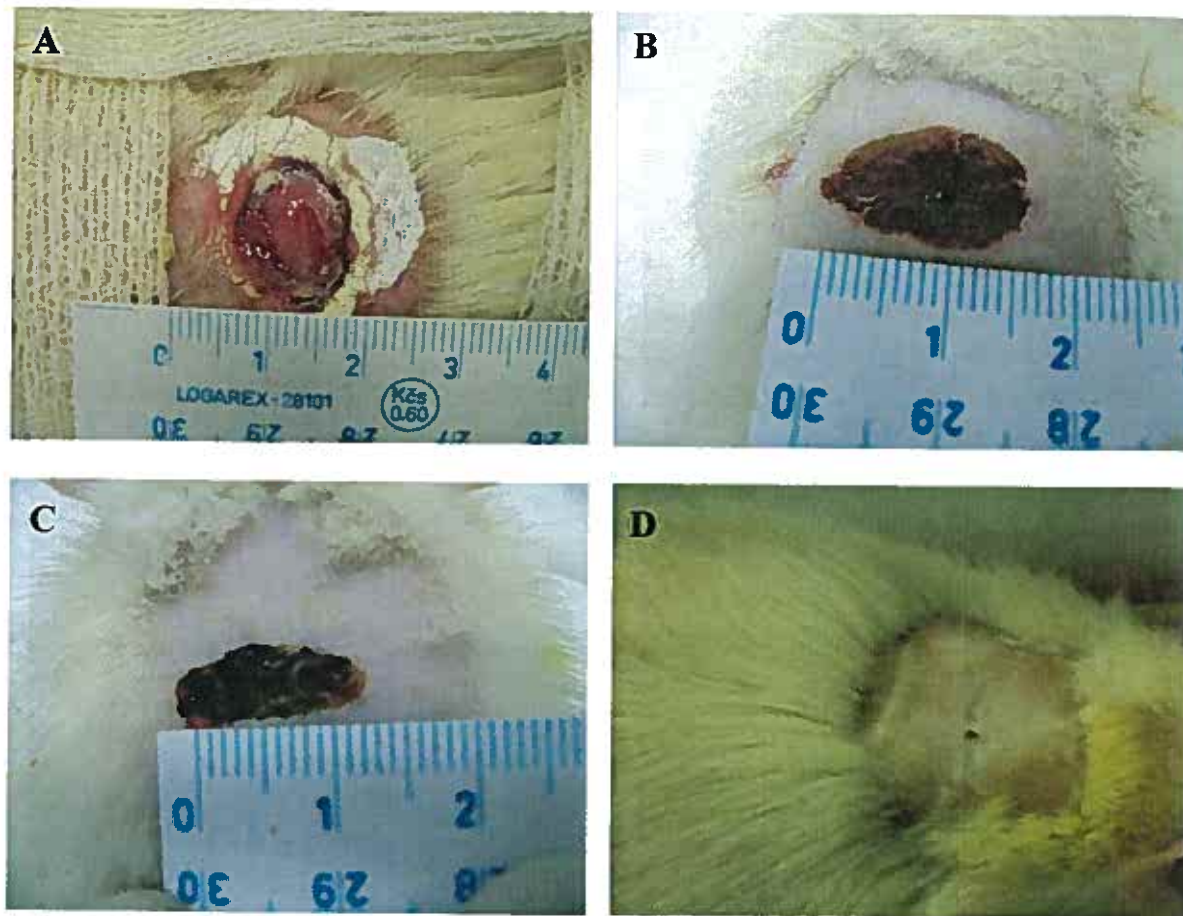
Již v úvodu experimentů se bezprostředně po poranění v nuchální oblasti uplatnil hemostatický efekt všech forem MDOC™. Tato pozorování byla mírně odlišná u přípravku MDOC™ ve spreji, kdy bylo nutno opakovat trojnásobný nástřik (Obr. 7A). Ve zvolených intervalech sledování jsme opakovaně zjišťovali postupné kontrahování kožních poranění, které probíhalo ve všech skupinách obdobně a vyústilo v kompletní vyhojení kruhového defektu do čárovité jizvy. Mírná obměna byla pozorována po aplikaci práškové formy (Obr. 8B, C) a gelu (Obr. 9B, C) MDOC™, kde bylo úplné uzavření defektu a odloučení krusty časově prodlouženo v porovnání s kontrolní skupinou, což ale nemělo vliv na vytvoření jizvy. Při sledování tvorby krusty (fibrinové koagulum) kryjící ránu byly u jednotlivých studovaných forem MDOC™ zjištěny mírné rozdíly. U skupiny zvířat s aplikovaným sprejem byla viditelná tenká v prvních třech dnech hemoragická krusta (Obr. 7B, C), postupně docházelo k jejímu zaschnutí a po čtrnácti dnech k odloučení. Nejvyšší hemoragická zátka byla zaznamenána u práškové formy MDOC™ (Obr. 8B), nicméně i ta se při kontrahování rány postupně odlučovala. Krusta po aplikaci gelu a textilie MDOC™ byla ve třetím dnu se zvlněným povrchem a nerovnými okraji a přetrvávala i během sedmého dne po poranění (Obr. 9B, C). Nakonec také došlo k jejímu odloučení bez významných histologických změn. U některých zvířat však textilie odpadla již třetí den po poranění (Obr. 10B), což bylo zohledněno v celkovém hodnocení. Kontrolní kožní rány vykazovaly převážně suchý tenký kryt, který byl postupně odloučen a zhojen ve čtrnáctém dnu do jizvy (Obr. 6B, C, D).

Obr. 6 Kontrolní skupina zvířat bez aplikace přípravku MDOC™. Vytvoření kruhové kožní rány v den operace (A). Krusta pokrývající povrch rány třetí den po poranění (B). Rána v sedmém dnu po poranění (C). Vytvoření jizvy ve čtrnáctém dnu po poranění (D).

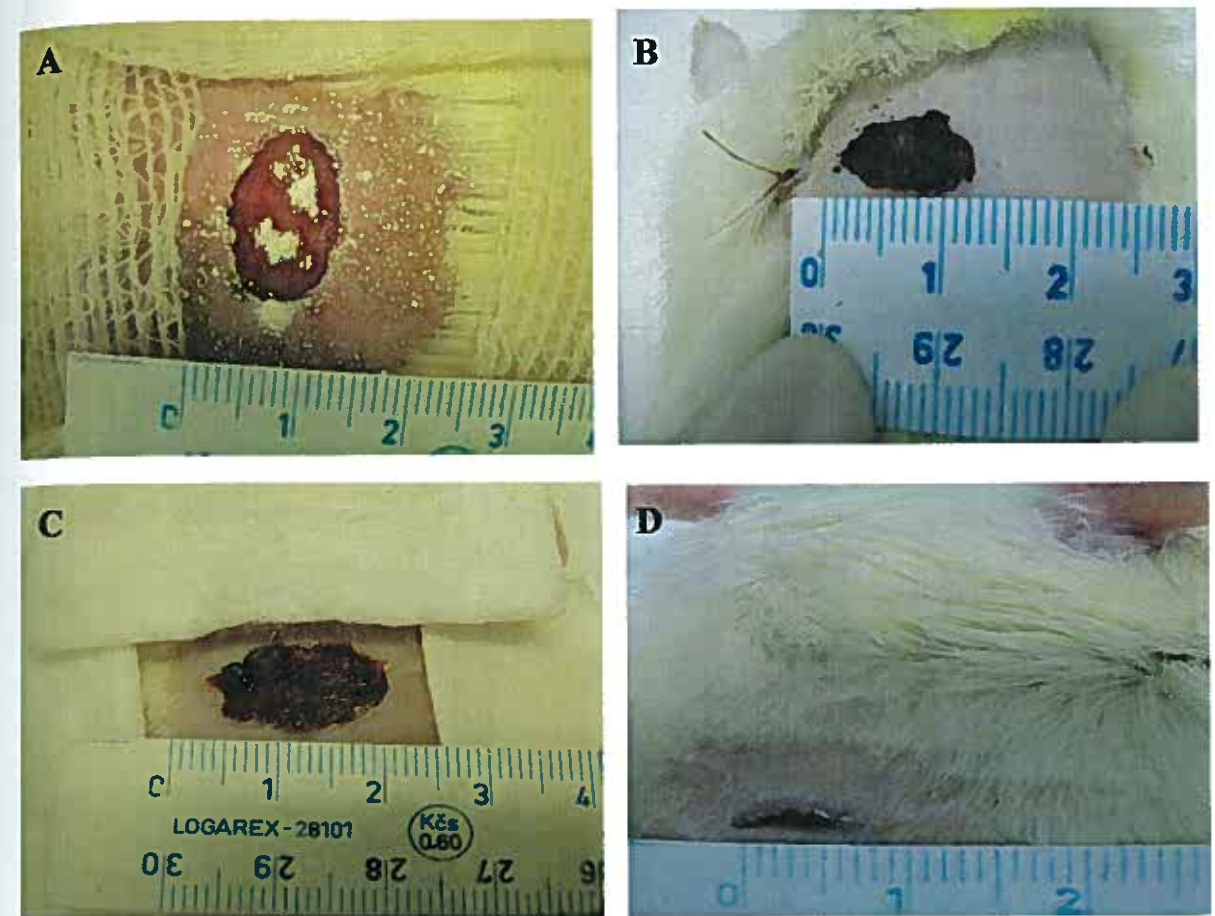




**Obr. 7** Experimentální skupina zvířat, aplikace MDOCT<sup>TM</sup> ve formě spreje. Aplikace MDOCT<sup>TM</sup> v den operace (A). Krusta s hladkým povrchem ve třetím dnu po poranění (B). Přetrvávající hemoragická krusta v sedmém dnu po poranění (C). Vytvoření jizvy ve čtrnáctém dnu po poranění (D).

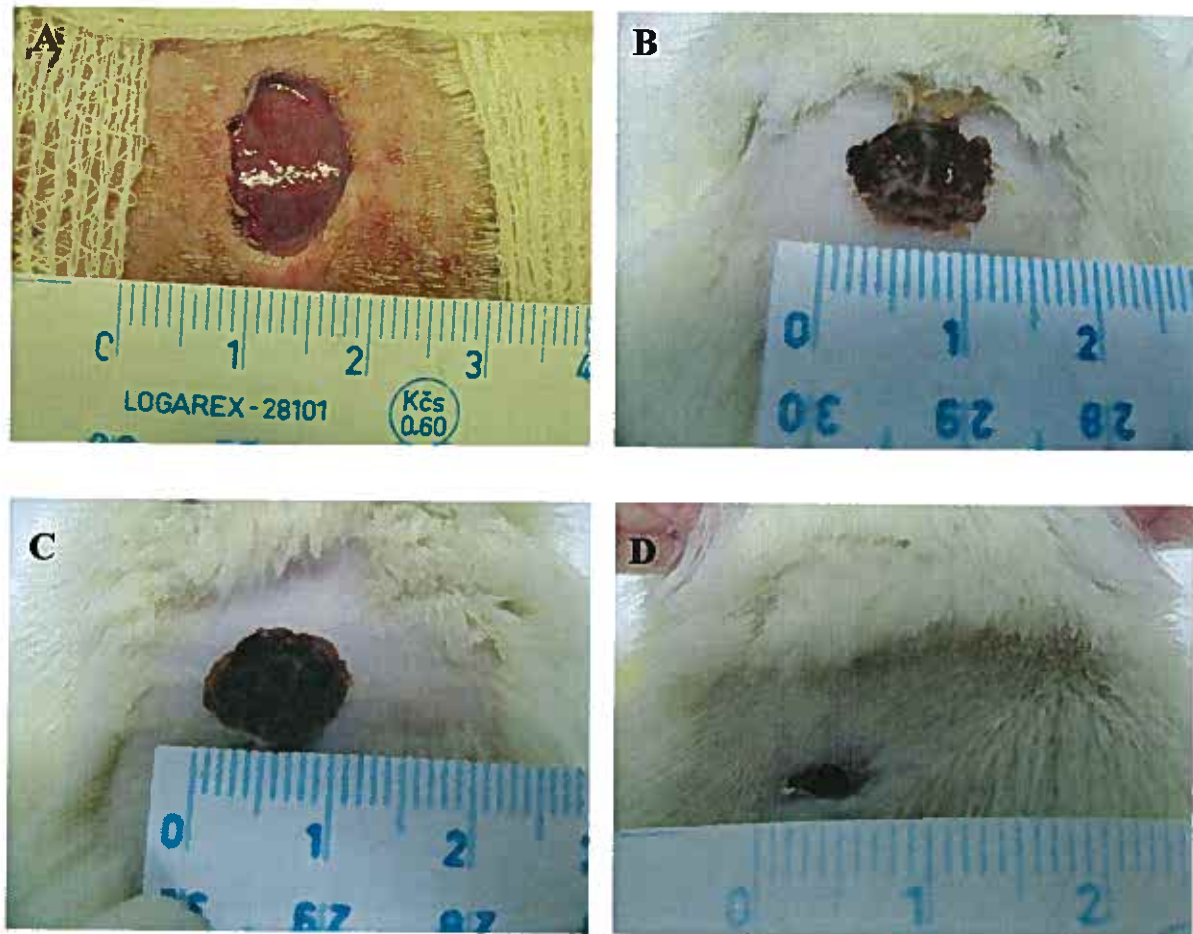


**Obr. 8** Experimentální skupina zvířat, aplikace MDOCT<sup>TM</sup> ve formě biodegradabilního prášku. Vytvoření kožní excize a aplikace MDOCT<sup>TM</sup> (A) v den operace. Hemoragická krusta ve třetím dnu po poranění (B). Krusta v sedmém dnu po poranění (C). Vytvoření jizvy ve čtrnáctém dnu po poranění (D).

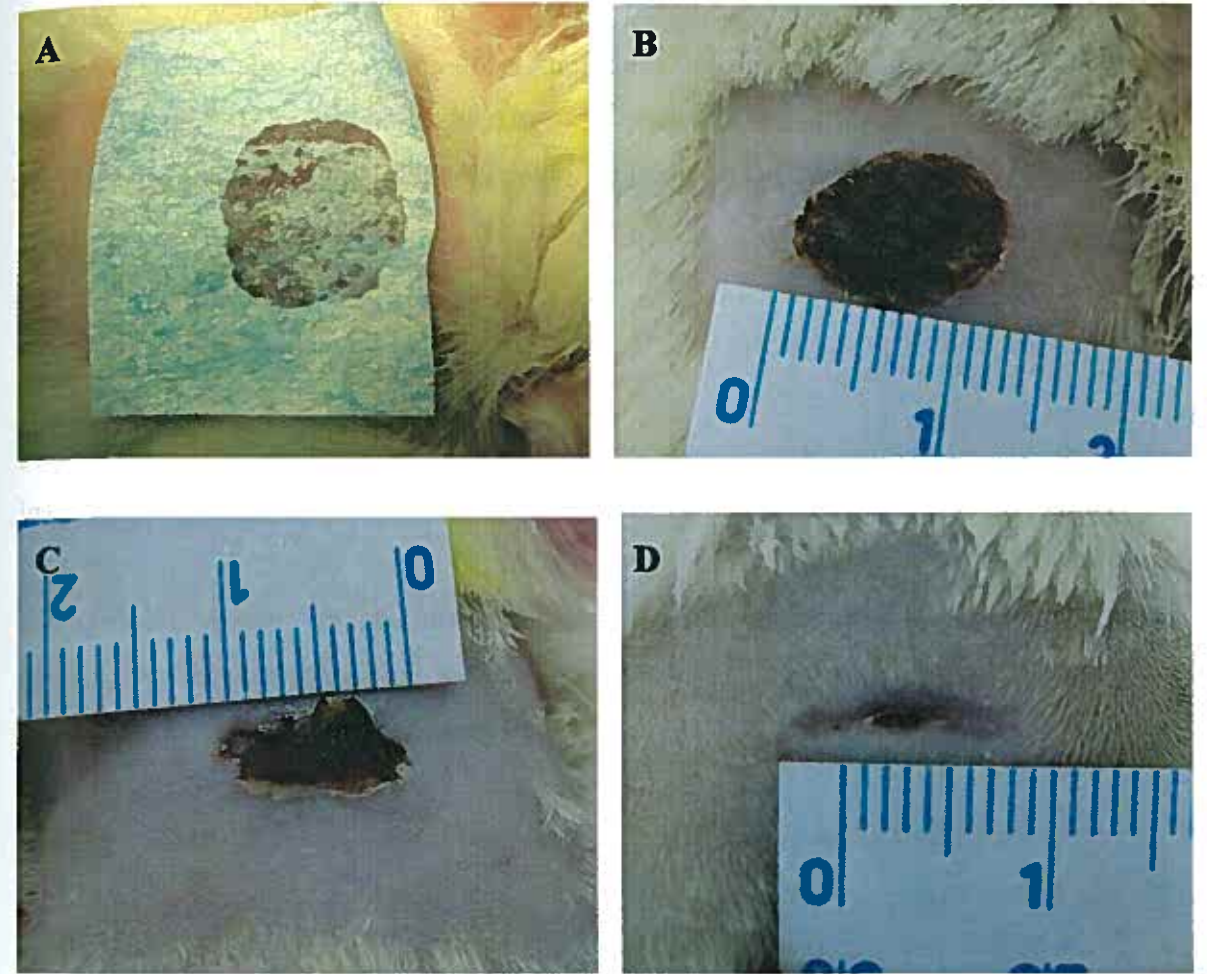




**Obr. 9** Experimentální skupina zvířat, aplikace MDOCT<sup>™</sup> ve formě gelu. Vytvoření kožního defektu v den operace aplikace MDOCT<sup>™</sup> (A). Krusta se zvlněným povrchem (B) ve třetím dnu po poranění. Přetrvávající krusta v sedmém dnu po poranění (C). Kožní rána ve čtrnáctém dnu po poranění (D).



**Obr. 10** Experimentální skupina zvířat, aplikace MDOCT<sup>™</sup> ve formě textilie. Rána s aplikovanou MDOCT<sup>™</sup> ve formě textilie v den operace (A). Vytvoření krusty ve třetím dnu po poranění (B). Rána v sedmém dnu po poranění (C). Vytvoření jizvy ve čtrnáctém dnu po poranění (D).





## 10. Výsledky histologické analýzy

Histologická analýza kožních poranění ošetřených přípravkem MDOC™ ve formě spreje, prášku, gelu a textilie neprokázala žádné rozdíly v průběhu jednotlivých fází procesu akutního hojení v porovnání s kontrolní skupinou. Z tohoto důvodu zde uvádíme pouze vybrané reprezentativní histologické obrázky.

Ve třetím dnu po poranění byl povrch kožní rány u MDOC™ i kontrolní skupiny krytý fibrinovým koagulem. Při spodní hranici krusty a dále v dermis byla zachycena probíhající zánětlivá buněčná reakce (kulatobuněčný infiltrát), tzn. přítomnost neutrofilních granulocytů, lymfocytů, monocytů příp. makrofágů. Dále byla v dermis u obou skupin zjištěna tvorba granulační tkáně s fibroblasty a nově se tvořícími cévami.

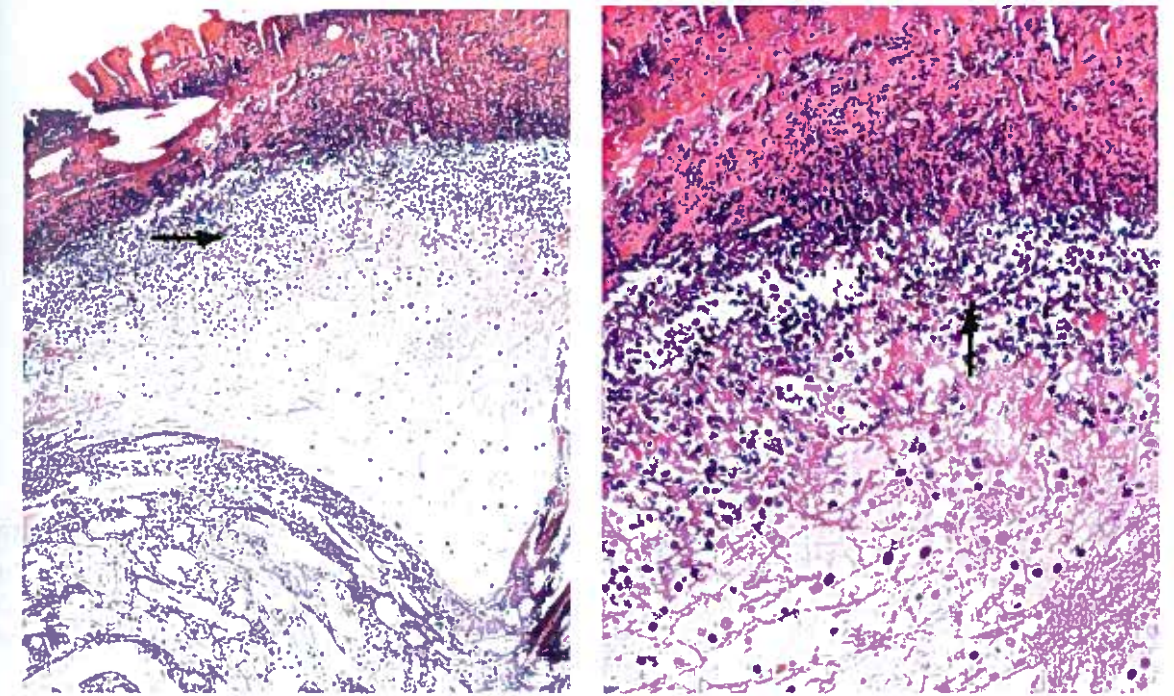
V sedmém dnu po poranění byla u kontrolní i MDOC™ skupiny zvířat viditelná zčásti regenerovaná epidermis. Nejvyšší epidermální kryt defektu včetně vysokého zastoupení epidermálních buněk byl patrný u práškové formy MDOC™. Střed kožních incizí vyplňovala ECM s fibroblasty a kolagenními vlákny. U kontrolní skupiny byly v dermis viditelné také četné hyperemické cévy. Doznívající zánětlivá reakce a zbytky granulační tkáně byly pozorovány ve větší míře u ošetřených poranění, včetně velkého množství makrofágů zvláště u MDOC™ ve formě textilie.

Ve čtrnáctém dnu po poranění byla u kontrolní i MDOC™ skupiny zvířat viditelná kompletní regenerace epidermis. U MDOC™ skupin přetrvávala v prostředí nově vytvořené ECM stále buněčná reakce a velké množství fibroblastů. U kontrolní skupiny zvířat byl viditelný vysoký obsah kolagenních vláken a naopak menší zastoupení fibroblastů. Celý proces hojení byl kompletní a srovnatelný s fyziologickým průběhem.

Obrazová příloha k mikroskopickému hodnocení hojení akutního procesu kožních poranění ve třetím, sedmém a čtrnáctém dnu po poranění. Histologický obraz kožní tkáně byl u jednotlivých forem MDOC™ ve sledovaných intervalech velmi podobný, z tohoto důvodu zde uvádíme vybrané reprezentativní obrázky:

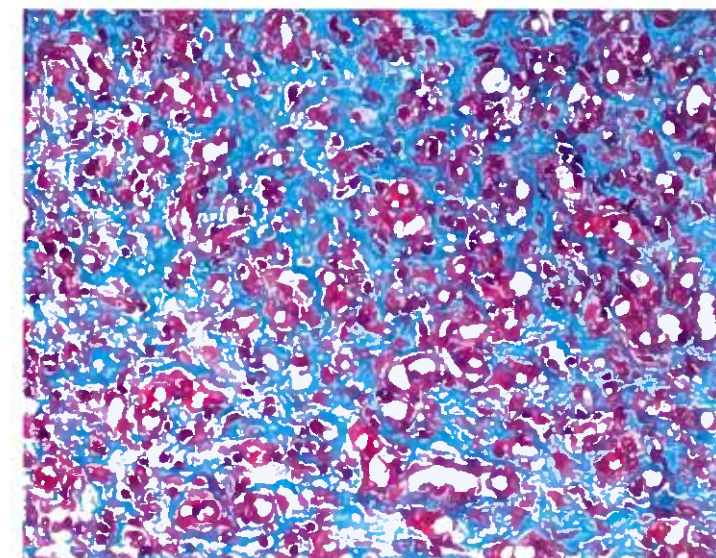
**Obr. 11** Kožní rána ve třetím dnu po poranění, aplikace MDOC™ ve formě mikrokrystalického prášku.

Povrch rány je krytý hemoragickou krustou, pod kterou je patrný kulatobuněčný infiltrát (šipka) s granulační tkáně. Barvení hematoxylin&eosin, orig. zvětšení 100x a 200x.



**Obr. 12** Kožní rána v sedmém dnu po poranění, aplikace MDOC™ ve formě spreje.

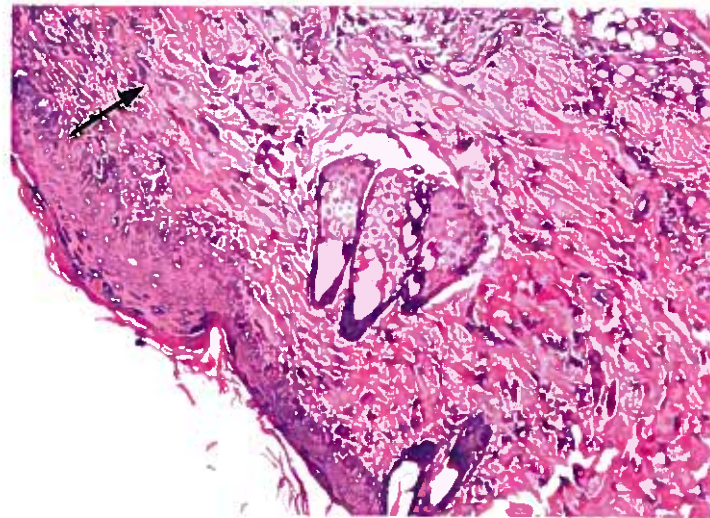
Detail granulační tkáně s bohatou vaskulaturou a infiltrátem zánětlivých buněk. Barvení Zelený Trichrom, orig. zvětšení 200x.





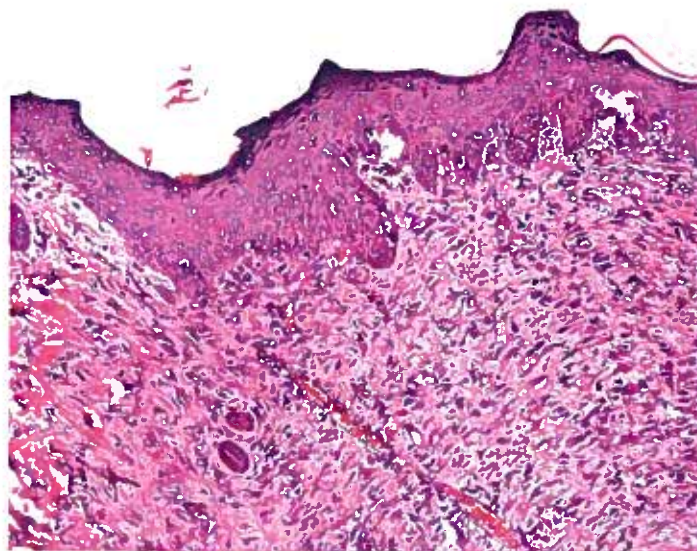
**Obr. 13** Kontrolní kožní rána v sedmém dnu po poranění.

Hranice (šipka) intaktní části kůže s kožními adnexy a rány při levém horním okraji s nově se tvořící epidermis. Barvení hematoxylin&eosin, orig. zvětšení 200x.



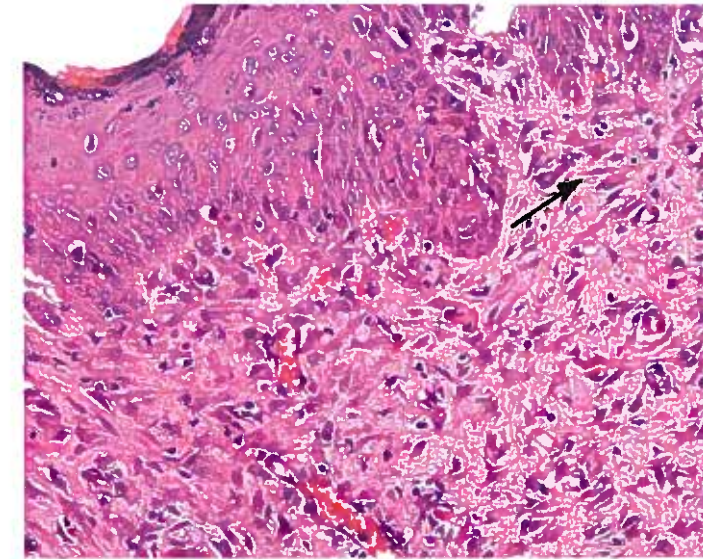
**Obr. 14** Kožní rána ve čtrnáctém dnu po poranění, aplikace MDOC™ ve formě gelu.

Kompletní remodelace epidermis a dermis. V prostředí dermis je patrná extracelulární matrix s fibroblasty. Barvení hematoxylin&eosin, orig. zvětšení 200x.



**Obr. 15** Kožní rána ve čtrnáctém dnu po poranění, aplikace MDOC™ ve formě gelu.

Remodelace epidermis a dermis s bohatým zastoupením fibroblastů v porovnání s kontrolní skupinou. Barvení hematoxylin&eosin, orig. zvětšení 200x.



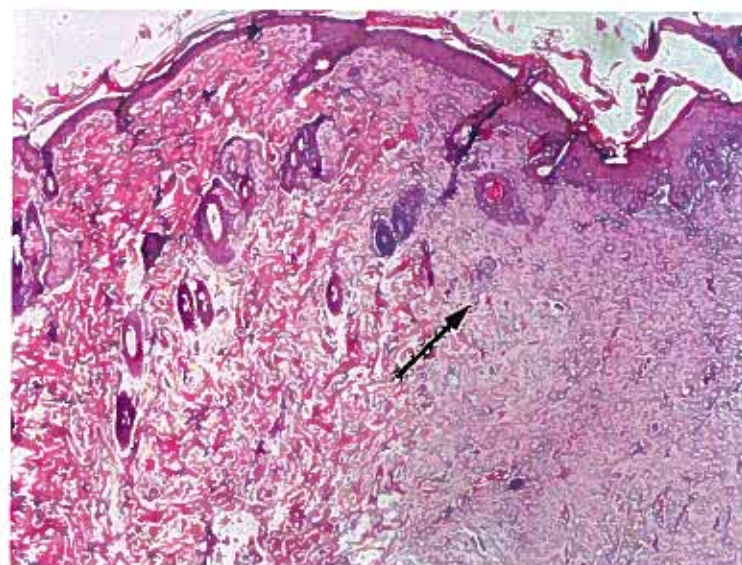
**Obr. 16** Kožní rána ve čtrnáctém dnu po poranění, aplikace MDOC™ ve formě mikrokrystalického prášku.

Kožní rána na povrchu krytá krustou s kompletní regenerací epidermis a vytvořenou extracelulární matrix. Barvení hematoxylin&eosin, orig. zvětšení 100x.





Obr. 17 Kožní rána ve čtrnáctém dnu po poranění, aplikace MDOC™ ve formě gelu. Hranice (šipka) intaktní části kůže s kožními adnexy a rány s kompletní remodelací dermis a epidermis. Barvení hematoxylin&eosin, orig. zvětšení 100x.



## 11. Výsledky imunohistochemické analýzy

### 11.1. Imunohistochemické barvení TNFRI

Expresí membránového receptoru pro TNF- $\alpha$  byla viditelná infiltrovanými zánětlivými buňkami (makrofágy a lymfocyty) při spodní hranici krusty již třetí den po poranění u MDOC™ i kontrolní skupiny. Dále v endotelových buňkách, zejména při intaktních okrajích rány s výraznou reakcí barvení u skupiny MDOC™.

V sedmém dnu po operaci byl patrný nárůst regenerované epidermis s expresí TNFRI epidermálními a endotelovými buňkami u experimentální MDOC™ i kontrolní skupiny. U MDOC™ skupiny byla dále v prostředí granulační tkáně přítomna výrazná reakce s expresí TNFRI zánětlivými buňkami. Ve středu rány byli již patrné proliferující fibroblasty, přičemž množství těchto buněk se zdálo být o něco nižší v porovnání s kontrolní skupinou.

Ve čtrnáctém dnu po poranění byla viditelná kompletní regenerace epidermis se slabou expresí TNFRI epidermálními buňkami u kontrolní skupiny. U experimentální skupiny byla zachycena exprese tohoto receptoru v zánětlivém infiltrátu v prostředí extracelulární matrix a dále endotelovými buňkami cév.

### 11.2. Imunohistochemické barvení TGF $\beta$ RII

Expresí TGF $\beta$  RII byla pozorována již na počátku časné fáze procesu hojení, tzn. třetí den po poranění buňkami zánětlivého infiltrátu při spodní hranici krusty a v granulační tkáni u MDOC™ skupin. U kontrolní skupiny byla exprese tohoto receptoru velmi slabá.

V sedmém dnu po poranění byla exprese TGF $\beta$  RII viditelná v keratinocytech regenerované epidermis bez rozdílů v intenzitě barvení u obou skupin. Dále byla exprese detekována ve fibroblastech v místě extracelulární matrix a endotelových buňkách hyperemických cév ve větší míře u kontrolní skupiny. U MDOC™ ošetřených ran byla exprese pozorována v dermis přetrvávajícími buňkami zánětlivého infiltrátu.

Expresí TGF $\beta$  RII byla u skupiny s ošetřenými poraněními viditelná ve čtrnáctém dnu po poranění v zánětlivých buňkách v prostředí extracelulární matrix o slabší intenzitě v porovnání s kontrolou. U obou skupin byla dále exprese TGF $\beta$  RII patrná také epidermálními buňkami regenerované epidermis.



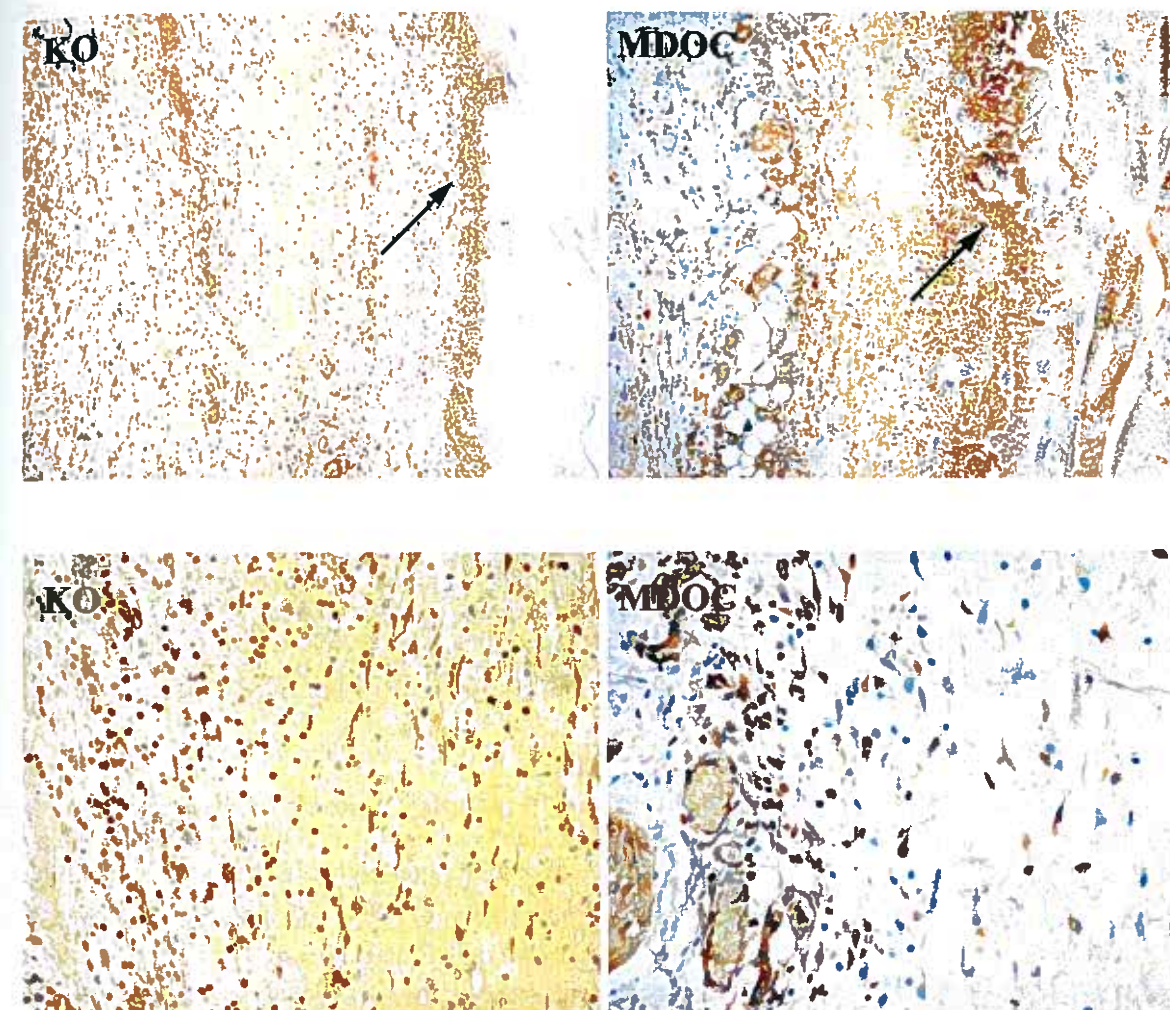
### 11.3. Imunohistochemické barvení CCR2

Expresí CCR2 receptoru monocyárního chemotaktického faktoru byla u hodnocených řezů kontrolní kožní tkáně patrná již ve třetím dnu po poranění buňkami zánětlivého infiltrátu v prostředí krusty. U MDOC™ skupiny zvířat exprese pozorována nebyla.

V sedmém dnu po poranění byla exprese tohoto receptoru viditelná v buňkách epidermis o výrazné a srovnatelné intenzitě imunohistochemického barvení u obou skupin. Dále v buňkách zánětlivého infiltrátu (lymfocyty, monocyty a makrofágy), což bylo vyjádřeno slabější reakcí imunohistochemického barvení u MDOC™ skupiny.

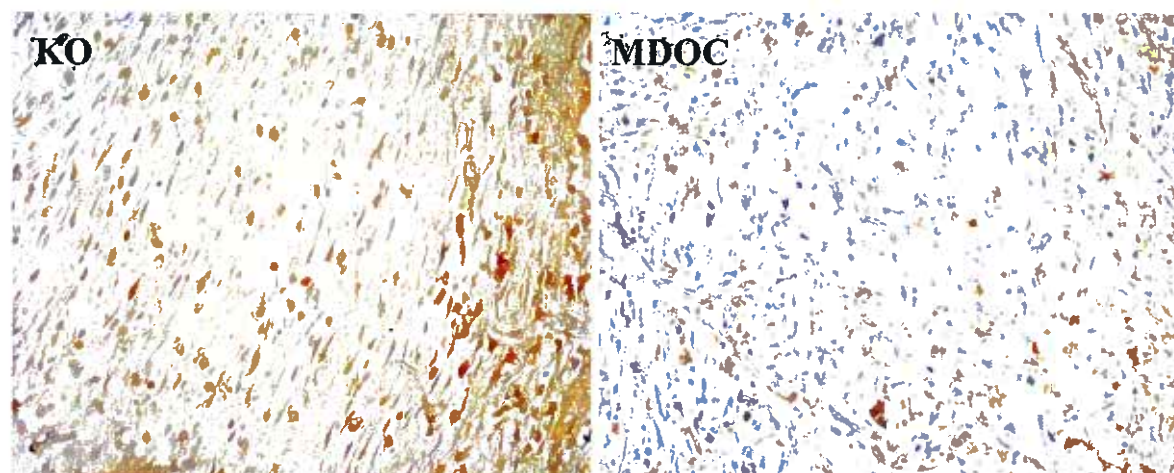
Ve čtrnáctém dnu byla u kontrolní skupiny exprese CCR2 zachycena fibroblasty v prostředí remodelované extracelulární matrix. Dále byl imunohistochemickým barvením tento faktor viditelný v epidermálních a endotelových buňkách s větší intenzitou barvení u kontrolní skupiny.

**Obr. 18** Expresí TNFR1 v kožní tkáni u MDOC™ skupiny a kontrolní skupiny (KO) ve třetím dnu po poranění. U kontrolní i MDOC™ skupiny je viditelná výrazná reakce imunohistochemického barvení s expresí TNFR1 v zánětlivém infiltrátu při spodní hranici krusty (šipka) kryjící ránu, dále v prostředí granulační tkáně a v endotelových buňkách. Origin. zvětšení 100x a 200x.

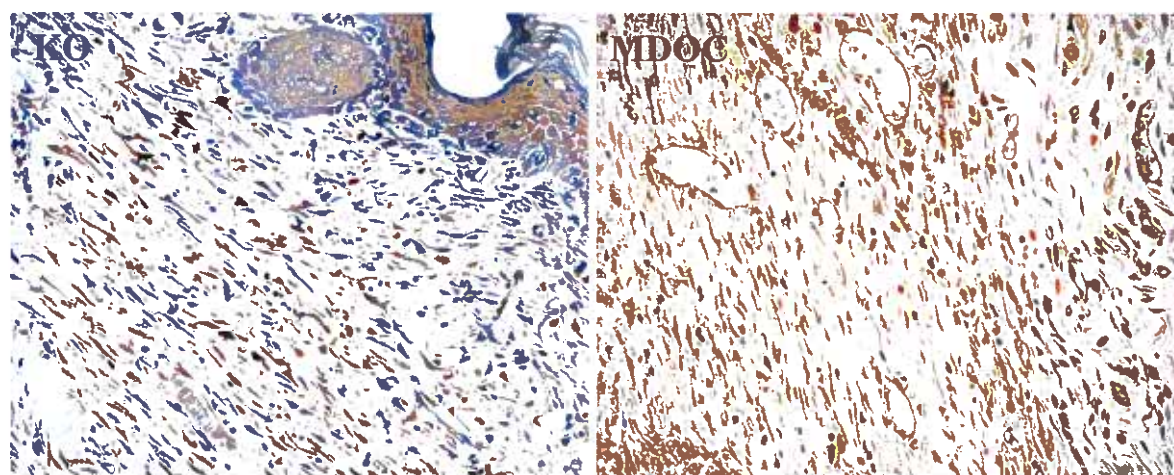




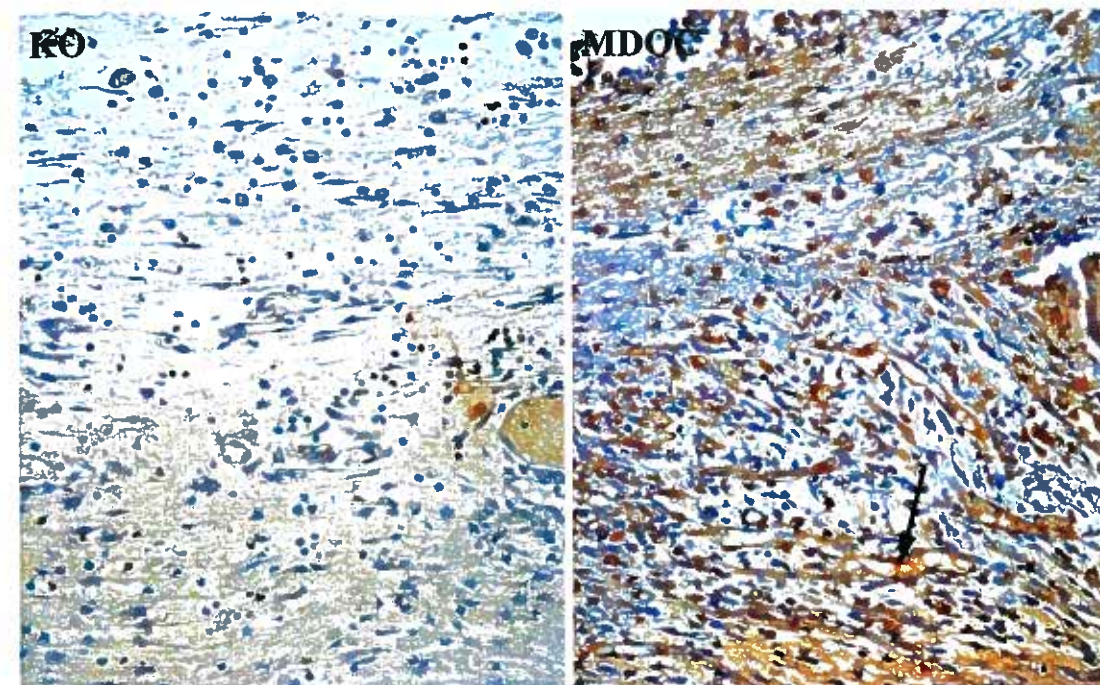
Obr. 19 Expres TNFR1 v kožní tkáni u MDOC™ skupiny a kontrolní skupiny (KO) v sedmém dnu po poranění. U MDOC™ i KO skupiny je patrná exprese TNFR1 zánětlivými buňkami v prostředí vytvořené granulační tkáně. Orig. zvětšení 200x.



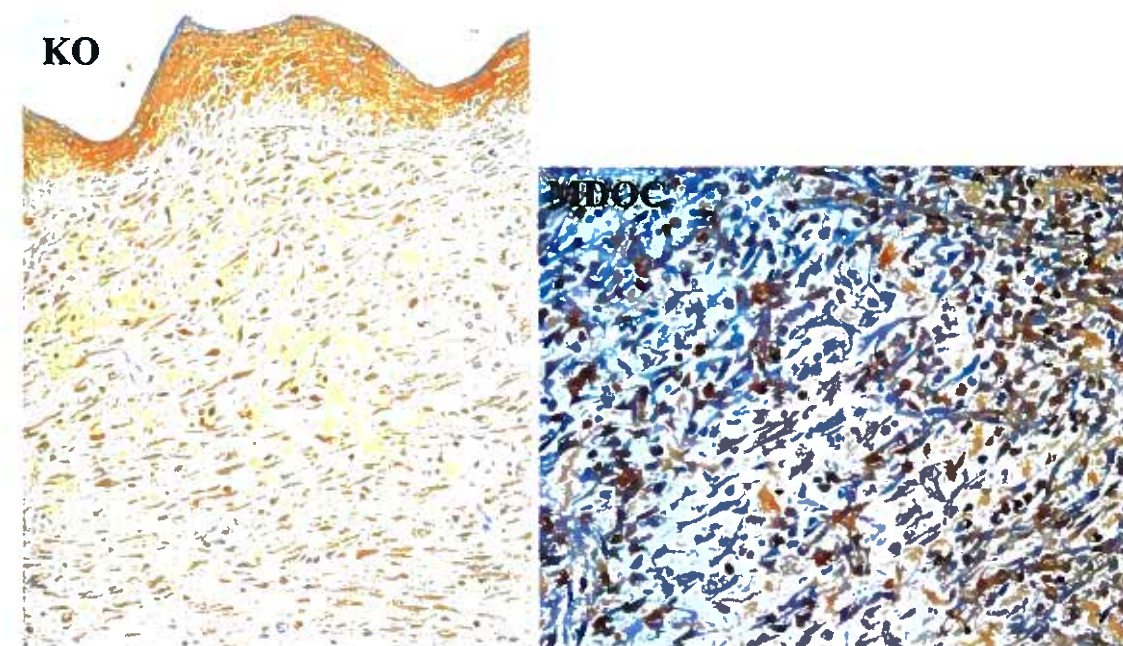
Obr. 20 Expres TNFR1 v kožní tkáni u MDOC™ skupiny a kontrolní skupiny (KO) ve čtrnáctém dnu po poranění. U KO skupiny je patrná slabá exprese TNFR1 epidermálními buňkami, zatímco u MDOC™ skupiny je TNFR1 detekován buňkami zánětlivého infiltrátu a endotelovými buňkami vytvořených cév prostředí extracelulární matrix. Orig. zvětšení 200x.



Obr. 21 Expres TGFβ RII v kožní tkáni u MDOC™ skupiny a kontrolní skupiny (KO) ve třetím dnu po poranění. U KO skupiny není patrná exprese v prostředí krusty, zatímco u MDOC™ skupiny je viditelná zánětlivým infiltrátem a dále endotelovými buňkami cév (šipka) v granulační tkáni. Orig. zvětšení 200x.

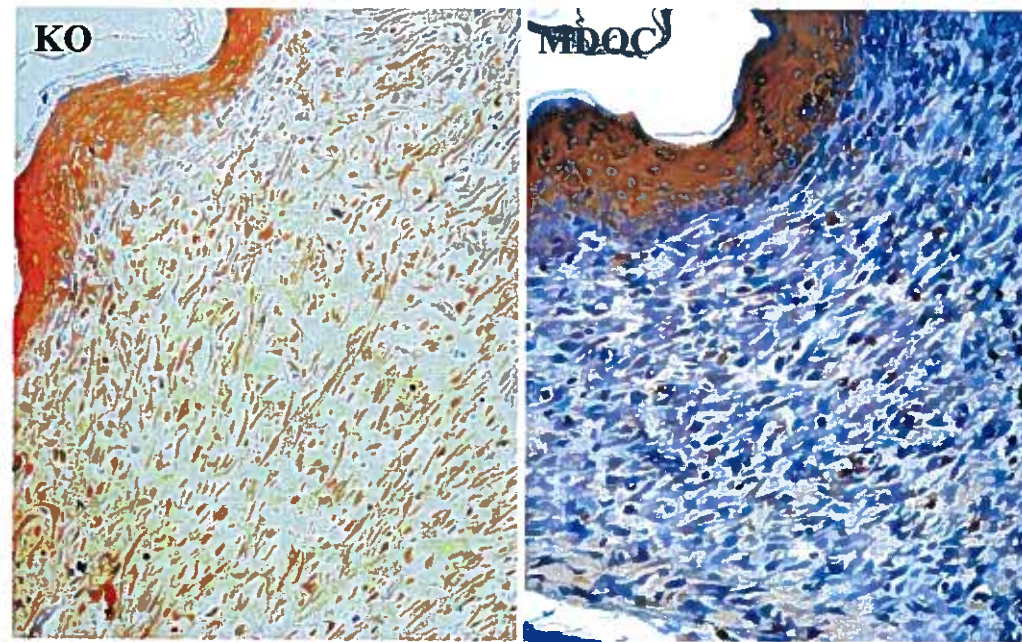


Obr. 22 Expres TGFβ RII v kožní tkáni u MDOC™ skupiny a kontrolní skupiny (KO) v sedmém dnu po poranění. U KO skupiny je tento receptor exprimován buňkami epidermis, zatímco u MDOC™ skupiny buňkami zánětlivého infiltrátu v prostředí tvořené extracelulární matrix. Orig. zvětšení 200x.

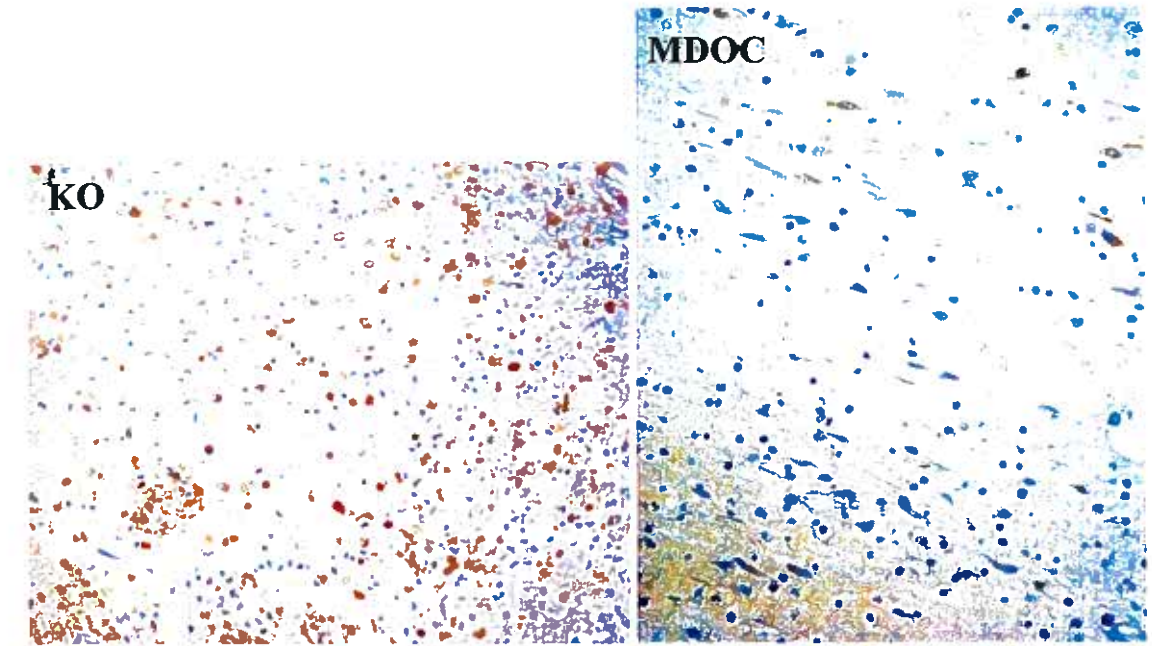




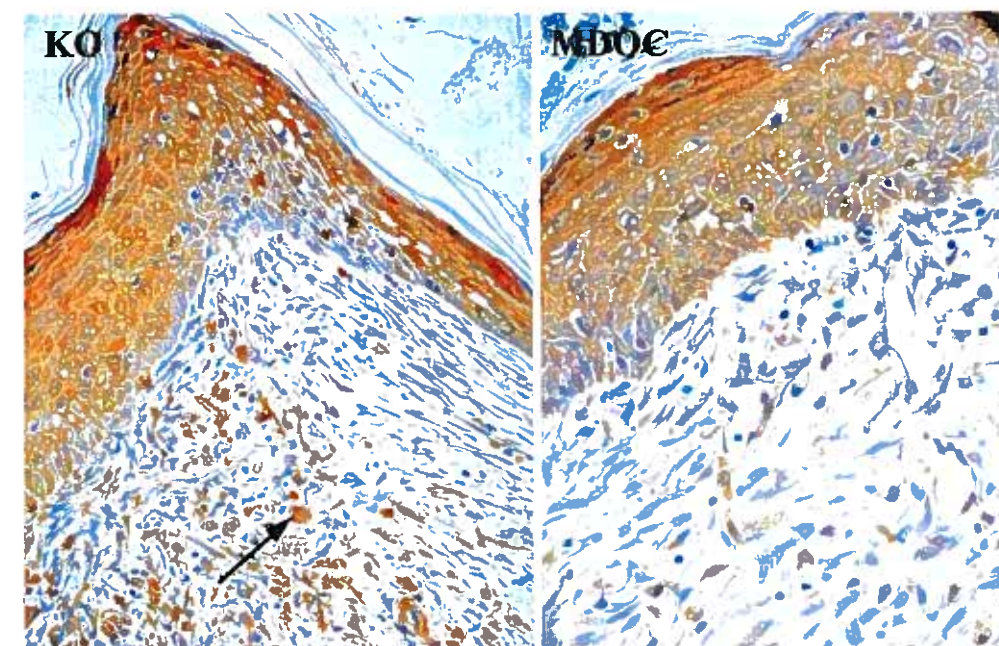
**Obr. 23** Expresse TGF $\beta$  RII v kožní tkáni u MDOC™ skupiny a kontrolní skupiny (KO) ve čtrnáctém dnu po poranění. Expresse receptoru pro TGF $\beta$  je viditelná u KO skupiny epidermálními buňkami. U KO skupiny dále fibroblasty v prostředí extracelulární matrix. Orig. zvětšení 200x.



**Obr. 24** Expresse CCR2 v kožní tkáni u MDOC™ skupiny a kontrolní skupiny (KO) ve třetím dnu po poranění. Expresse CCR2 receptoru je patrná pouze u KO skupiny zvířat v buňkách zánětlivého infiltrátu při spodní hranici krusty pokrývající ránu. Orig. zvětšení 200x.

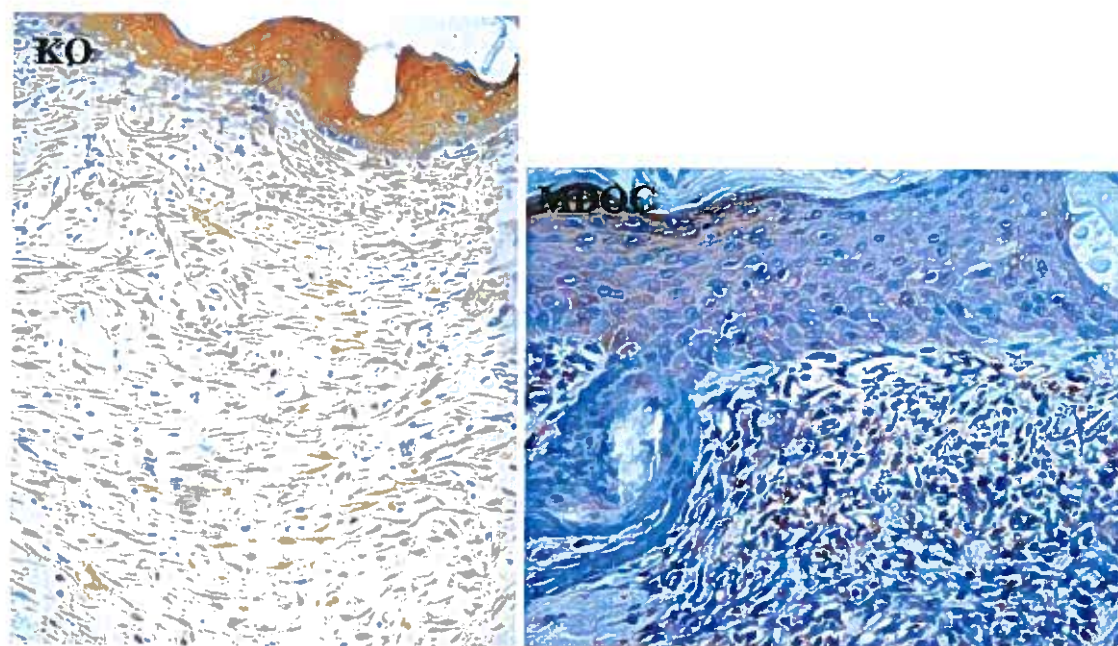


**Obr. 25** Expresse CCR2 receptoru v kožní tkáni u MDOC™ skupiny a kontrolní skupiny (KO) v sedmém dnu po poranění. Expresse CCR2 je patrná epidermálními buňkami u obou skupin o srovnatelné intenzitě barvení a dále zánětlivými buňkami (šipka) u KO skupiny v prostředí extracelulární matrix. Orig. zvětšení 200x.





Obr. 26 Expres CCR2 receptoru v kožní tkáni u MDOC™ skupiny a kontrolní skupiny (KO) ve čtrnáctém dnu po poranění. Expres CCR2 je patrná epidermálními buňkami a fibroblasty s větší intenzitou barvení u KO skupiny. Orig. zvětšení 200x.



## 12. Studium vlivu derivátu MDOC™ na proces hojení u infikované kožní rány

V návaznosti na studii sledování vlivu lokálně aplikované MDOC™ na proces akutního hojení ran na potkaním modelu, byla uskutečněna obdobná pilotní analýza na velkém laboratorním zvířeti. Studovaným přípravkem byla sodnovápenatá sůl (PAGA) mikrokrystalické celulózy ve formě textilie v kombinaci s navázaným genatamicinem (Alltracel lab., Dublin).

K histopatologické analýze kožních incizí byl zvolen experimentální model velkého laboratorního zvířete (prase domácí, *Sus scrofa domestica*), především z důvodu značné anatomicko-funkční podobnosti kožního systému se stavbou kůže člověka (72, 73). O tomto experimentálním modelu, bylo již pojednáno blíže v kapitole Využití zvířecích experimentálních modelů v procesu hojení ran.

Týmy zkušených odborníků se již řadu let zabývají vývojem a neustálým zdokonalováním přípravků pro operační sály s cílem zamezit vzniku či rozvoji nežádoucích nozokomiálních infekcí. Zdrojem těchto nálezů jsou především rezistentní kmeny bakterií, jako je *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (91) či *Escherichia coli*. Infekce ran způsobené chirurgickým výkonem se označují jako tzv. SSI (Surgical Site Infections) a tvoří druhou nejpočetnější skupinu nozokomiálních nálezů (92). Dělí se na skupinu SSI nacházející se přímo v incizi a dále na tzv. orgánové nákazy, přítomné ve všech tkáních postižených při zákroku. Výskyt těchto infekcí je podmíněn řadou faktorů a je komplikací se závažnými následky pro průběh hojení rány, které mohou ohrozit pacienta na životě (93). Z ovlivnitelných faktorů je to např. výběr optimální operační techniky či přísné dodržování hygienických zásad. Z neovlivnitelných celkový stav pacienta a charakter choroby. Ošetřování infikovaných ran vyžaduje především kultivační vyšetření z rány, které umožní výběr cílené antibiotické léčby. U lehkých forem poranění jsou často žádoucí výplachy nebo obklady s dezinfekčními roztoky (např. Betadin®, chlorhexidin) (94) a použití materiálu, který nezadržuje infikovaný sekret v ráně. I přesto, že antibiotická profylaxe přispěla v posledním čtvrtstoletí k podstatnému snížení výskytu těchto infekcí, představuje stále riziko v případě přítomnosti rezistentních bakterií (metacilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) (95, 96). Různé typy chirurgických zákroků se liší stupněm kontaminace rány (97). Rozlišuje se rána čistá, tzn. s rizikem kontaminace do 1,5%, dále rána čistá kontaminovaná (7%), rána kontaminovaná (15%) a rána znečištěná (40%). Možnosti léčby ranných infekcí zahrnují tedy zamezení rizika vzniku infekce (ATB profylaxe, asepse),

chirurgické ošetření (debridement, odstranění cizích těles, výplach, drenáž), popřípadě imunoterapii či aplikaci lokálních antimikrobiálních prostředků (antibiotika, preparáty s jodem či stříbrem) (98).

Gentamicin je širokospektré baktericidní aminoglykosidové antibiotikum účinné proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím. Je rychle absorbován a po intramuskulární aplikaci dosahuje maximálních plazmatických hladin za 30-90 minut. Terapeutická hladina je v krvi měřitelná po dobu 6-8 hodin. Přibližně 90% gentamicinu je vyloučeno v nezměněné formě glomerulární filtrací močí. Garamycin Schwamm® je komerčním přípravkem využívaným v mnoha chirurgických oborech v prevenci a léčbě infekcí zvláště u pacientů s rizikovými faktory (např. *diabetes mellitus*). Mezi hlavní výhody jeho použití patří včasný nástup vysoké lokální koncentrace navázaného antibiotika účinné i proti rezistentním kmenům bakterií, čímž se významně snižuje riziko infekce a zkracuje doba hospitalizace pacienta (99).

### 13. Materiál a metodika

Tato studie probíhala na půdě Fakulty vojenského zdravotnictví UO, Hradec Králové za koordinace hlavním řešitelem z katedry válečné chirurgie. Výzkumný projekt byl schválen Etickou komisí UO v Hradci Králové pro práci s laboratorními zvířaty a pro ochranu zvířat proti týrání. Laboratorním modelem bylo prase domácí (*Sus scrofa domestica*, chovná stanice Jásenná, Česká republika) samičího pohlaví o hmotnosti 35-45 kg v den operace. Zvířata byla po celou dobu studie ustájena v prostorách vivária UO Fakulty vojenského lékařství, za standardních podmínek, jednotlivě a pod stálým veterinárním dohledem.

#### 13.1. Experimentální vytvoření modelu infikované kožní rány

Studovaným přípravkem byla PAGA (Alltracel lab., Dublin) inkorporovaná do nanovlákněné matrix vstřebatelného polyvinylalkoholu (PVA) ve formě nosiče antimikrobiální látky. Jednalo se o proužek nanovlákně (5 x 1,6 cm) s 10,83 mg gentamicinu. Pro srovnání účinnosti tohoto přípravku byl použit komerční Garamycin Schwamm® (Innocol, Seal/Donal, SRN), který je složen z kolagenní hmoty, která slouží jako nosič gentamicin sulfátu.

Navození ranné infekce kožní rány bylo provedeno na 18 samicích prasete domácího, náhodně rozdělených do tří skupin. V každé skupině byla vždy na dvou jedincích testována účinnost studovaných přípravků a mikrobiálního agens (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*). V den experimentu byla intramuskulárně do oblasti šjíjového svalstva podána premedikace podle protokolu: ketamin (Narkamon, Zentiva, Česká republika) (30 mg/kg), azaperon (Stresnill, Janssen Pharmaceutica, Belgie) (40 mg/kg) a atropin (Atropin Biotika A.U.V., Biotika, Slovenská republika) (0,5 mg/kg). Po nastoupení sedace byla kanylována aurikulární žíla a zvířata byla po celou dobu experimentu udržována v celkové anestézii pomocí intravenózně aplikovaného ketaminu.

Paravertebrální oblast samic byla oholena a dezinfikována roztokem Betadinu® (EGIS Pharmaceuticals Ltd., Maďarsko, Mundipharma, A.G., Švýcarsko). V celkové anestézii za dodržení všech kautel asepsy bylo chirurgickým skalpelem vytvořeno osm kožních incizí (o délce 5 cm, označeny L1-L4 levá strana a P1-P4 pravá strana) s bočními tržně zhmožděnými zářezy. Rány o velikosti 5 x 2 x 0,5 cm zasahovaly až na úroveň fascie. Na spodinu ran bylo aplikováno 0,5 ml suspenze infekčního agens ( $10^8$  CFU/ml) a po 45 minutách konkrétní studovaný přípravek. Přičemž dvě rány sloužily jako kontrolní, tzn. L1 byla pouze infikovaná a P4 čistá bez aplikace přípravku. Incize byly kryty sterilním krytím,



kteřé bylo zafixováno k založeným kožním stehům a překryto plátěnou rouškou. Kontrola ran byla provedena po 24, 48 a 168 hodinách za uvedení zvířat do krátkodobé celkové anestezie. Bylo provedeno makroskopické hodnocení ran, fotografická dokumentace a odběr vzorků ke kultivačnímu vyšetření a v den ukončení experimentu (sedmý den po operaci) odběr kožní tkáně pro histopatologické vyšetření.

### 13.2. Makroskopická a histologická analýza

Sedmý den po operaci byla provedena euthanasie zvířat pomocí intravenózně aplikovaného přípravku T-61 (Intervet Kanada Ltd., Kanada). Standardní vzorek spodiny a okrajů rány o velikosti 1,5 cm byl ihned odebrán do fixačního roztoku. Pro histologická barvení byly krájeny série podélných řezů o tloušťce 5-6  $\mu\text{m}$  na diskovém mikrotomu Leica DSC1 (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Německo). Klasickou světelnou mikroskopií pomocí základního barvení (hematoxylin&eosin a zelený trichrom) bylo hodnoceno zastoupení a lokalizace buněk, tloušťka epidermis, charakter granulační tkáně, což bylo vždy srovnáno s kontrolní skupinou.

Při makroskopickém hodnocení rány byla sledována přítomnost zánětlivých změn (edém, zarudnutí, sekrece), uzavírání a charakter okrajů rány a míra vstřebání přípravku. Tzn., byl zjišťován počet ran čistých s kompletně vstřebaným preparátem, ran čistých s nevstřebaným preparátem a ran se zjevnými známkami infekce (zánětlivý exsudát, povlak na spodině rány) a nevstřebaným preparátem, což bylo vždy vztaženo k celkovému počtu ran. Do výsledků nebyly zahrnuty rány kontrolní, tzn. bez přítomnosti zkoušeného preparátu. Výsledky byly zaneseny do tabulek. Dále byla zhotovena fotografická dokumentace ran v den operace, třetí den po operaci a sedmý den při ukončení experimentu.

### 13.3. Mikrobiologická analýza

Pro hodnocení účinnosti studovaných přípravků byla na krevním agaru provedena primokultivace a kultivace mikrobiologického substrátu odebraného ze spodiny ran v prvním, druhém a sedmém dnu po operaci. Cílem bylo zhodnotit účinnost přípravků, tedy počet negativních ran na přítomnost jednotlivých infekčních agens. Statistická analýza (Fisherův test) byla provedena z primokultivací pro každé infekční agens a typ rány (čistá, infikovaná, infikovaná s aplikací studovaného přípravku PAGA s navázaným gentamicinem, popř. Garamycin Schwamm®), což bylo vztaženo k celkovému počtu ran. Získané výsledky z primokultivací a kultivací byly zaneseny do tabulek.

## 14. Výsledky

Pro mikrobiologické hodnocení účinnosti studovaného přípravku PAGA s navázaným gentamicinem byly rozhodující výsledky primokultivace ze sedmého dne po operaci. Celkově se mikrobiologickou analýzou ranných infekcí potvrdila vyšší antibakteriální účinnost přípravku Garamycin Schwamm®, tzn. baktericidní efekt. Nicméně u studovaného přípravku PAGA s navázaným gentamicinem byla prokázána dostatečná účinnost v ráně pro potlačení infekce. Dále v případě ran infikovaných kmenem *Ps. aeruginosa*, vykázal vyšší účinnost přípravek Garamycin Schwamm®, u ran infikovaných kmenem *St. aureus* neprokázaly oba přípravky dostatečný efekt. Ve skupině ran s aplikovanou *E. coli* byla potvrzena obdobná dostačující účinnost obou přípravků. Při hodnocení byla potvrzena sekundární kontaminace ran, což bylo pravděpodobně způsobeno nedostatečnou vzdáleností mezi jednotlivými poraněními a mohlo tak vést k negativnímu ovlivnění výsledků. Na základě výsledků primokultivace a kultivačních vyšetření, nebyl Fisherovým testem potvrzen statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými aplikovanými agens.

Makroskopickou analýzou bylo po 48 hodinách zjištěno vstřebání přípravku PAGA téměř u všech léčených ran a sedmý den při ukončení experimentu, byla PAGA s navázaným gentamicinem vstřebána zcela. U kontrolní skupiny s aplikací Garamycinu Schwamm® ve formě kolagenní houby se z počátku působení přípravku zdálo jako nežádoucí a bylo spojeno s delší dobou vstřebávání. U infikovaných ran byl tento preparát patrný ještě sedmý den po poranění, přičemž rány vykazovaly známky infekce (exsudát, povlak spodiny rány).

Mikroskopickým vyšetřením odebraných tkáňových vzorků byl ověřen standardní průběh hojivého procesu v podmínkách infiltrace aplikovaných patogenů. V makroskopickém hodnocení studovaného přípravku se výrazně projevíly hlavní pozitivní vlastnosti, tzn. biokompatibilita a schopnost kompletní resorpce. Nicméně přítomnost bohaté granulační tkáně, infiltrace centra i okolí rány prozánětlivými buňkami (zejména makrofágy), vysoký stupeň reepitelizace, angiogeneze a fibroplazie nepotvrdila progresi procesu hojení v porovnání s kontrolní skupinou.



**Tab. 2 Makroskopické hodnocení kožních poranění (počet ran/celkový počet ran) první, druhý a sedmý den po operaci.** V tabulkách je uveden zjištěný počet ran čistých s kompletně vstřebaným přípravkem (I), ran čistých s patrným přípravkem (II), ran s místními známkami infekce s patrným přípravkem (III), vztaženo vždy k celkovému počtu ran. Pro každé infekční agens a aplikovaný typ preparátu je uvedena samostatná i souhrnná tabulka.

<i>Ps. aeruginosa</i>							
	textilie MDOCT <sup>TM</sup>				Garamycin Schwamm <sup>®</sup>		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
I	12/12	7/12	9/12		0/12	0/12	2/12
II	0/12	4/12	2/12		5/12	8/12	0/12
III	0/12	1/12	1/12		7/12	4/12	10/12

<i>St. aureus</i>							
	textilie MDOCT <sup>TM</sup>				Garamycin Schwamm <sup>®</sup>		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
I	1/12	10/12	11/12		0/12	0/12	3/12
II	4/12	2/12	0/12		2/12	9/12	0/12
III	7/12	0/12	1/12		10/12	3/12	9/12

<i>E. coli</i>							
	textilie MDOCT <sup>TM</sup>				Garamycin Schwamm <sup>®</sup>		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
I	0/12	1/12	9/12		0/12	0/12	0/12
II	8/12	9/12	3/12		0/12	0/12	0/12
III	4/12	2/12	0/12		12/12	12/12	12/12

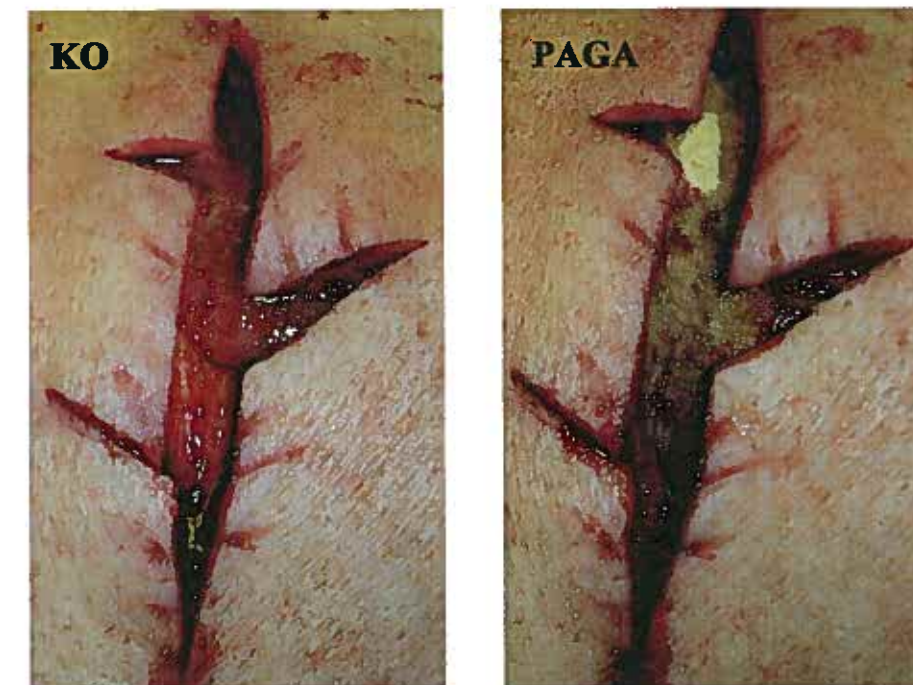
Souhrnná tabulka všech testovaných agens  
*Ps. aeruginosa* + *St. aureus* + *E. coli*

	textilie MDOCT <sup>TM</sup>				Garamycin Schwamm <sup>®</sup>		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN		1. DEN	2. DEN	7. DEN
I	13/36	18/36	29/36		0/36	0/36	5/36
II	12/36	15/36	5/36		7/36	17/36	0/36
III	11/36	3/36	2/36		29/36	19/36	31/36

**Obr. 27 Experimentální model infikované rány s trzně zhmžděnými okraji. Chirurgické vytvoření kožních incizí v paravertebrální oblasti prasete domácího.**

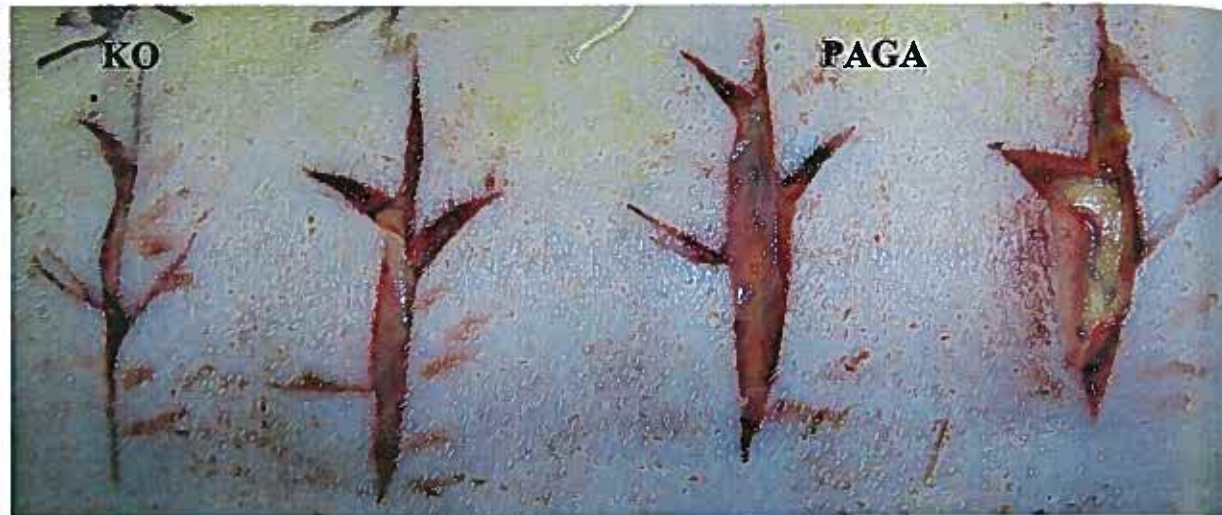


**Obr. 28 Detail kontrolní fyziologické rány (KO) a rány infikované s aplikovaným přípravkem PAGA s navázaným gentamicinem v den operace.**





Obr. 29 Kožní incize druhý den po operaci. Zprava jsou viditelné tři rány s aplikací PAGA a navázaným gentamicinem s mírným povlakem na spodině. Kontrolní rána (KO) je čistá se zataženými okraji.



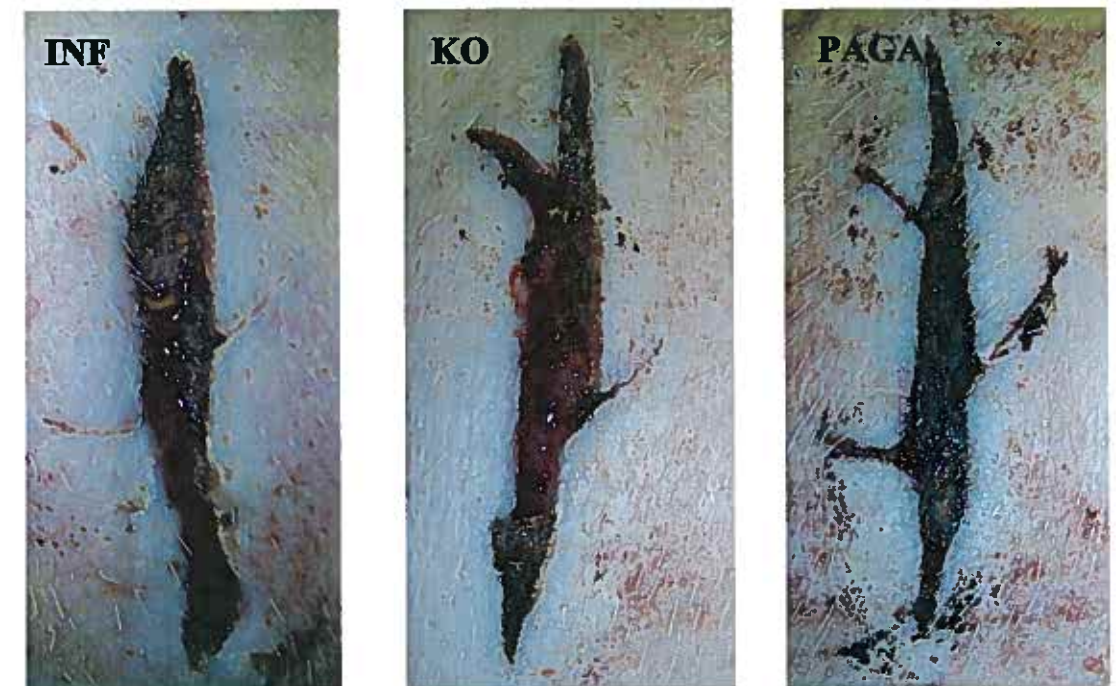
Obr. 30 Rána infikovaná s aplikovaným přípravkem PAGA. Detail rány s mírným povlakem spodiny a dosud nevstřebaným nosičem druhý den po operaci.



Obr. 31 Kožní incize sedmý den po operaci. Zprava jsou viditelné tři infikované rány s aplikací PAGA s navázaným gentamicinem. První rána zprava je charakteristická gelovitým povlakem spodiny, u druhé a třetí rány je patrná serózní sekrece. Kontrolní rána (KO) je bez známek infekce.



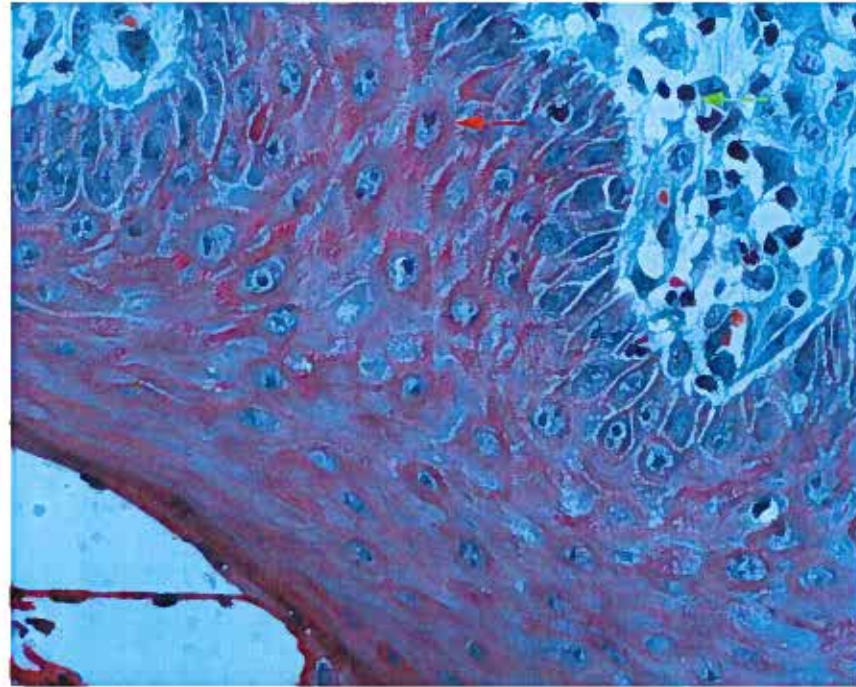
Obr. 32 Kožní incize sedmý den po operaci. Tyto reprezentativní fotografie zachycují zleva, ránu pouze infikovanou (INF), čistou (KO) a ránu infikovanou s aplikací přípravku PAGA s navázaným gentamicinem.



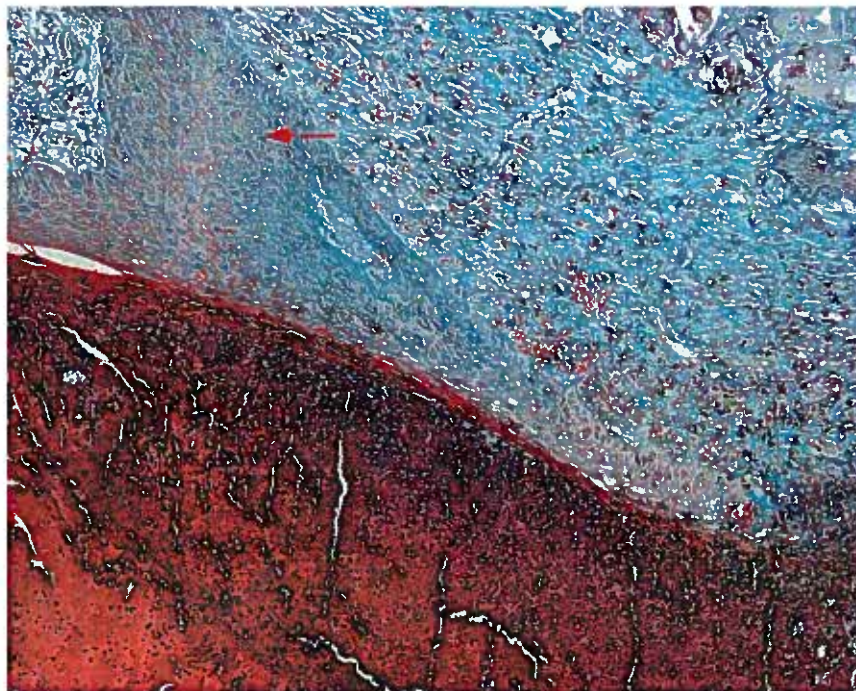


**Obrazová příloha k mikroskopickému hodnocení hojení akutního procesu kožních infikovaných poranění v sedmém dnu po poranění:**

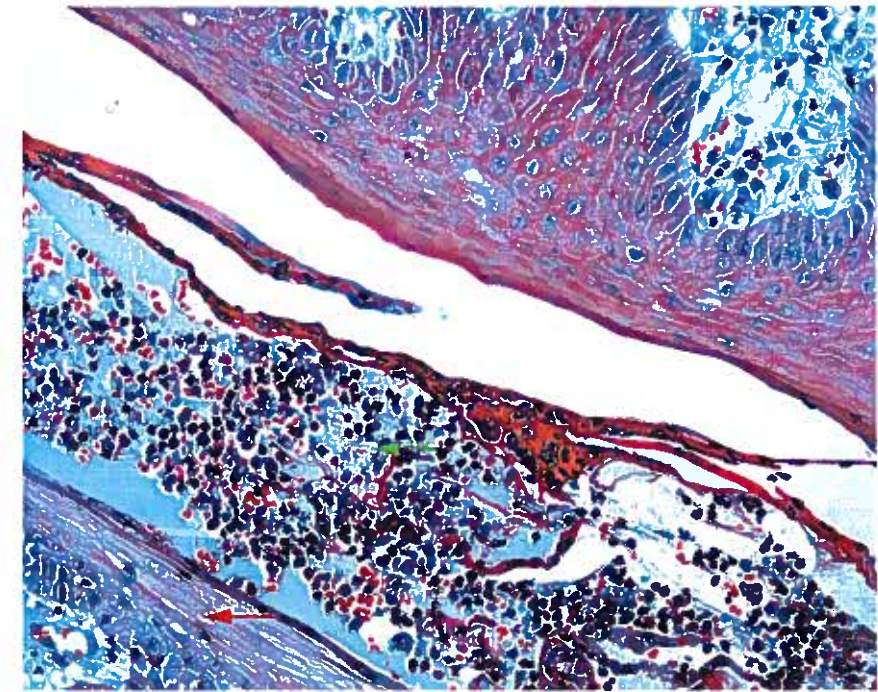
**Obr. 33** Detail intaktní epidermis v okolí infikované rány. V epidermis jsou zvláště patrné buňky *stratum spinosum* s tonofibrilami (červená šipka), v dermis je viditelná mírná infiltrace leukocytů (zelená šipka). Barvení Zelený Trichrom, orig. zvětšení 400x.



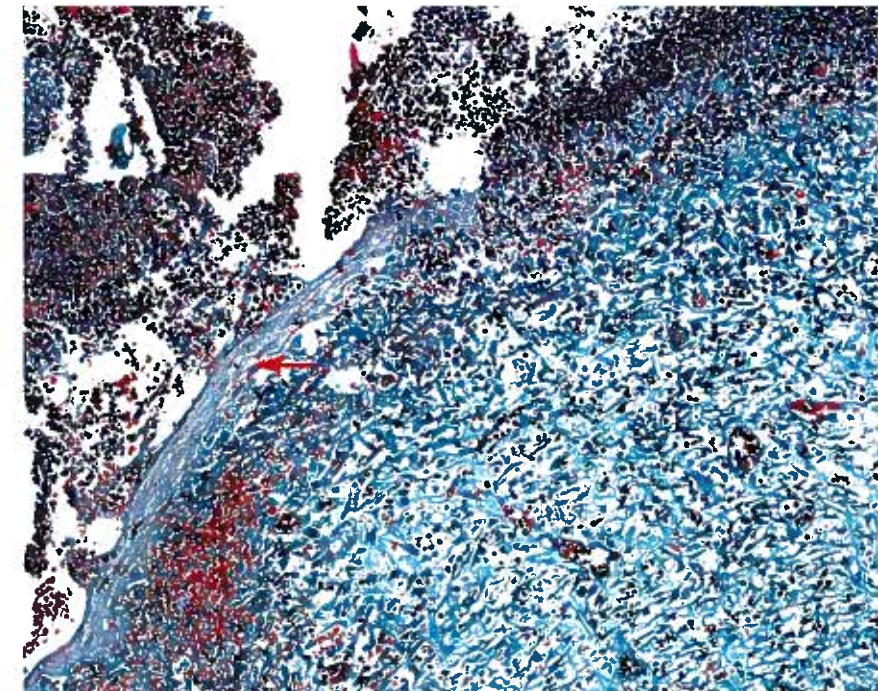
**Obr. 34** Čistá kontrolní rána. Ve spodní části obrázku je viditelná krusta a nad ní epiteliální výběžek (červená šipka) obklopený vytvořenou granulační tkání. Rána je charakteristická menším množstvím kulatobuněčného infiltrátu v porovnání s infikovanými a ošetřenými incizemi. Barvení Zelený Trichrom, orig. zvětšení 100x.



**Obr. 35** Rána s infektem a aplikací PAGA s navázaným gentamicinem. Uprostřed rány je patrný exsudát bohatý na zánětlivý kulatobuněčný infiltrát (zelená šipka) s erytrocyty a fibrinovými vlákny. Ve spodní části je zobrazena již diferencující se epidermis (červená šipka) a při horním okraji je viditelná intaktní epidermis. Barvení Zelený Trichrom, orig. zvětšení 200x.

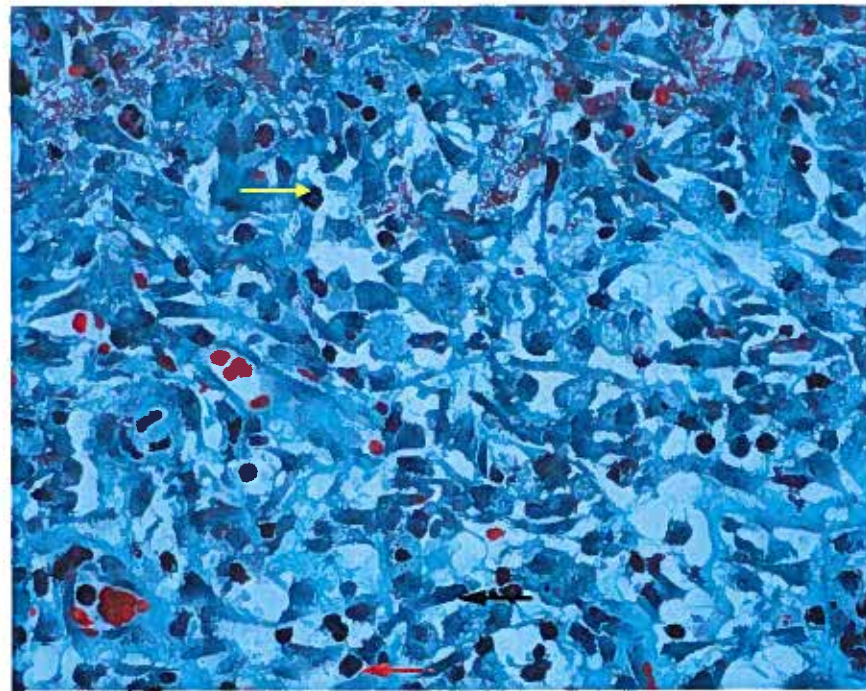


**Obr. 36** Rána s infektem a aplikací PAGA s navázaným gentamicinem. Okraj defektu s krustou, nově se tvořící epidermis (červená šipka) a bohatou granulační tkání. Barvení Zelený Trichrom, orig. zvětšení 100x.

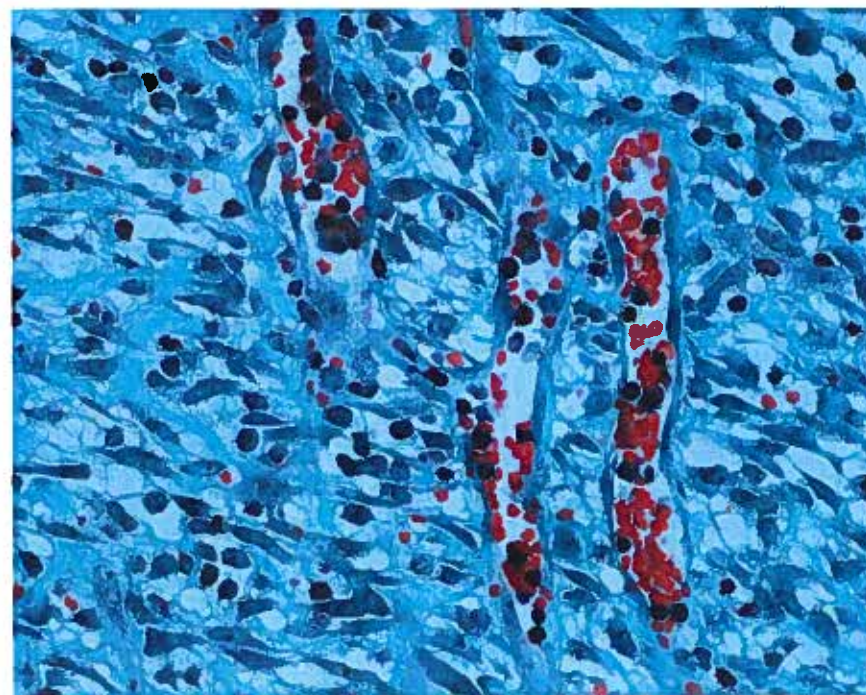




Obr. 37 Rána s infektem a aplikací PAGA s navázaným gentamicinem. Detail granulační tkáně v kontaktu s bohatým zastoupením fibroblastů (černá šipka), makrofágů (červená šipka) a neutrofilů (žlutá šipka). Barvení Zelený Trichrom, origin. zvětšení 400x.



Obr. 38 Rána s infektem a aplikací PAGA s navázaným gentamicinem. Detail granulační tkáně s bohatou vaskulaturou a erytrocyty. Barvení Zelený Trichrom, orig. zvětšení 400x.



Tab. 3 Kultivační průkaz infekčních agens na krevním agaru. Semikvantitativní zhodnocení přímokultivace vyšetřovaného substrátu mikroorganismů na první záchyt, odebraného z ran první, druhý a sedmý den po aplikaci přípravku PAGA a Garamycinu Schwamm®. Vyjádřeno jako počet negativních ran/celkovému počtu ran.

Typ rány	PAGA s gentamicinem			Garamycin Schwamm®		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN	1. DEN	2. DEN	7. DEN
infikovaná	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	2/2
čistá	1/2	1/2	0/2	2/2	2/2	2/2
léčená	8/12	3/12	0/12	12/12	12/12	8/12

*Ps. aeruginosa*

Typ rány	PAGA s gentamicinem			Garamycin Schwamm®		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN	1. DEN	2. DEN	7. DEN
infikovaná	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2
čistá	0/2	0/2	0/2	2/2	1/2	0/2
léčená	10/12	6/12	0/12	12/12	0/12	1/12

*St. aureus*

Typ rány	PAGA s gentamicinem			Garamycin Schwamm®		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN	1. DEN	2. DEN	7. DEN
infikovaná	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2
čistá	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
léčená	6/12	10/12	12/12	12/12	12/12	12/12

*E. coli*

Tab. 4 Kultivační průkaz infekčních agens na krevním agaru. Semikvantitativní zhodnocení namnožení mikrobiálních agens, odebraných z ran první, druhý a sedmý den po aplikaci přípravku PAGA s navázaným gentamicinem a Garamycinu Schwamm®. Vyjádřeno jako počet negativních ran/celkovému počtu ran.

Typ rány	PAGA s gentamicinem			Garamycin Schwamm®		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN	1. DEN	2. DEN	7. DEN
infikovaná	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2
čistá	1/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2
léčená	4/12	0/12	0/12	12/12	12/12	8/12

*Ps. aeruginosa*

Typ rány	PAGA s gentamicinem			Garamycin Schwamm®		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN	1. DEN	2. DEN	7. DEN
infikovaná	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2
čistá	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2
léčená	10/12	6/12	0/12	12/12	0/12	1/12

*St. aureus*

Typ rány	PAGA s gentamicinem			Garamycin		
	1. DEN	2. DEN	7. DEN	1. DEN	2. DEN	7. DEN
infikovaná	2/2	1/2	1/2	1/2	2/2	2/2
čistá	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
léčená	1/12	4/12	8/12	12/12	12/12	12/12

*E. coli*



## 15. Závěr

Podle získaných výsledků makroskopické, histologické a mikrobiologické analýzy této pilotní studie se domníváme, že lokálně aplikovaná nanovlákná PAGA v kombinaci s gentamicinem měla pouze mírný pozitivní efekt na průběh akutního hojení infikované kožní rány.

Prokázání vlivu tohoto plně vstřebatelného nosiče na hojící procesy v ráně a současně potvrzení účinnosti mikrodispergované oxidované celulózy s navázaným antibiotikem v konfirmačních studiích, by přineslo benefit v použití tohoto nového přípravku v klinické praxi a snížení nákladů v léčbě. Pro další studium je však nutno stanovit potřebnou koncentraci antibiotika a také vhodnou strategii terapie. Na místě je tedy dále v experimentech pokračovat a zaměřit se např. na expresi specifických prozánětlivých markerů či matrixových metaloproteináz (MMP-2, MMP-9) a jejich inhibitorů (TIMP) v ráně pomocí imunohistochemických metod.

## 16. Diskuze

Problematice a příčinám prodloužené doby hojení ran je věnována celá řada experimentálních studií. Prioritou jejich léčby zůstává zachování maximální kvality života pacientů při odpovídající ekonomické náročnosti ošetrovacích prostředků (100).

Obnova integrity kožní tkáně probíhá procesem reparace ve třech hlavních fázích, které se vzájemně překrývají (27), přičemž rozdělení do jednotlivých fází se řídí základními morfologickými změnami (46, 101). Obtížně se hojící a chronické rány, jejichž hojení neprobíhá podle základního schématu koagulace-zánět-proliferace-reparace, zůstávají obvykle po delší dobu ve fázi zánětlivé, což s sebou přináší dysregulace na různých úrovních (2).

Cílem moderní léčby na bázi vlhké terapie, která je na trhu zastoupena velkým množstvím obvazových materiálů, je použití krytí s vhodnými vlastnostmi, tzn. schopných udržet v ráně vlhké prostředí, vytvořit optimální pH, bránit infekci, eliminovat prozánětlivé faktory (např. volné kyslíkové radikály, proteinázy či cytokiny) a konečně i zvýšit lokální koncentraci růstových působků (78). V současnosti se v klinické praxi do popředí dostávají hydrofilní materiály jako jsou karboxycelulóza nebo jiné polysacharidy samostatně či např. v kombinaci s kolagenem. Ty mohou být moderními technologiemi zpracovány do textilní formy, která je při aplikaci na ránu schopná zabránit následné infekci. Navíc je známo, že absorbují sekret z rány a dále podporují migraci a proliferaci keratinocytů, tvorbu ECM, angiogenezi. Přispívají tím tedy k obnovení porušené rovnováhy mezi reparačními a degradačními procesy v ráně, čímž hojící proces příznivě ovlivňují (56).

V našich experimentech byl ke studiu akutního procesu hojení použit nový přípravek, jehož základem je mikrodispergovaná oxidovaná celulóza (MDOC™), patent irské firmy Alltracel, která v medicíně používá jako biokompatibilní zcela resorbovatelné hemostatikum. Je to kopolymer složený z opakujících se jednotek polyanhydroglukuronové kyseliny (PAGA) a polyanhydroglukózy. V organismu je po fagocytóze makrofágy rozkládán až na monomery, tzn. glukózu a kyselinu glukuronovou, které jsou dále metabolizovány. Jedná se o materiál s nízkou toxicitou, který se používá se ve formě spreje, gelu, prášku a textilie. Neutralizací COO<sup>-</sup> skupin ionty Ca<sup>2+</sup> a Na<sup>+</sup> v požadovaném poměru získává MDOC™ nekyselý charakter a ve vodném prostředí vytváří koloidně disperzní systém či gel. Svou strukturou se podobá polysacharidům extracelulární matrix a může tedy pravděpodobně sloužit jako vhodné prostředí pro komunikaci zánětlivých buněk a jejich interakce s regulačními proteiny a peptidy, a tím i pravděpodobně podporovat tvorbu granulační tkáně a proliferaci buněk. Tento fakt byl při lokální aplikaci nemodifikované celulózy na ránu potvrzen v řadě



experimentálních studiích (19, 4). MDOC™ přípravek může být navíc využit jako polymerní nosič různých iontů či látek (např. antibiotik), což bylo během naší experimentální činnosti také zohledněno. V dnešní době je oxidovaná celulóza (hlavně ve formě  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  soli) pro své dobré vlastnosti a cenu používána především v chirurgických oborech, a to zejména k zástavě kapilárního a parenchymatózního krvácení (19).  $\text{Ca}^{2+}$  ionty obsažené v přípravku pravděpodobně přispívají v místě rány ke zvýšení osmotického tlaku a podporují influx růstových faktorů a aktivaci prozánětlivých buněk, především makrofágů a fibroblastů (4). Jak bylo zmíněno, studovaná látka může být zpracována do textilní formy s přesně definovaným stupněm oxidace, což zajišťuje standardní fyzikální i chemické vlastnosti přípravku. Navíc vrstevnatá struktura obvazového materiálu brání vstupu infekce a zároveň umožňuje absorbovat exsudát z rány, čímž jsou zajištěny přirozené podmínky pro hojení. V našich experimentech byly pro pokrytí celého potenciálu studované látky v klinické praxi studovány všechny dostupné formy MDOC™ a jednotlivé výsledky porovnány.

Ke studiu procesu hojení existuje několik přístupů, a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (102, 103). Pro hodnocení průběhu tohoto komplexního děje lze využít metody i) morfologické, ii) histologické či iii) molekulárně biologické, přičemž molekulární analýza je z uvedených metod nejcitlivější a umožňuje např. *in situ* hybridizací detekovat cílenou sekvenci DNA nebo použitím qRT-PCR prokázat míru exprese sledovaného genu. V našich experimentech jsme k detekci a identifikaci změn v kožní tkáni po lokální aplikaci MDOC™ použili morfologickou analýzu k makroskopickému posouzení charakteru uzavírání ran. Dále byla provedena klasická světelná mikroskopie za pomoci základního histologického barvení ke zjištění lokalizace a zastoupení buněk, zhodnocení charakteru granulační tkáně, množství kolagenu, popř. i nově vytvořených cév a nakonec imunohistochemická analýza, kterou jsme sledovali změnu exprese specifických prozánětlivých markerů (TNFRI, CCR2, TGF- $\beta$  RII) v jednotlivých fázích procesu hojení.

Ke studiu akutního hojení kožních ran jsme zvolili model laboratorního potkana kmene Wistar. Tento zavedený experimentální zvířecí druh je využíván především pro svoji dostupnost, nenáročnou manipulaci i ekonomický benefit (71, 104) a v neposlední řadě také pro v mnoha aspektech shodnou fyziologii hojení a histologickou stavbu kůže s člověkem (101). Jeho hlavní nevýhodou je přítomnost kožní svalové struktury tzv. *panniculus carnosus*, která samovolně přispívá ke kontrakci rány (105), čímž proces hojení urychluje. Zánětlivý proces je u potkana aktivován ihned po poranění s kulminací kolem třetího dne (77), pak přechází ve fázi proliferace s tvorbou granulační tkáně, která dosahuje maxima mezi pátým až šestým dnem, tedy časněji v porovnání s hojením u člověka (104, 101). Fáze remodelační je

zahájena šestý den po poranění (17), zatímco u lidí je počátek v řadě experimentálních studií popisován až kolem sedmého dne (106).

Akutní rány představují běžná poranění kožní tkáně, která mohou vznikat různým např. mechanickým, chemickým poškozením nebo také při zdravotnických zákrocích. Řada publikací týkajících se časného hojení ran na modelu potkana preferuje pro analýzu časový interval v rozmezí třetího až čtrnáctého dne, který zahrnuje všechny kulminační fáze hojení a tedy nejdůležitější morfologické a histologické změny (107, 101, 104).

V našem experimentu jsme sledovali vliv jednorázově lokálně aplikované MDOC™ resp.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  soli PAGA. Studie byla provedena na čtyřech experimentálních a jedné kontrolní skupině zvířat. V oblasti šíje byla zvířatům vytvořena centrální rána o průměru 1,5 cm. Makroskopickým hodnocením a histologickou analýzou se však nepodařilo zjistit žádné významné rozdíly po aplikaci jednotlivých forem MDOC™ v porovnání s kontrolní skupinou. Mírný rozdíl byl pozorován po aplikaci práškové formy a gelu, kdy bylo úplné uzavření defektu v porovnání s kontrolní skupinou časově prodlouženo, což ale nemělo žádný vliv na výsledné zhojení rány do jizvy. Studovaný přípravek působil již v iniciační fázi procesu hojení hemostatickým efektem. Tento efekt byl také v *in vitro* studii potvrzen autory Masová et al., kteří sledovali vliv MDOC™ na aktivaci trombocytů a rychlost zahájení hemostázy (108). V naší studii bylo úplné hemostázy dosaženo během dvou až čtyř minut po aplikaci jakékoli formy studovaného přípravku, což bylo o několik minut méně v porovnání s kontrolou. Tento efekt mohl pravděpodobně působit příznivě i v následných fázích hojení, jak uvádí *in vitro* provedená studie autorů Harta et al., kteří sledovali chemoatraktivní vliv oxidované regenerované celulózy v kombinaci s kolagenem (109). Výsledky jeho studie potvrdily také efekt lokálně aplikované celulózy na proliferaci fibroblastů prostřednictvím proteinů a produktů hydrolýzy uvolňovaných při degradaci tohoto materiálu v místě postižení. A dále přímý účinek celulózy na rekrutment zánětlivých buněk, zejména makrofágů, což následně vedlo ke zvýšení produkce zánětlivých cytokinů a růstových faktorů a urychlovalo proces hojení (109).

Zastoupení buněk zánětlivého infiltrátu neutrofilních granulocytů, lymfocytů a makrofágů po aplikaci MDOC™ při spodní hranici hemoragické krusty a dále v dermis, poukazuje na významnou úlohu těchto buněk v iniciaci procesu hojení, jak také dokládají publikované výsledky histologického hodnocení na obdobném modelu hojení ran (102, 101). Větší množství makrofágů v dermis v sedmém dnu po poranění bylo pozorováno u MDOC™ ve formě textilie, což lze vysvětlit chemoatraktivním účinkem oxidované celulózy (109). Nejvyšší epidermální kryt defektu včetně vysokého zastoupení epidermálních buněk byl



patrný u práškové formy MDOC™. Ve vytvořené extracelulární matrix jsme u kontrolní skupiny v sedmém dnu po poranění pozorovali velké množství fibroblastů a organizovaných kolagenních vláken, zatímco u MDOC™ skupin bylo velké zastoupení těchto buněk patrné až čtrnáctý den.

Imunohistochemickou analýzou exprese vybraných zánětlivých markerů nebyl taktéž potvrzen žádný významný efekt MDOC™ na hojení kožních ran. Ve shodě s publikovanými výsledky podobných imunohistochemických studií Tiana a dalších autorů na experimentálních zvířecích modelech (110, 65, 102, 66) byla prokázána exprese TNFRI v makrofázích, lymfocytech a endotelových buňkách v časně fázi hojení, třetí den a dále v sedmém dnu po poranění u obou skupin zvířat bez rozdílů. Exprese TNFRI byla zaznamenána také v migrujících bazálních keratinocytech (66), což je ve shodě s naším zjištěním (sedmý den u obou skupin zvířat). Ve čtrnáctém dnu byla v prostředí ECM patrná exprese TNFRI také v proliferujících fibroblastech, přičemž intenzita histologického barvení byla obdobná u obou skupin. *In vitro* provedené studie potvrdili chemotaktický účinek tohoto faktoru také na fibroblasty, které jsou aktivovány a poté proliferují (26). Tento efekt je pravděpodobně způsoben produkovaným IL-6 fibroblasty, který je považován za významný autokrinní mediátor buněčné proliferace (111).

TGF-β je považován za důležitý faktor ovlivňující téměř všechny fáze hojení, jak ve své rešeršní studii popisuje Faler et al. (112, 60). Buněčné odpovědi vyvolané TGF-β jsou proto různorodé a někdy částečně protikladné. Tento nesoulad je dán např. druhem buňky, fází buněčného cyklu, typem receptorů atd. (59). TGF-β se uplatňuje jako významný chemoatraktant neutrofilních granulocytů, monocytů a fibroblastů (113, 114). V naší studii jsme po lokální aplikaci MDOC™ prokázali přítomnost TGF-β RII již ve třetím dnu po poranění s největší intenzitou imunohistochemického barvení v buňkách zánětlivého infiltrátu při hranici hemoragického koagula s tvořící se granulační tkání. Dále ve fibroblastech a v endotelových buňkách dilatovaných a také nově vytvořených cév, což bylo více patrné u kontrolní skupiny. Tento nálezný koresponduje s výsledky Falera a Toyokawy et al. (115), (112), kteří na modelu hojení ran u laboratorního potkana potvrdili důležitost tohoto faktoru ve stimulaci proliferace fibroblastů. Pierce et al. (113) zaznamenali na modelu laboratorního potkana po lokální aplikaci TGF-β vysoký obsah fibroblastů v ráně také v pátém dnu po poranění. V sedmém a čtrnáctém dnu po poranění byla v naší studii zachycena exprese TGF-β epidermálními buňkami u obou skupin zvířat. Tento nálezný ve své imunohistochemické analýze potvrdili také autoři Jude et al. (116), kteří prokázali největší intenzitu exprese TGF-β bazálními keratinocyty. S rozvojem procesu hojení byla sedmý den po poranění i

v naší studii zaznamenána exprese TGF-β RII také zánětlivým infiltrátem u MDOC™ skupiny a fibroblasty v prostředí ECM s větší intenzitou barvení u kontrolní skupiny. U řady experimentálních zvířecích modelů s navozeným kožním povrchovým poraněním byla aplikována exogenní forma TGF-β s pozitivními výsledky, ve smyslu zvýšení množství zánětlivého buněčného infiltrátu, podpoření procesu angiogeneze a maturace kolagenních vláken (117, 114). Výsledky studie provedené na imunodeficientních TGF-β<sup>-/-</sup> myších potvrdili toto tvrzení, a to zjištěním výrazně prodloužené doby hojení. Ve čtrnáctém dnu po poranění byla exprese TGF-β RII potvrzena rovněž ve fibroblastech kontrolní skupiny, epidermálních buňkách obou skupin a také v kožních adnexech intaktních částí kůže. Lokální aplikací TGF-β byla prokázána stimulace tvorby jizvy (57) a v pozdější fázi také její kontrakce, jak ve své studii popisuje Werner a kol. (15). Tento růstový faktor stimuluje aktivované fibroblasty k produkci a ukládání proteinů ECM (především kolagenu a fibronektinu) a podporuje angiogenezi (115). Naopak inhibuje degradaci ECM potlačením syntézy matrixových metaloproteináz a nepřímo zvýšením exprese tkáňových inhibitorů metaloproteináz (118). Studie Cromacka et al. u králičího modelu akutního hojení ran naopak prokázala inhibiční účinek TGF-β v závislosti na podávané dávce v procesu reepitelizace a proliferace keratinocytů (119).

Monocytární chemotaktický protein se účastní již počáteční zánětlivé fáze hojení jako silný chemoatraktant monocytů, makrofágů a T-lymfocytů bez přímého účinku na neutrofilní granulocyty, jak uvádějí výsledky publikovaných studií (120, 121, 122). Receptor tohoto chemokinu CCR2 je exprimován cirkulujícími monocyty i makrofágy a hraje významnou roli v kumulaci těchto buněk v místě zánětlivé reakce (123). V naší experimentální studii jsme expresi CCR2 zaznamenali u kontrolní skupiny již ve třetím dnu po poranění buňkami zánětlivého infiltrátu v místě při spodní hranici krusty kryjící ránu a v sedmém a čtrnáctém dnu epidermálními a endotelovými buňkami výrazně vyjádřené reakce barvení také u MDOC™ skupin. Ve studiích autoři diskutují také možné působení MCP-1 na neutrofilní granulocyty. Frink et al. na myším modelu potvrdil, že blokování CCR2 receptoru vede k výraznému snížení infiltrace neutrofilních granulocytů v místě poranění omezením jejich rolování, adheze i transmigrace (124). Low s kolektivem ve studii na myších s delecí mutace genu pro MCP-1 potvrdil dále prodloužení procesu reepitelizace a snížení angiogeneze již v pátém dnu po poranění (125). Výrazná exprese MCP-1 byla také prokázána např. při septickém stavu u člověka nebo po podání bakteriálního lipopolysacharidu u zvířecích modelů (69). Tento chemokin hraje rovněž významnou úlohu v patogenezi onemocnění, jako jsou



parazitární infekce, alergické reakce typu pozdní přecitlivělosti, ateroskleróza či při revmatická artritida (120, 121).

Závěrem lze tedy říci, že získané výsledky histologické a imunohistochemické analýzy ukazují, že studovaný přípravek MDOC™ pravděpodobně nepřinese očekávaný benefit v pozitivním ovlivnění a urychlení procesu hojení akutní rány na potkaním experimentálním modelu. Nicméně studium procesu hojení je složité z důvodu řady kooperujících složek a cytokinů, které jsou často exprimovány několika buněčnými populacemi často i s podobnou lokalizací v postiženém místě (2, 1). V další studii je proto potřeba zaměřit se na expresi výrazně specifického markeru/znaku buněčné populace, tzn. sledovat např. specifický intracelulární CD 68 znak pro makrofágy či FSP1 marker exprimovaný populací fibroblastů.

Na místě je také pokračovat ve studiu procesu hojení a jeho ovlivnění po podání MDOC™ z pohledu analýzy proteinových spekter, která může poskytnout přesnější informace složek a jejich kooperace v procesu hojení.

## 17. Ateroskleróza

Ateroskleróza je definována jako degenerativní zánětlivé onemocnění cévní stěny s tvorbou vazivových neboli aterosklerotických plátů (126). Tento proces je charakteristický změnami v intimě arterií v důsledku hromadění lipidů, polysacharidů, krevních elementů a tvorby fibrózní tkáně. Aterosklerotický proces postihuje velké a střední arterie, ve kterých postupně vzniká aterom neboli subintimální ztlustění, jenž může vést k omezení až obstrukci krevního průtoku (127). K nejčastějším příčinám morbidity a mortality v rozvinutých zemích se stále rostoucí incidencí patří z akutních komplikací aterosklerózy především infarkt myokardu a mozková cévní příhoda (126).

### 17.1. Patofyziologie aterosklerotického procesu

Tento proces probíhá v několika stádiích, která v důsledku působení proaterogenních faktorů směřují ke vzniku klinických komplikací aterosklerózy, kterými jsou jak již bylo výše uvedeno, ischemické onemocnění postihující především srdce, mozek a dolní končetiny. Základním znakem patologického procesu vzniku aterosklerotických lézí je hromadění tukové a pojivové tkáně, což postupně vede k obstrukci cévního lumen. Zásadním krokem iniciace rozvoje tohoto procesu je dysfunkce cévního endotelu (126).

Jedna z teorií vzniku aterosklerotického plátu přičítá klíčovou úlohu přítomnosti modifikovaných (oxidovaných) LDL-částic a buněk monocytomakrofágového systému (128). Riziko vzniku a progresu aterosklerózy vzrůstá se zvýšenou koncentrací a klesající velikostí plazmatických LDL, které jsou ukládány pod endotel stěny arterie a vazbou na subendoteliální proteoglykany a kolagen jej poškozují. OxLDL jsou rozpoznávány scavengerovými receptory makrofágů (129) a fungují jako chemoatraktans pro další monocyty a podporují syntézu MCP-1, endoteliální expresi P-selektinu a adhezních molekul VCAM-1 i ICAM-1. Tyto faktory a děje vedou k aktivaci dalších cirkulujících monocytů a T-lymfocytů, které se dostávají do prostředí intimy cév. Zvýšené titry oxLDL protilátek jsou pravděpodobně odrazem aktivity makrofágů ve tvořícím se aterosklerotickém plátu (130).

Další fáze aterosklerotického procesu je charakteristická postupem leukocytů do subendotelového prostoru, které jsou zpomaleny v pohybu a na poškozeném endotelu se tzv. rolují (131) pomocí interakcí lektinových receptorů a selektinů (132). Později vzniká vazbou adhezních molekul VCAM-1, ICAM-1 s  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_2$  integriny pevné spojení mezi leukocyty a buňkami endotelu. Monocyty se v intimě cévy působením růstových faktorů (např. EDGF, M-CSF) transformují v makrofágy (133), které pomocí scavenger receptorů rozeznávají



oxLDL, přičemž dochází k intracelulární kumulaci esterů cholesterolu a vznikají tzv. pěnové buňky (134). Nashromážděné pěnové buňky vytváří nejranější typ aterosklerotické léze označovaný jako tzv. lipidní proužkování (fatty streaks) (134). Tento typ lézí se nachází již ve velké míře u dětí a dospívajících jedinců (126). Makrofágy uvolňují MCP-1, který zesiluje chemotaktický proces. PDGF, dále monocytární růstový faktor (MDGF) a zánětlivé IL-1 $\beta$  a IL-8 podporují proliferaci a migraci hladkých svalových elementů. TNF- $\alpha$  spolu s IL-1 $\beta$  zvyšuje expresi adhezních molekul VCAM-1 a ICAM-1. Na druhou stranu produkují tyto buňky TNF- $\alpha$  a INF- $\gamma$ , které inhibují proliferaci hladkých svalových buněk (133).

Hladké svalové buňky přestupují do intimy cévy, kde se váží prostřednictvím VCAM-1 a ICAM-1 molekul na endotelové buňky, makrofágy a leukocyty a produkují zde složky ECM (kolagen a elastin). V lézích je zastoupena také složka vláknitá s převahou kolagenu (typ I., III., a V., IV.), který výrazně přispívá k růstu plátu a zužování cévního lumen (126). V další fázi aterosklerózy dochází k transmigraci hladkých svalových buněk z medie do intimy a proliferaci ECM a vytvoření fibromuskulárního typu aterosklerotické léze.

Od počátku rozvoje aterosklerózy až po vznik fibromuskulárního plátu se může ATS vyvíjet dvěma směry (126). V případě, že aterogenní faktor přestane působit, dojde k regeneraci endotelových buněk, které postupně obnoví svou funkci. Tento náález je typický a prokazatelný např. u dětí (135). Naopak vytvořením nekrotického lipidového jádra ve střední části léze, formováním fibromuskulární čepičky na povrchu a ukládáním vápenatých iontů dochází k vytvoření tzv. pokročilé aterosklerotické léze, která se označuje jako ateromový plát. Pokročilé aterosklerotické léze jsou potenciálně vždy nebezpečné, protože často vedou ke stenóze cévy. Pokud se propustnost cévy zmenší pod 15% dochází k projevům ischemie, nejčastěji anginy pectoris. Ke vzniku trombu může dojít buď při erozi endotelu, nebo při ruptuře plátu (126).

Druhá teorie tzv. chronického poškození endotelu se opírá o fakt, že působení různých mechanismů vede k jeho dysfunkci, která je spojena s adhezí a agregací destiček, chemotaxí monocytů a také aktivovaných T lymfocytů. Zvýšená exprese PDGF podporuje migraci buněk hladké svaloviny z medie do intimy, kde se tyto buňky dělí, syntetizují kolagen a proteoglykany a vytvářejí fibrózní plát (126). Závěrem lze shrnout, že existují dvě hlavní hypotézy vzniku aterosklerotického procesu, které spolu vzájemně souvisejí.

## 18. Adhezní molekuly a jejich role v aterosklerotickém procesu

Adhezní molekuly jsou látky proteinového charakteru exprimované na povrchu téměř všech tkání (136). Účastní se regulace fyziologických dějů, jako je embryogeneze, buněčný růst a diferenciacce, hojení ran či obnova tkání. Podílí se také na interakci buněk s okolním prostředím a zprostředkováním přenosu signálů mezi jednotlivými elementy. Dle struktury je lze dělit na selektiny, integriny, immunoglobulinovou skupinu a kadheriny. V následujícím textu jsou popsány vybrané studované molekuly VCAM a ICAM o kterých je pojednáno také v experimentální části.

### 18.1. Immunoglobulinová skupina adhezních molekul

Imunoglobulinová rodina adhezních molekul zahrnuje rozsáhlou skupinu povrchových znaků leukocytů. Jedná se o látky glykoproteinového charakteru složené z beta řetězců opakujících se Ig-G domén. Podílí se na zprostředkování homofilních interakcí, tzn. vazby adhezní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu ve druhé buňce a také heterofilních interakcí, tedy vazby adhezní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce. Patří zde celá řada zástupců, např. antigenně specifické receptory T a B lymfocytů TCR, BCR, koreceptory T lymfocytů CD4 a CD8, které jsou důležité pro jejich správnou funkci při imunitních reakcích.

Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou nejvýznamnějšími zástupci vaskulární buněčná adhezní molekula-1 (VCAM-1), intercelulární buněčná adhezní molekula-1 (ICAM-1) a destičková buněčná adhezní molekula-1 (PECAM-1). Z hlediska struktury jsou VCAM-1, ICAM-1 transmembránové glykoproteiny obsahující N-konec, sérii Ig domén, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. Podílí se na stabilizaci vazby leukocytů k endotelu a podporují jejich diapedézu. VCAM-1 i ICAM-1 jsou exprimovány endotelovými buňkami, makrofágy a hladkými svalovými buňkami (137). Experimentální zvířecí studie prokázaly, že VCAM-1 je endotelovými buňkami exprimován ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů, a to v oblastech které jsou predispoziční ke vzniku lézí, přičemž lokalizace těchto míst je často ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi (především shear stresem). ICAM-1 je exprimován ve stejných oblastech jako VCAM-1, ale exprese ICAM-1 je pozorována i v oblastech s nízkou pravděpodobností výskytu aterosklerotických lézí. U malých aterosklerotických lézí je VCAM-1 i ICAM-1 exprimován především endotelovými buňkami, přičemž VCAM-1 je exprimován i hladkými svalovými buňkami, které přiléhají k aterosklerotické lézi. U pokročilejších aterosklerotických lézí je VCAM-1 i ICAM-1



exprimován většinou buněk, které se nacházejí v intimě cév. Expresi těchto adhezních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy. Např. hypercholesterolemie, oxLDL a *diabetes mellitus* zvyšují expresi jak ICAM-1, tak VCAM-1. Expresi obou těchto molekul je také indukována zánětlivými cytokiny jako je TNF- $\alpha$  nebo IL-1 (133).

PECAM-1 je exprimován hlavně na leukocytech a endotelových buňkách, v menší míře i na trombocytech, ve kterých je za klidových podmínek uložen ve Weibel-Paladeho granulích (138). Umožňuje adhezi v heterofilní či homofilní interakci (139). Jelikož je exprese PECAM-1 konstitutivní a není závislá na stimulaci cytokiny, používá se tento marker k odhadu plochy cévního řečiště (140).

## 19. Myší experimentální modely v ateroskleróze

Vzhledem k etickým aspektům nelze sledovat mechanismy vzniku aterosklerózy přímo na lidské populaci, a proto se ke studiu této choroby využívá zvířecích modelů. Nejvíce používaným modelem je model myší. Existují také experimentální studie provedené na potkanech, kteří však nevykazují spontánní rozvoj aterosklerotických lézí a pro tvorbu lézí jsou kladeny i vyšší nároky na dietu. Na druhou stranu u králíků se ateroskleróza rovněž nerozvíjí spontánně bez speciální diety, ale po cholesterolové manipulaci vznikají léze v poměrně krátkém čase s vysokým obsahem tuků a makrofágů (141). Do roku 1992 se veškeré výzkumy zaměřovaly na studium aterosklerózy u prasat a primátů, což bylo z různých hledisek velmi náročné. Nicméně, během těchto výzkumů se získaly neocenitelné poznatky.

V *in vivo* experimentech je v poslední době nejrozšířenější myší model. Tento model splňuje řadu kritérií, ale i přesto je nutno zvážit hlavní rozdíly mezi myším a lidským organismem, jako je např. velikost, váha, průměrná délka života i významné odlišnosti v lipidovém spektru. U člověka je většina plasmatického cholesterolu (až 75 %) transportována pomocí LDL částic. Myši nemají cholesterylester transfer protein (CETP), a proto se kolem 70% celkového cholesterolu nachází v HDL, který má u člověka naopak protektivní účinek, což může být hlavním faktorem rezistence myší k rozvoji aterosklerózy. Naopak velkou výhodou myších modelů je možnost účelně měnit vnější podmínky při experimentování či různě uzpůsobit dietu. Snadné a hospodárné je také získat a udržovat příslušný druh z důvodu krátkého reprodukčního období myší, které trvá přibližně 9 týdnů.

Normální myši (Wild type) nevyvíjejí aterosklerotické léze spontánně, ale pokud jsou některé jejich kmeny, např. C57Bl6 krmeny dietou obohacenou o cholát a cholesterol, dochází k rozvoji atypických aterosklerotických lézí typu tukových proužků. Tato situace není příliš srovnatelná s lidskou, navíc myši trpí vlivem podávání cholátu chronickým zánětem. Proto se dnes účelně využívají transgenní myší kmeny, které vytvářejí léze buď spontánně (apoE KO myši vyšlechtěné a popsané v roce 1992) anebo po indukci tukovou dietou (LDL KO myši vyšlechtěné a popsané v roce 1993) (142).

Jako první byl úspěšně vytvořen kmen s vyřazením genu pro apolipoprotein E (apoE knock out, *apoE-KO*) (142). Apo-E deficientní myši jsou v současnosti asi nejčastěji používaným experimentálním modelem ke studiu aterosklerózy (143). Vyvíjejí těžkou hypercholesterolemii spojenou s pokročilou aterosklerózou i po podání standardní nízkotukové diety (Chow diet) (144). Dochází u nich také k rozvoji fibrózních lézí, jejichž výskyt je charakteristický i u lidské populace.



Dalším myším modelem je tzv. LDL-receptor KO (*LDL rKO*) typ. Tyto myši mají genetický defekt LDL receptoru (145), což je nejlépe zdokumentovaná příčina vývoje předčasné aterosklerózy u člověka. Pokud jsou tyto myši na standardní dietě (Chow diet), nevyvíjí žádné léze nebo jen malé patologické změny. Jestliže jsou krmeny aterogenní (tukovou/cholesterolovou, Western type diet) dietou, dochází k masivnímu zvýšení hladin plazmatického cholesterolu, zejména ve frakci LDL (143). Vznikají pokročilé léze s nekrotickým jádrem, naopak fibrózní léze se nevyvíjejí. Méně publikovaných studií popisuje kinetiku a vývoj těchto lézí v proximální a distální aortě (146).

Významný model představují apoE a LDL receptor double knockout myši, (*apoE/LDLR-DKO*) s vyřazením genu pro apoE lipoprotein a pro LDL receptor. U tohoto typu je možno rozvinout závažný stupeň hyperlipidémie a aterosklerózy (147). Bylo zjištěno, že i běžná strava vede k výraznější progresi aterosklerózy než u apoE deficientních myši (148). Z toho důvodu je tento model vhodný pro studium vlivu řady antiaterogenních látek na experimentálně navozený proces aterosklerózy (143).

Křížením myši s lidským apo B<sub>100</sub> s LDL receptor deficientní myši vzniká velmi citlivý kmen (*HuBTg<sup>+/+</sup>LDLR<sup>-/-</sup>*), který díky nízkotučné dietě působí rozvoj těžké hypercholesterolemie a aterosklerózy. U tohoto modelu je plazmatický cholesterol přítomen v LDL lipoproteinových částicích (145).

Mezi další typy transgenních myších modelů patří např. apo E-Leiden model, vykazující na tukové/cholesterolové dietě rozvoj aterosklerózy i hypercholesterolemie (149).

## 20. Vybrané metody stereologie

Stereologie zahrnuje soubor metod, které se používají ke kvantifikaci dvourozměrných a trojrozměrných struktur pomocí řezů, či projekcí. Tyto metody lze např. využít k odhadu celkového objemu či plochy povrchu objektu. Využívá principů geometrické pravděpodobnosti a výsledek, který je získán není vždy přesnou hodnotou, ale pouze jejím odhadem, tzn. náhodnou veličinou (150).

Základem pro používání stereologických metod je aplikace principu nestranného systematického náhodného výběru, tzn. že se kvantifikuje pouze systematicky a náhodně vybraná část objektu, která reprezentuje celek. Praktické provedení zahrnuje zhotovení série řezů objektem, který bude kvantifikován. První řez série se vybere náhodně (pomocí generátoru náhodných čísel nebo tabulek) z celé série řezů bez ohledu na jeho strukturu. Další řezy jsou pak již vybrány vždy po určité konstantní vzdálenosti T nebo je vybrán každý x-tý řez od prvního zvoleného. Tyto řezy jsou pak použity pro odhad dané veličiny. Počet řezů a vzdálenost T mezi vybranými řezy nebo číslo x-tého řezu závisí na struktuře objektu, který se kvantifikuje a zvolené chybě měření (151).

K odhadu plochy v rovině se nejčastěji používá bodová testovací sonda (testovací mřížka). Výsledek se získá tak, že se vynásobí počet bodů testovací sítě, které protínají měřenou strukturu s konstantou mřížky, což je plocha příslušející jednomu testovacímu bodu.

$$estA = a \times P$$

*a*... parametr charakterizující testovací síť- plocha příslušející jednomu testovacímu bodu (viz obr. 7)

*P*... počet testovacích bodů protínajících měřenou strukturu

Z hlediska plánování pokusu je nutné pro získání validních výsledků respektovat určitá obecná stereologická pravidla. Experimentální skupina musí obsahovat minimálně pět jedinců, počet řezů příslušným orgánem musí odpovídat nejméně pěti, přičemž skutečný počet řezů a jejich tloušťka, tedy vzdálenost řezů od sebe se určí dle složitosti struktury (provedením předběžného pokusu). Na jeden řez by mělo být 10-20 testovacích polí a počet zásahů testovací sondy do hodnocené struktury by se měl pohybovat mezi 100-200 body (chyba odhadu kolem 5%), čím složitější struktura, tím je nutný větší počet bodů testovací sondy nutných pro kvantifikaci (152).



## 21.2. Typy dietní vlákniny

Dietní vlákninu lze rozdělit do několika tříd (celulóza, hemicelulóza, lignin, pektiny, glukany, fruktany atd.), které jsou rozdílné svými chemickými i fyzikálními vlastnostmi.

V následujícím odstavci je podrobněji popsána skupina pektinů a celulóz, které byly v našich experimentech u ApoE/LDLR deficientního myšího modelu použity ke studiu ovlivnění lipoproteinového spektra.

Celulóza obsažená v ovoci, zelenině, obilovinách a luštěninách je štěpena tzv. celulasami, které se u člověka nevyskytují. Endo-1,4- $\beta$ -glukanasa štěpí  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glykosidové vazby uvnitř molekuly za vzniku glukooligosacharidů a cellobiosy. Cellobiohydrolasa odštěpuje vazby  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) z neredukujícího konce řetězce za vzniku oligosacharidů a cellobiosy.  $\beta$ -glukosidasa odštěpuje z parciálně hydrolyzované celulosy cellobiosu a vyšší oligosacharidy hydrolyzuje na  $\beta$ -D-glukosu (155).

Pektiny tvoří základní složku rostlinných buněčných stěn. Patří do skupiny polygalaktouronátů, jejichž základní strukturní jednotkou je kyselina  $\alpha$ -D-galakturonová vázána glykosidickou vazbou, přičemž její karboxylová skupina může být metylována nebo ve formě  $\text{Ca}^{2+}$  soli. Pektiny jsou enzymaticky odbourávány ve dvou stupních, esterasy za vzniku kyseliny pektinové a methanolu a pektinasami (či polygalakturonidasami), které štěpí glykosidické vazby za vzniku pektinových kyselin s kratšími řetězci. Kvašením pektinu dochází k nejvyšší produkci SCFA. Jsou bohatě obsaženy hlavně v ovocných šťávách, a to zejména z nezralého ovoce. Zahříváním se sacharózou, případně v slabě kyselém prostředí rosolovají. Jejich hlavním zdrojem jsou např. jablka, rybíz, mrkvové kořeny, řepné odřezky atd (153).

## 22. Sledování vlivu MDOC™ na aterogenní parametry u apo-E deficientních myší

Samci apoE deficientních myší byli získáni z chovu instituce IKEM (Prof. Poledne, Praha, Česká Republika) a samice apoE/LDLR-DKO kmene C57BL/6J byly zakoupeny (Taconic Europe, Lille Skensved, Denmark) a ustájeny v prostorách firmy SEMED (Praha, Česká Republika). V pěti týdnech života byly myši odstaveny od matky a převezeny do prostor vivária Farmaceutické fakulty. Zde byly náhodně rozděleny do kontrolních a experimentálních skupin a krmeny jednotlivými typy diet ve formě speciálně upravených granulí (6 g/den). V experimentech bylo použito samců a samic o hmotnosti 15-20 gramů. V souvislosti se spotřebou potravy nebyly nalezeny žádné změny tělesné hmotnosti. Každá z myší byla chována v samostatné kleci s volným přístupem vody po celou dobu studie.

Tato studie má tři části, při kterých byly podávány následující diety:

1. standardní dieta (Chow diet) s přidavkem 50mg/kg MDOC™ u apoE deficientních myší
2. aterogenní dieta (Western diet) s přidavkem 5% MDOC™ u apoE/LDLR-DKO myší
3. aterogenní dieta (Western diet) s přidavkem 5% MDOC™ u apoE deficientních myší

**Studie č. 1:** Kontrolní skupina samců apo-E<sup>-/-</sup> deficientních myší (n=8) byla po dobu 4 týdnů po odstavení krmena standardní laboratorní dietou (Chow diet). MDOC™ experimentální skupina (n=8) byla krmena stejnou dietou s přidavkem 50 mg/kg/den MDOC™ také po dobu 4 týdnů po odstavení. Dieta byla podávána ve speciálně upravených granulích v množství 6g/den.

**Studie č. 2:** Kontrolní skupina samic apoE/LDLR deficientních myší (n=8) byla po dobu 8 týdnů po odstavení krmena aterogenní dietou (Western diet) s obsahem 21% tuku (z toho 11% nasycených mastných kyselin) a 0,15 % cholesterolu. MDOC™ experimentální skupina byla krmena stejnou aterogenní dietou s přidavkem 5% MDOC™ také po dobu 8 týdnů, v množství 6 g/den. *300 mg / den*

**Studie č. 3:** K objasnění mechanismu hypolipidemického účinku MDOC™ byla použita skupina samic apo-E<sup>-/-</sup> deficientních myší. Negativní kontrolní skupina myší (n=8) byla krmena aterogenní dietou (Western diet) s obsahem tuku 21% (z toho 11% nasycených mastných kyselin) a 0,15% cholesterolu, pozitivní kontrolní skupina (n=8) byla krmena stejnou dietou s přidavkem 5% pektinu po dobu 4 týdnů. MDOC™ skupina (n=8) byla krmena stejnou aterogenní dietou obohacenou o 5% MDOC™ po dobu 4 týdnů. Dieta byla podávána ve speciálně upravených granulích v množství 6g/den.



## 23. Objasnění mechanismu hypolipidemického efektu MDOC™ u samic kmene C57BL/6J

Modelovými zvířaty v této studii byly samice kmene C57BL/6J. Po celou dobu studie byly chovány odděleně v samostatných klecích s libovolným přístupem k pitné vodě.

### 23.1. Stanovení absorpce cholesterolu v tenkém střevě

Ve studii byly testovány tyto látky: Ezetimib (Ezetrol-Schering-Pough Brinny CO., Heist-op-den-Berg, Belgie) a MDOC™ (Alltracel Ltd., Dublin, Ireland).

Laboratorní myši kmene C57BL/6J byly rozděleny do čtyř skupin po osmi:

- A. Negativní kontrolní skupina s podáním vody, bez podání vlákniny či inhibitorů cholesterolu.
- B. MDOC™ experimentální skupina s podáním MDOC™ (10 mg/den) intragastricky sondou.
- C. MDOC™ experimentální skupina s podáním MDOC™ (17 g/l) v napájecí vodě.
- D. Pozitivní kontrolní skupina s podáním 0,2 mg Ezetimibu intragastricky sondou.

Absorpce cholesterolu byla ověřena pomocí izotopově značeného  $7\text{-}^3\text{H}$  cholesterolu (M.G.P. Zlín, Česká republika) rozpuštěného v ethanolu ve směsi se smetanou (Kapucín, 10%, Bohušovice nad Odří, Česká republika). Dávka traceru činila  $5\ \mu\text{Ci}$  (tj. 185 MBq). Všem skupinám bylo sondou intragastricky aplikováno 0,3 ml traceru -  $^3\text{H}$  cholesterolu ve směsi se smetanou.

Dva dny po aplikaci sondy byla u zvířat provedena euthanasie předávkováním v parách éteru. V laboratořích Kliniky metabolické a gerontologické, Fakultní nemocnice v Hradci Králové byla provedena následující analýza. Nejprve byla stanovena extrahovatelná aktivita plné krve a homogenátu jaterní tkáně metodou scintilační spektrometrie. Krev experimentálních zvířat byla odebrána z horní duté žíly do heparinu. Do 2 ml ethanol-acetonové směsi (1:1) bylo pipetováno 500  $\mu\text{l}$  krve. Játra byla zvážena a celá zhomogenizována ve dvojnásobné hmotnosti fyziologického roztoku. Z homogenátu bylo odebráno 500  $\mu\text{l}$  a pipetováno do 2 ml ethanol-acetonové směsi (1:1). Do všech roztoků bylo přidáno 0,1 ml interního standardu  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu v dávce 50 nCi. Vzorky krve a jaterních homogenátů byly extrahovány na rotátoru po dobu 10 min a poté centrifugovány (1900 rpm, teplota  $4^\circ\text{C}$  po dobu 10 minut). Aceton-ethanolový extrakt byl stáhnut, poté bylo přidáno 150  $\mu\text{l}$  nasyceného vodného roztoku hydroxidu sodného. V termobloku probíhala po dobu 60 minut alkalická hydrolyza při teplotě  $50^\circ\text{C}$ . Po ochlazení vzorků bylo přidáno 1,5 ml

redestilované vody a 1 ml toluenu. Na rotátoru byly vzorky extrahovány a poté opět centrifugovány za stejných podmínek. Nakonec byl odebrán 1 ml horní organické vrstvy, který byl smísen se scintilačním roztokem SLD-41. Kapalinovým scintilačním spektrometrem byly stanoveny výsledné hodnoty dpm (decomposition per minute), které po přepočtu odpovídají účinnosti absorpce značeného cholesterolu v gastrointestinálním traktu. Stanovené hodnoty byly přepočteny na Bq (dpm/60) a po kompenzaci interním standardem a přepočtu na celkové množství krve myši a hmotnost jater byl vypočten zlomek zachycené dávky traceru. Výsledky byly porovnány pomocí softwaru SigmaStat (Systat Software, Inc. Point Richmond, CA, USA).

### 23.2. Objasnění mechanismu účinku MDOC™ v tenkém střevě

Samice myšního kmene C57BL/6J byly rozděleny do tří skupin. Kontrolní skupině (n=8) byla podávána aterogenní dieta obsahující 0,15% cholesterolu po dobu 8 týdnů (6g/den). V MDOC™ skupině (n=8) byla podávána stejná dieta obohacená o 5% MDOC™ (6g/den). V pektinové skupině (n=8) (Danisco a.s., Smiřice, Česká republika), která byla považována za pozitivní kontrolu byla podávána stejná dieta s přidavkem 5% pektinu (6g/den).

### 23.3. Zhodnocení schopnosti fermentace přípravku MDOC™

Pro posouzení vlivu MDOC™ na fermentaci *in vivo* a pro správnou interpretaci jejího účinku na trávicí ústrojí byla použita metoda stanovení koncentrace methanu, jednoho z konečných produktů fermentace vlákniny v tlustém střevě. Koncentrace methanu ve vydechovaném vzduchu experimentálních zvířat byla určena pomocí plynové chromatografie a plameno-ionizační detekce (analyzátor MicoFID, Photovac, Perkin-Elmer, Norwalk, CT USA). Experimentální skupina myši byla porovnána se skupinou myši, kterým byl za stejných podmínek podáván pektin (Danisco a.s., Smiřice, Česká republika).

K posouzení vlivu MDOC™ na proces fermentace *in vitro* byl použit kultivační dávkovací systém při  $37^\circ\text{C}$ , který se skládal z roztoku stopových prvků, zásobního roztoku pufu, finálního roztoku a příslušného substrátu. Analýza byla provedena z trusu potkanů (kmene Wistar), přičemž fermentační schopnost MDOC™ byla srovnána s fermentací pektinu (pozitivní kontrola) a celulózy (negativní kontrola). Finální roztok pro kultivaci obsahoval vždy 40 ml zásobního roztoku pufu, 4 ml roztoku stopových prvků, 800 mg substrátu (MDOC™, pektin, celulóza). Tento roztok byl přes noc uskladněn v lednici při  $2\text{-}8^\circ\text{C}$ . Druhý



den se každá láhev nechala samostatně probublávat 15 minut oxidem uhličitým za přesně daných podmínek a v souladu s udržení anaerobního prostředí. Poté se láhve vložily do termostatu (37 °C). Mezitím se vzorky trusu zhomogenizovaly, vytvořilo se inokulum (1/4 trus a 3/4 fyziologický roztok). U jednotlivých kontrolních a experimentální skupiny byl po dobu 24 hodin měřen vznikající plyn. pH vzorku se stanovilo na začátku a na konci pokusu. Po 24 hodinách byl experiment ukončen.

#### 23.4. Určení celkové dietní vlákniny v přípravku MDOC™

V současné době je preferovaná metoda dle Asociace analytických chemiků (AOAC, 991.43). V této analýze byl 1g vysušeného testovaného vzorku vlákniny (v duplikátu) podroben postupnému enzymatickému trávení (firmemní kit Megazyme, Ireland, 2005). Tzn. vzorek byl povařen s tepelně stabilní  $\alpha$ -amylázou s cílem hydrolytického štěpení a depolymerizace škrobů. Poté byl inkubován s proteázou za účelem solubilizace a depolymerizace proteinů. Ve finální fázi byl podroben reakci s amiloglukosidázou za hydrolyzy škrobů a vzniku glukózy. Vzniklý roztok se poté precipitoval s 95% alkoholem za vzniku rozpustné vlákniny. Vzniklé reziduum bylo zfiltrováno, promyto ethanolem a acetonem, vysušeno a zváženo. Jeden z duplikátů byl použit pro stanovení zastoupení proteinů a druhý byl zpopelněn. Výsledná hodnota celkové dietní vlákniny byla rozdílem hmotnosti zfiltrovaného a vysušeného zbytku a hmotnosti proteinů a zbytků po zpopelnění.

#### 23.5. Stanovení eliminace žlučových kyselin ve stolici

Koncentrace žlučových kyselin byla stanovena spektrofotometricky po proběhlé enzymatické reakci (Bile Acid Kit 450, Trinity Biotech Co., Wicklow, Ireland). Myší trus u MDOC™ i kontrolní pektinové skupiny byl sbírán před počátkem podávání diety bohaté jak na MDOC™, tak na pektin a poté v intervalu čtyř týdnů. Celkově analýza probíhala z pěti měření.

#### 23.6. Stanovení celkového cholesterolu v játrech

Ke zjištění celkového obsahu cholesterolu byla tkáň jater zhomogenizována a extrahována po dobu 16 hodin ve směsi chloroform:methanol. Poté byla přidána 2% kyselina dihydrogenfosforečná a roztok byl zcentrifugován. Organická fáze byla odstraněna a podrobena kondenzaci v přítomnosti dusíku. Celkový obsah cholesterolu v játrech byl stanoven pomocí komerčního kitu (Pliva-Lachema, Brno, Česká republika).

#### 23.7. Statistické zhodnocení

Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (střední chyba) 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u MDOC™ a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že  $p \leq \alpha$ , kde  $\alpha=0,05$ . K výpočtu byl použit GraphPad Prism software (verze 5.0).

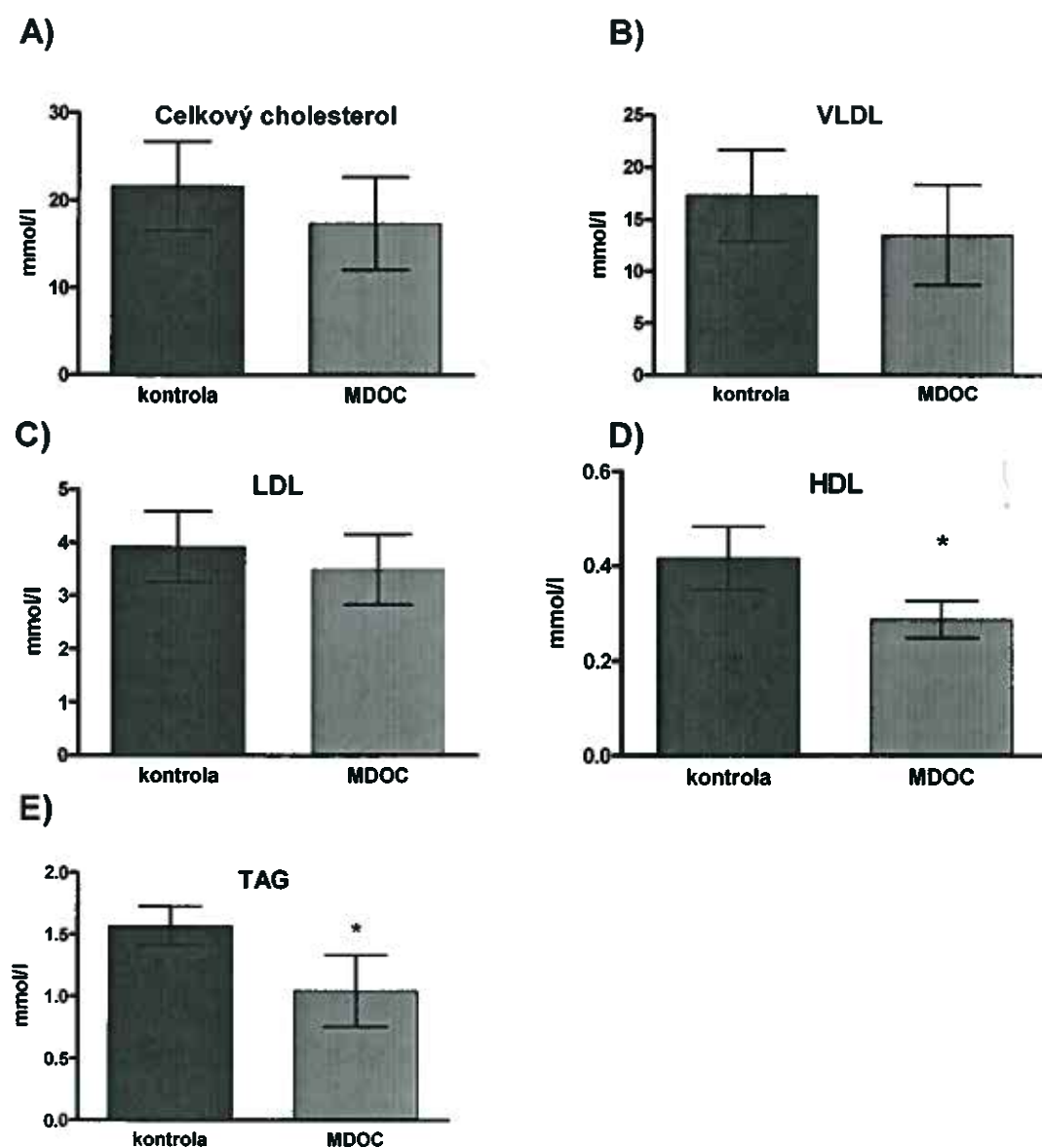


## 24. Výsledky sledování vlivu MDOC™ na aterogenní parametry u myších modelů aterosklerózy

### 24.1. Výsledky studie po podání 50 mg/kg/den MDOC™ ve standardní dietě u apo-E deficientních myší.

#### Biochemická analýza

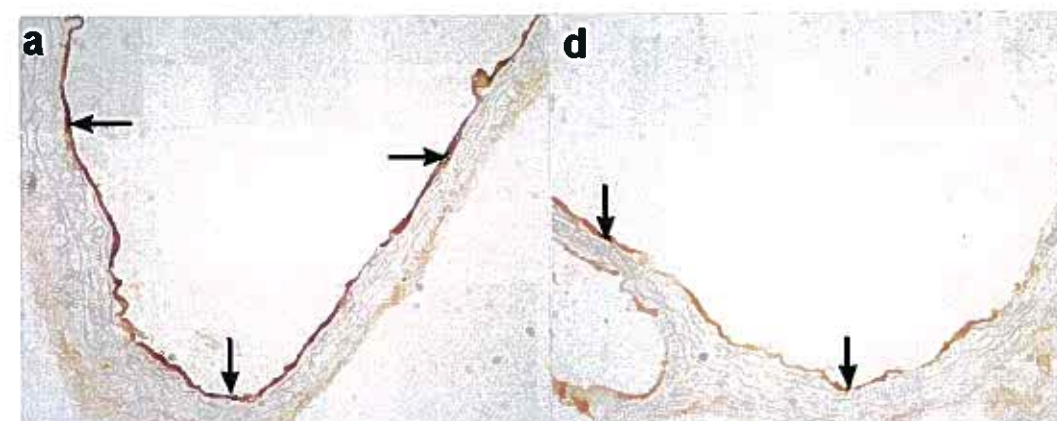
**Graf 1. Podání 50 mg/kg/den MDOC™ ve standardní dietě po dobu čtyř týdnů u apo-E deficientních myší.** Podáním této dávky MDOC™ došlo k nesignifikantnímu snížení hladiny celkového cholesterolu ( $p = 0,332$ ) (Graf A), VLDL cholesterolu ( $p = 0,334$ ) (Graf B), LDL cholesterolu ( $p = 0,438$ ) (Graf C) v porovnání s kontrolní skupinou, které byla podávána standardní dieta. Další výsledky ukazují signifikantní snížení hladiny HDL cholesterolu ( $p = 0,022$ ) (Graf D) ve srovnání s kontrolní skupinou. Hladina triacylglycerolů (Graf E) byla také po podání MDOC™ snížena významně ( $p = 0,038$ ) oproti kontrole.



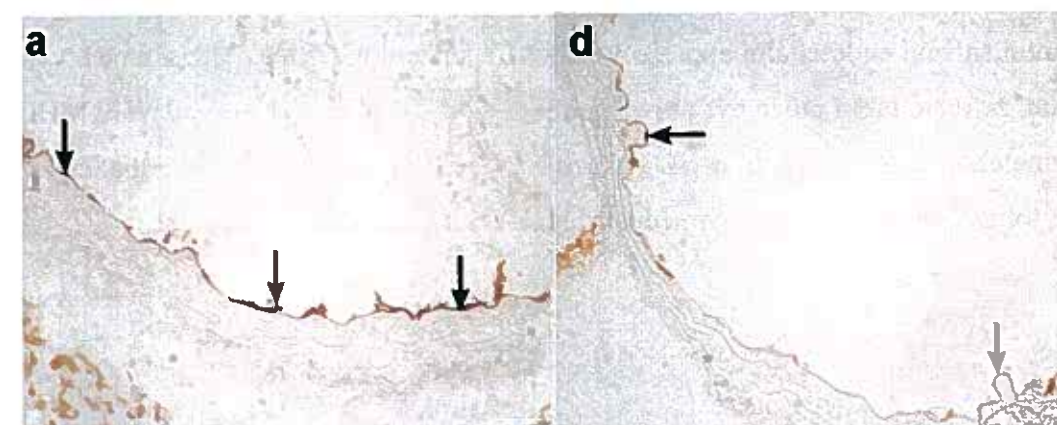
#### Imunohistochemická analýza

V oblasti aortálního sinu či oblouku nebyly u žádné z myší v experimentu nalezeny aterosklerotické léze nebo jiné morfologické abnormality. Expres Von Willebrandova faktoru byla zjištěna u obou skupin v endotelových buňkách. Tato protilátka byla použita jako standard pro detekci intaktního endotelu, neboť její exprese není změnami hladin cholesterolu nijak ovlivněna. Expres adhezních molekul VCAM-1 a ICAM-1 byla pozorována převážně v endotelu aorty, a to u obou skupin zvířat. Expres adhezní molekuly ICAM-1 byla u obou skupin silnější v porovnání s adhezní molekulou VCAM-1. Krátkodobým podáváním MDOC™ (50mg/kg/den) po dobu čtyř týdnů došlo k významnému snížení exprese adhezních molekul ICAM-1 i VCAM-1 ve sledovaném úseku aorty, v porovnání s kontrolní skupinou (Obr. 40. a, d; Obr. 41. a, d).

**Obr. 40 Imunohistochemické barvení endoteliální exprese ICAM-1 v kořenu aorty.** Výsledky imunohistochemické analýzy prokázali intenzivnější expresi ICAM-1 adhezní molekuly u kontrolní skupiny (a) v porovnání s experimentální MDOC™ skupinou (d). Origin. zvětšení 200x.



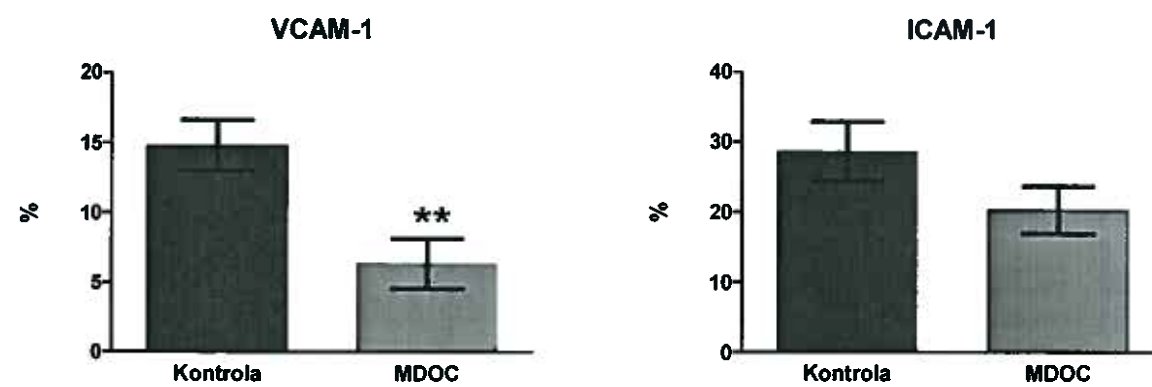
**Obr. 41 Imunohistochemické barvení endoteliální exprese VCAM-1 v kořenu aorty.** Výsledky imunohistochemické analýzy poukazují na intenzivnější expresi VCAM-1 u kontrolní skupiny (a) v porovnání s experimentální MDOC™ skupinou (d). Origin. zvětšení 200x.



Stereologická analýza exprese VCAM-1 a ICAM-1

Pro celkové zhodnocení stereologie byla použita exprese von Willebrandova faktoru v endotelu aorty, ke které byla vztažena exprese adhezních molekul VCAM-1 a ICAM-1. Stereologická analýza potvrdila silnější expresi ICAM-1 v porovnání s VCAM-1 u obou skupin zvířat. Exprese VCAM-1 (Graf 2) a také exprese ICAM-1 (Graf 2) byla po podání MDOC™ významně snížena v porovnání s kontrolní skupinou.

**Graf 2. Plocha exprese adhezní molekuly VCAM-1 a ICAM-1 v aortálním oblouku.** Endoteliální exprese VCAM-1 byla po podání 50 mg/kg/den MDOC™ významně snížena v porovnání s kontrolní skupinou. Exprese ICAM-1 po podání přípravku byla snížena také, ale ne nijak významně.



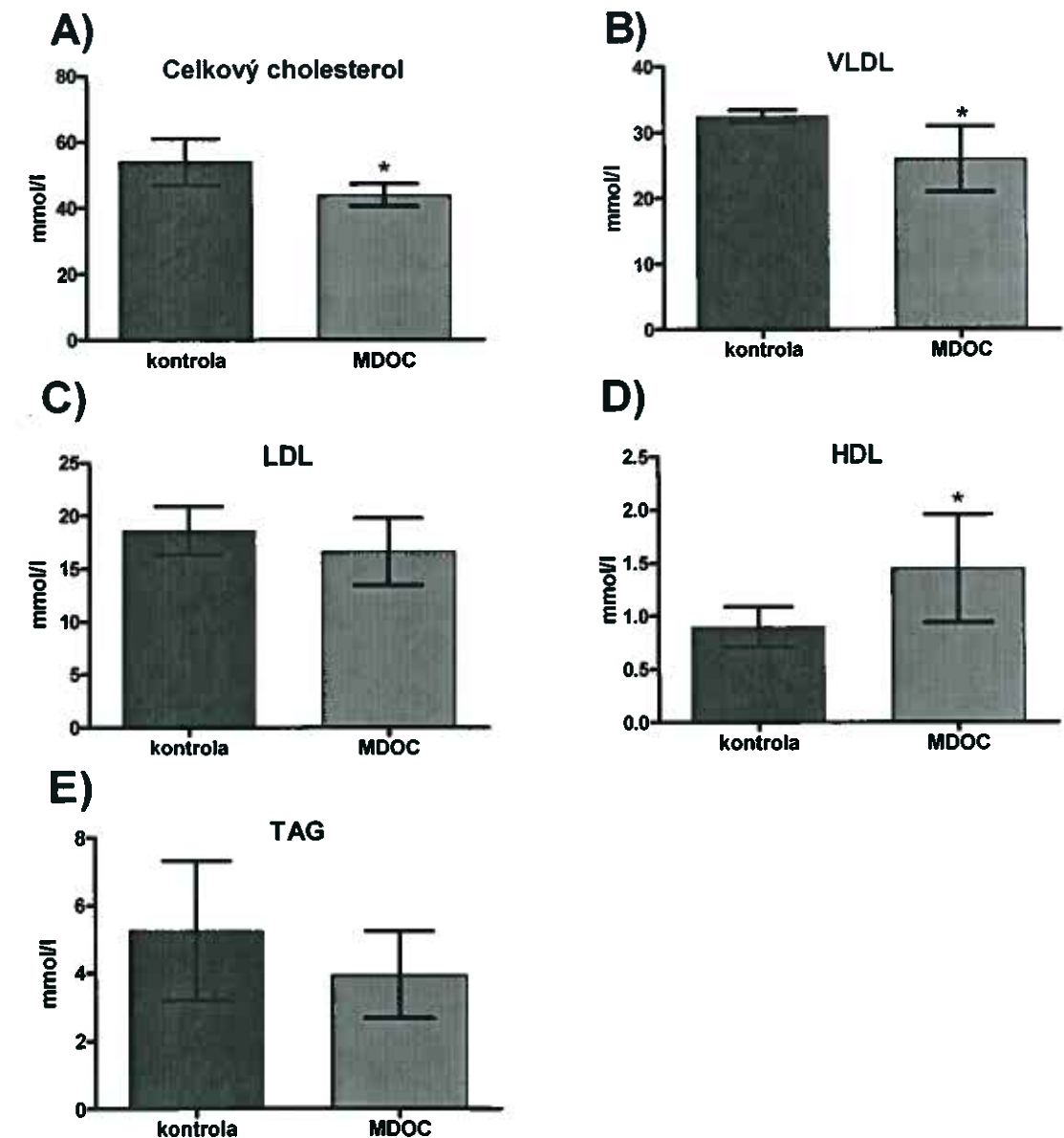
Závěr

Krátkodobé podávání standardní diety (Chow diet, čtyři týdny) obohacené o MDOC™ v dávce 50mg/kg/den apoE-deficientním myším vedlo k mírnému hypolipidemickému účinku tohoto přípravku v porovnání s kontrolní skupinou zvířat. Stereologickou analýzou imunohistochemického barvení bylo u zvířat, kterým byla podávána MDOC™ prokázáno signifikantní snížení endoteliální exprese VCAM-1 a snížení ICAM-1. Ze získaných výsledků usuzujeme, že tento efekt může být pravděpodobně výraznější po delším podávání MDOC™, protože metabolismus lipidů u myší vykazuje pomalejší obrat, tzn. že doba čtyř týdnů podávání tohoto přípravku může být nedostačující.

24.2. Výsledky studie po podání 5% MDOC v aterogenní dietě u apoE/LDLR DKO deficientních myší.

Biochemická analýza

**Graf 3. Podání 5% MDOC™ spolu s aterogenní dietou po dobu osmi týdnů u apoE/LDLR deficientních myší.** Po podání této dávky MDOC™ spolu s aterogenní dietou došlo k signifikantnímu snížení hladiny celkového cholesterolu (Graf A) ( $p=0,0338$ ) a také VLDL (Graf B) ( $p=0,0110$ ) cholesterolu. Hladina LDL (Graf C) a TAG (Graf E) lipoproteinové frakce byla nevýznamně snížena v porovnání s kontrolní dietou. Po podání MDOC™ došlo také k signifikantnímu zvýšení HDL (Graf D) ( $p=0,0172$ ) cholesterolu.





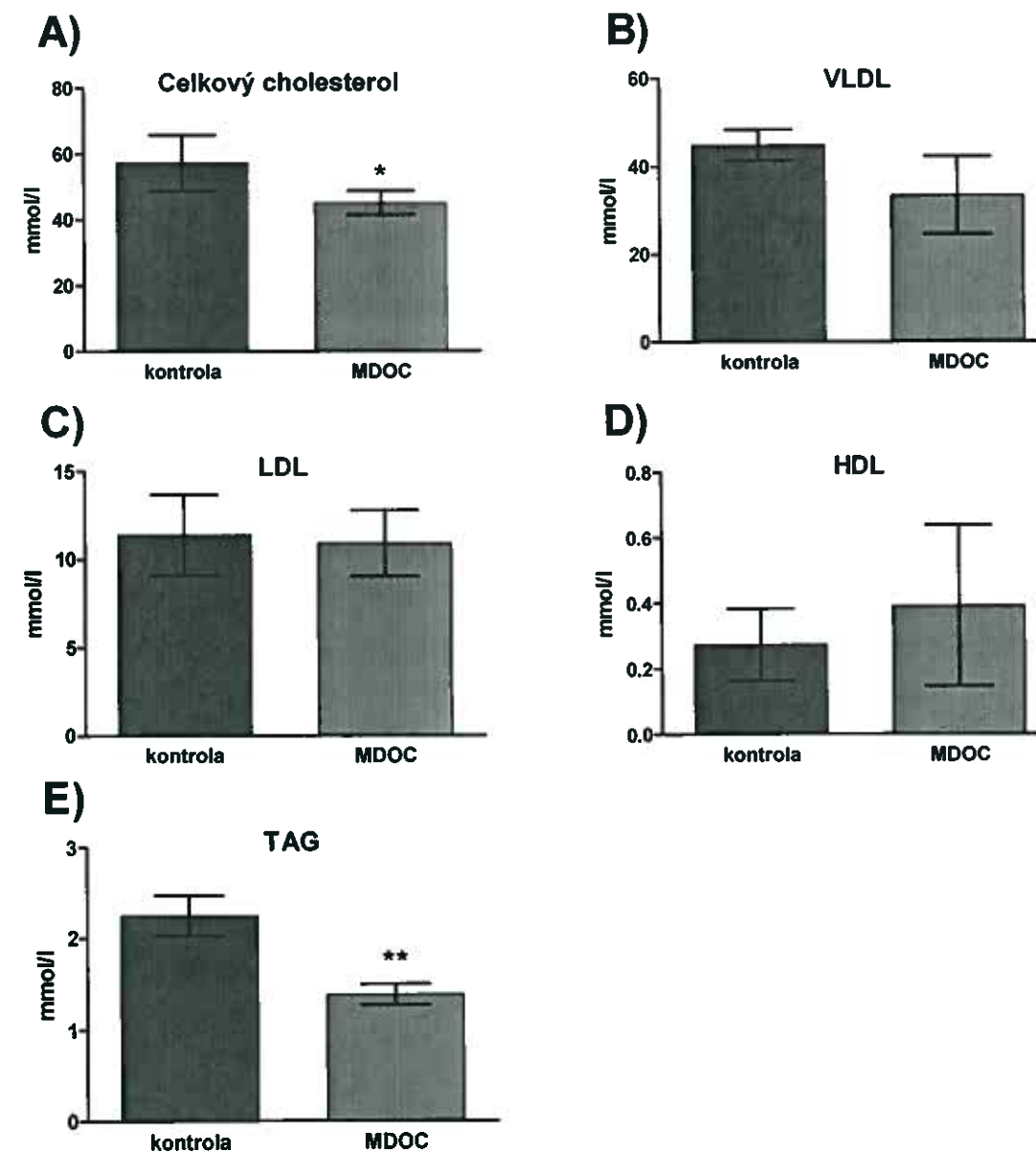
Závěr

Osmi týdenní podávání 5% MDOC™ v aterogenní dietě apoE/LDLRKO deficientním myším vedlo k signifikantnímu snížení hladiny celkového cholesterolu a VLDL v porovnání s kontrolní skupinou. Po podání studovaného přípravku MDOC™ došlo také k významnému zvýšení hladiny HDL lipoproteinové frakce. Hladina LDL a TAG nebyla po podání MDOC™ nijak významně ovlivněna.

24.3. Výsledky studie po podání 5% MDOC v aterogenní dietě u apoE deficientních myší kmene C57BL/6J

Biochemická analýza

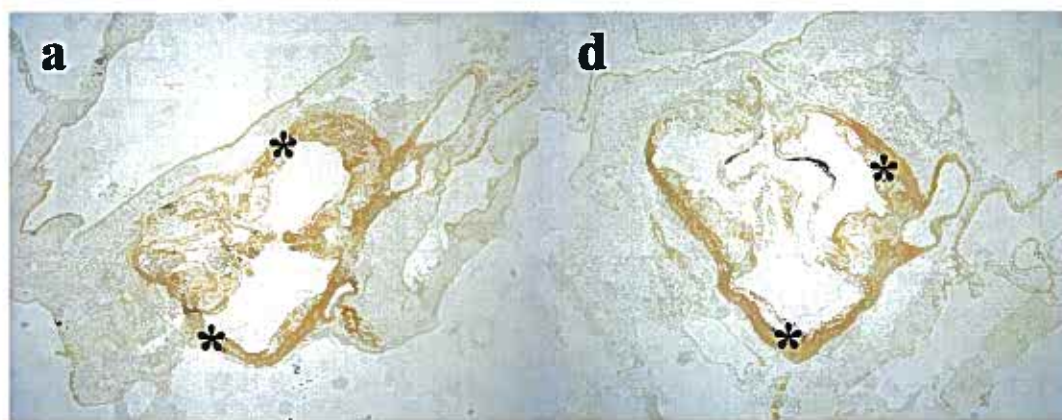
Graf 4. Podání 5% MDOC™ spolu s aterogenní dietou po dobu osmi týdnů u apoE deficientních myší. Po podání 5 % MDOC™ spolu s aterogenní dietou došlo k signifikantnímu snížení hladiny celkového cholesterolu (Graf A) ( $p=0,048$ ) a také TAG (Graf E) ( $p=0,005$ ). Hladina VLDL (Graf B) a LDL (Graf C) lipoproteinové frakce byla nevýznamně snížena v porovnání s kontrolní dietou. Po podání MDOC™ došlo také ke zvýšení HDL (Graf D) cholesterolu.



Imunohistochemická analýza

Expres VCAM-1 byla pozorována v kontrolní i MDOC™ skupině. Silná intenzita barvení byla patrná zejména v medii cév pod aterosklerotickými pláty. Dále v aterosklerotických plátech a na cévním endotelu v oblasti plátu i mimo něj (Obr. 42). Barvení VCAM-1 bylo u obou studovaných skupin velmi podobné z hlediska lokalizace a částečně také intenzity.

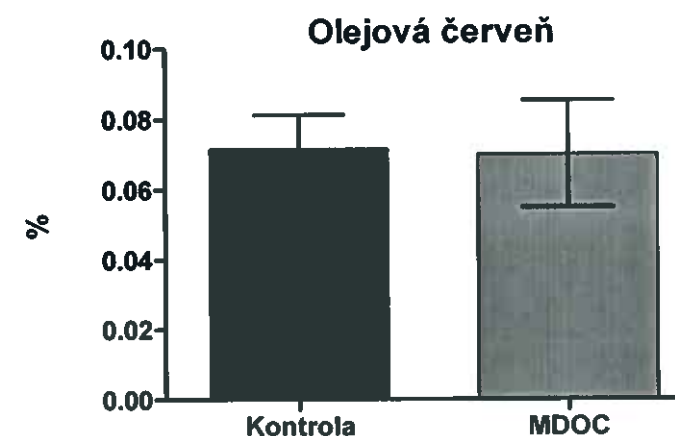
Obr. 42 Imunohistochemické barvení VCAM-1 exprese u kontrolní a MDOC™ skupiny. Silná exprese VCAM-1 u kontrolní skupiny (a) je patrná v medii cévy pod aterosklerotickým plátem, v plátu a na cévním endotelu (\*). Expres VCAM-1 u MDOC™ (d) je z hlediska lokalizace velmi podobná jako u kontrolní skupiny. Zvětšení 100x.



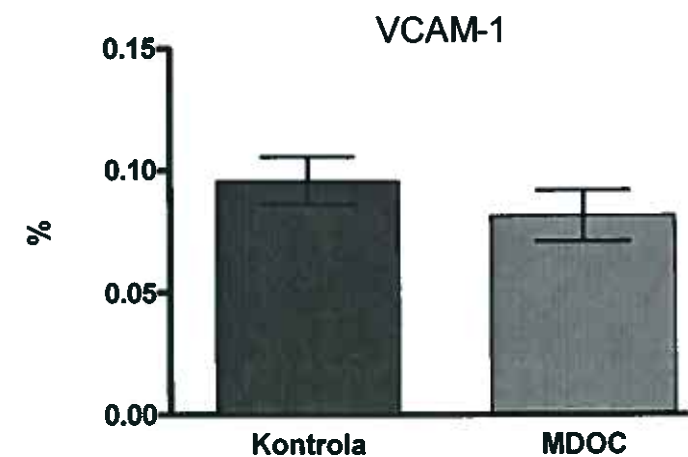
Stereologická analýza histologického barvení olejovou červení a exprese VCAM-1

Stereologická analýza prokázala, že 8 týdenní podávání 5% MDOC™ neovlivnilo velikost aterosklerotických plátů, což bylo posuzováno velikostí plochy barvení olejovou červení (Graf 5.). Kvantitativní stereologická analýza endoteliální exprese VCAM-1 v aortálním sinu byla vztažena k expresi PECAM-1 na endotelu, který vyjadřuje 100%-ní přítomnost endoteliálních buněk. Výsledky tedy vyjadřují procento aktivovaných buněk barvených VCAM-1. Ani zde nebyl prokázán vliv podávání MDOC™ na expresi VCAM-1 (Graf 6.).

Graf 5. Stereologická analýza velikosti plochy barvení olejovou červení. Podávání 5% MDOC™ po dobu osmi týdnů neovlivnilo velikost aterosklerotických plátů.



Graf 6. Expres plochy adhezní molekuly VCAM-1 v aortálním sinu. Podávání 5% MDOC™ po dobu osmi týdnů vedlo ke statisticky nevýznamnému snížení exprese VCAM-1 v porovnání s kontrolní skupinou.





Závěr

Osmítýdenní podávání 5% MDOC™ v aterogenní dietě apoE deficientním myším vedlo k signifikantnímu snížení hladiny celkového cholesterolu a TAG v porovnání s kontrolní skupinou. Snížení hladiny celkového cholesterolu a TAG ovšem nijak neovlivnilo velikost aterosklerotických plátů. Stereologická analýza také prokázala nesignifikantní snížení exprese VCAM-1 po podávání MDOC™.

## 25. Výsledky objasnění mechanismu hypolipidemického efektu

### MDOC™ u samic myšího kmene C57BL/6J

#### 25.1. Stanovení absorpce cholesterolu v tenkém střevě metodou kapalinové scintilační spektrometrie s užitím <sup>3</sup>H-cholesterolu

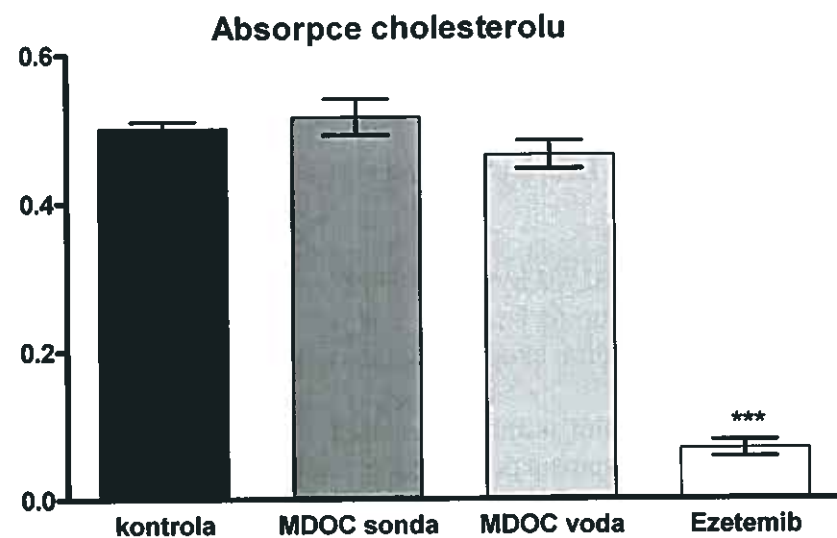
V experimentech byly použity samice myšího kmene C57BL/6J. V následující studii byly testovány tyto látky: Ezetimib (Ezetrol-Schering-Pough Brinny CO., Heist-op-den-Berg, Belgie) a MDOC™ (Alltracel Lab, Dublin, Ireland).

Laboratorní myši kmene C57BL/6J byly rozděleny do čtyř skupin:

- A. Negativní kontrolní skupina bez podání vlákniny či inhibitorů cholesterolu.
- B. MDOC™ experimentální skupina s podáním MDOC™ (10 mg/den) intragastricky sondou.
- C. MDOC™ experimentální skupina s podáním MDOC™ (17 g/l) v napájecí vodě.
- D. Pozitivní kontrolní skupina s podáním 0,2 mg Ezetimibu intragastricky sondou.

MDOC™ podávaná v napájecí vodě a intragastricky sondou neovlivnila signifikantně absorpci cholesterolu v tenkém střevě u myšího modelu kmene C57BL/6J. V porovnání s kontrolní skupinou byla u Ezetimibové skupiny prokázána inhibice absorpce cholesterolu ( $P < 0.001$ ) (Graf 7.).

**Graf 7. Absorpce cholesterolu v tenkém střevě po podání MDOC™.** Podávání MDOC™ v napájecí vodě a intragastricky sondou významně neovlivnilo absorpci cholesterolu ve střevě u myšního kmene C57BL/6J. V Ezetimibové skupině bylo potvrzeno signifikantní snížení absorpce cholesterolu v porovnání s kontrolní skupinou. Výsledky jsou vyjádřeny procenty aplikovaných dávek. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, n = 8, \*\*\*P < 0.001.



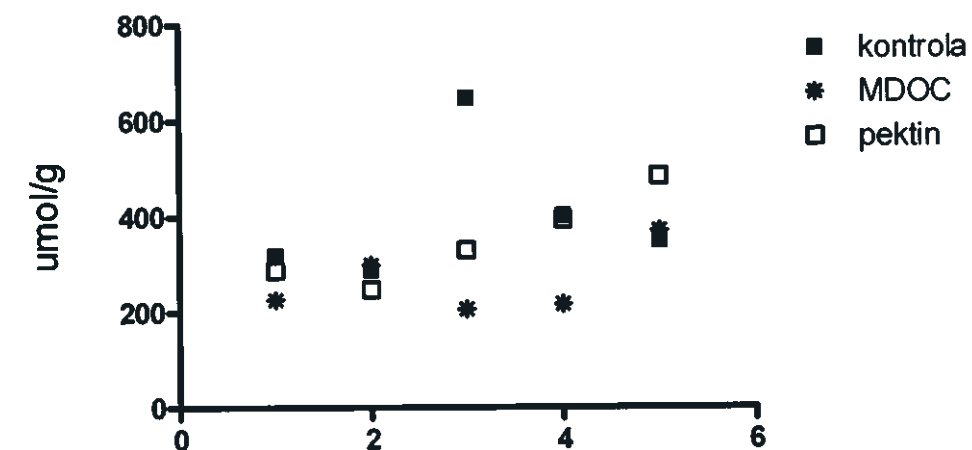
### 25.2. Určení mechanismu účinku MDOC™ v tenkém střevě

Z výsledků předchozí studie bylo potvrzeno, že podání MDOC™ neovlivňuje absorpci cholesterolu, proto jsme se dále zaměřili na vliv MDOC™ v metabolismu žlučových kyselin a v procesu fermentace v tlustém střevě. Jako pozitivní kontrola byla použita skupina myší, kterým byl podáván v potravě 5% pektin (6g/den), což je významný zástupce rozpustné dietní vlákniny s obdobnou strukturou jako MDOC™. U C57BL/6J myší po podání 5% MDOC™ (6g/den) byla stanovena eliminace žlučových kyselin, fermentace v tlustém střevě a celkový obsah cholesterolu v játrech.

### 25.3. Fotometrické stanovení množství žlučových kyselin ve stolici

V rámci této studie byl analyzován myší trus před začátkem podáváním MDOC™ či pektinu a poté každý následující týden po podání studovaných přípravků (po dobu 4 týdnů). Z celkem pěti měření nebylo po podání MDOC™ zjištěno signifikantní zvýšení vylučování žlučových kyselin ve stolici. Téměř stejné výsledky byly potvrzeny po podávání pektinu (Graf 8.).

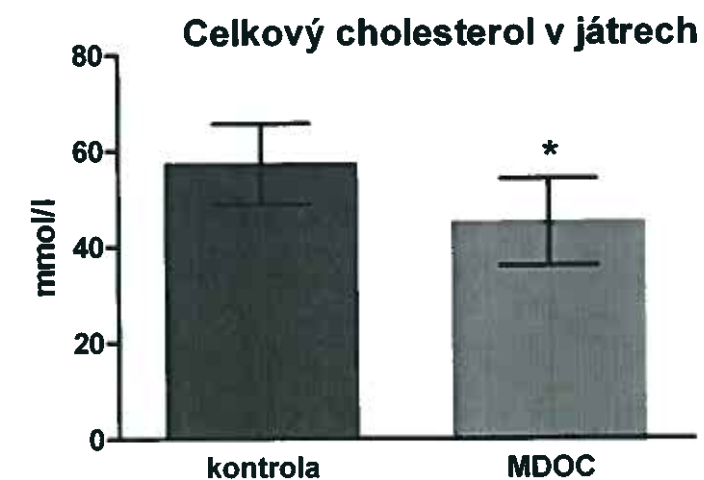
**Graf 8. Eliminace žlučových kyselin v trusu myší po podání studovaných přípravků.** Výsledky eliminace žlučových kyselin ve stolici před počátkem podávání studovaných přípravků (1. týden) a poté v následujícím týdnu (2., 3., 4., 5.) neprokázaly významné rozdíly po podání MDOC™ či pektinu v porovnání s kontrolní skupinou.



### 25.4. Stanovení obsahu cholesterolu v játrech

Podání MDOC™ a taktéž podání pektinu ( $11.28 \pm 0.84$  vs.  $7.68 \pm 0.25$ ,  $P = 0.002$ ) v dietě myšního kmene C57BL/6J významně snižuje hladinu cholesterolu v játrech v porovnání s kontrolní skupinou (Graf 9.).

**Graf 9. Stanovení obsahu cholesterolu v játrech.** Graf znázorňuje signifikantní snížení hladiny celkového cholesterolu v játrech po podání MDOC™ ( $11.28 \pm 0.84$  vs.  $8.88 \pm 0.15$ ,  $P = 0.030$ ) v dietě myšního kmene C57BL/6J v porovnání s kontrolní skupinou.





### 25.5. Vliv MDOC™ na proces fermentace in vivo

Vzhledem k citlivosti analyzátoru byla koncentrace methanu ve vydechovaném vzduchu myši měřena celkově u všech myši v experimentální či kontrolní skupině. Koncentrace methanu byla pro experimentální skupinu s pektinem 2 ppm, s MDOC™ 2 ppm a u kontrolní skupiny 1 ppm (Tab. 5).

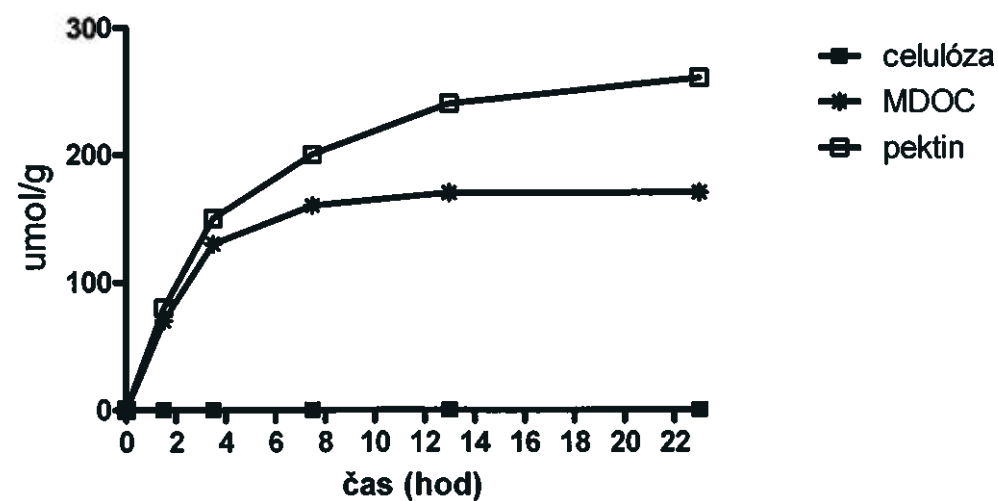
Tab. 5 Koncentrace methanu ve vydechovaném vzduchu u experimentálních a kontrolní skupiny myšního kmene C57BL/6J. (ppm z latinského pars per milion).

	CH <sub>4</sub> /ppm/
Kontrolní skupina	1
MDOC™ skupina	2
Pektinová skupina	2

### 25.6. Vliv MDOC™ na proces fermentace in vitro

Pokles naměřené hodnoty pH z 7.33 na 7.72 a 6.68 na 6.77 byl způsoben vznikajícími produkty fermentace u MDOC™ resp. pektinové experimentální skupiny. Žádné změny pH nebyly zaznamenány u kontrolní skupiny, kterým byla podávána celulóza. Produkce plyných produktů je zaznamenána v grafu 10.

Graf 10. Vliv MDOC na proces fermentace in vitro. Tento graf zachycuje časovou posloupnost vlivu MDOC™ na proces fermentace v tlustém střevě. Podání MDOC™ v dietě prokázalo 65%ní produkci plynu v porovnání s pektinovou skupinou. Žádná produkce plynu nebyla zaznamenána u skupiny myši, kterým byla podávána celulóza.



### 25.7. Určení obsahu vlákniny v přípravku MDOC™

K určení celkového obsahu dietní vlákniny byla použita metoda podle AOAC 991.43. Výsledky ukazují, že studovaný přípravek MDOC™ obsahuje  $59.78 \pm 5.0$  % vlákniny. Zjištěný nízký podíl vlákniny v tomto přípravku je pravděpodobně důsledkem nedokonalé precipitace ethanolem. Podobně je tomu např. u inulinu.

## 26. Diskuze

Ateroskleróza je závažným onemocněním, které je charakteristické degenerativním zánětem cévní stěny. K její manifestaci s postižením funkcí životně důležitých orgánů dochází nejčastěji ve středním věku. Především koronární onemocnění a ischemické cévní příhody jsou hlavní příčinou mortality a morbidit v České republice i ostatních zemí. Řada provedených intervenčních studií přispěla k osvětlení patogeneze tohoto procesu a ke zlepšení terapeutických přístupů v prevenci a léčbě (131).

Zavedením vhodného experimentálního modelu ke studiu procesu ATS se vědecké skupiny zabývají již od počátku osmdesátých let. Jako první byla použita laboratorní myš, která se však vůči rozvoji ATS jeví jako velmi rezistentní zvířecí druh. Podáváním běžné diety vykazuje nízkou hladinu celkového cholesterolu, vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu a ke vzniku aterosklerotických lézí nedochází. Podáváním diety obohacené o vysoký podíl cholesterolu, tuků a žlučových kyselin je naopak docíleno zvýšení hladiny celkového cholesterolu. Za několik měsíců jsou u vybraných kmenů detekovatelné vytvořené vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév a v okolí aortálního sinu. V porovnání s aterosklerotickými lézemi u lidí jsou tyto nálezy menší (145). Pomocí metod speciální genové technologie došlo v devadesátých letech k vytvoření myšího kmene s deficitem pro apolipoprotein E (142). Apolipoprotein E je primárně syntetizován v játrech parenchymatózními buňkami a tvoří povrchovou součást plazmatických lipoproteinů VLDL, IDL, HDL i chylomikronů, přičemž zprostředkovává jejich vazbu k LDL a LRP (LDL-receptor related protein) receptorům. U myší, které nemohou ApoE syntetizovat dochází ke zpoždění utilizace VLDL částic s následným vzestupem hladiny LDL cholesterolu a zvýšením rizika rozvoje aterosklerózy. Podáváním nízkocholesterolové stravy roste u těchto myší hladina celkového cholesterolu jako důsledek kumulace chylomikronů a VLDL zbytků obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. Asi po deseti týdnech vzniká lipidní proužkování a fibromuskulární pláty, jenž jsou typické pro aterosklerotický proces u lidských jedinců. K tvorbě těchto lézí dochází především v aortě, hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a podklíčkových arterií. Pokročilé léze jsou asi po patnácti týdnech podáváním cholesterolové stravy charakteristické přítomností pěnových a hladkých svalových buněk. Fibromuskulární pláty jsou zřetelné asi po dvaceti týdnech a obsahují nekrotické jádro s fibromuskulární čepičkou z hladkých svalových buněk, které jsou obklopeny elastickými vlákny a kolagenem. Pokročilé léze mohou podléhat destrukci buněk medie nebo u nich

mohou vznikat aneuryzmata. Rozsáhlou proliferací fibrózní tkáně dochází ke zúžení lumen cévy nebo k její úplné okluzi (161).

Mezi léčebné postupy hyperlipoproteinémií patří dietní, režimová opatření a farmakologická léčba. Dietní opatření zahrnují v první řadě snížení obsahu tuků v dietě, zvýšený přísun vlákniny či konzumaci některých vitamínů s předpokládaným antioxidačním působením. Důležitou součástí je také změna životního stylu a pravidelná fyzická aktivita. Intenzivní farmakologickou léčbou lze pak dosáhnout zastavení rozvoje aterosklerotického procesu, ale také regrese již vytvořených lézí. Postupným snižováním hladiny cholesterolu je docíleno stabilizace aterosklerotického plátu a snížení incidence ruptury (126). Hypolipidemika lze rozdělit na léky ovlivňující především cholesterol (např. statiny, pryskyřice), léky ovlivňující cholesterol a triglyceridy (např. fibráty) a dietetika s dalšími přípravky, např. s vysokým obsahem vlákniny či omega-3-mastnými kyselinami. V současné době jsou nejužívanějšími léky statiny, které působí jako kompetitivní inhibitory klíčového enzymu nitrobenčonné syntézy cholesterolu, 3-HMG-CoA reductázy, a tím snižují plazmatickou hladinu cholesterolu (126).

Dietní vláknina a její vliv na lidský organismus je předmětem biomedicínského výzkumu již mnoho let. Přestože informací o dietní vláknině neustále přibývá, přesný mechanismus jejího působení není zcela objasněn (154). Je tvořena požitelnou částí rostlinných nebo obdobných sacharidů, které jsou rezistentní k trávení a absorpci v lidském tenkém střevě s kompletní nebo částečnou fermentací ve střevě tlustém (153). Epidemiologické studie potvrzují její protektivní účinek v rozvoji řady civilizačních chorob metabolického původu i kardiovaskulárních onemocnění (162). Podáváním zejména rozpustné dietní vlákniny ve stravě u lidí i zvířat (7) byl prokázán pozitivní vliv na metabolismus cholesterolu, žlučových kyselin a také lipoproteinových částic (153, 163).

Prvním cílem našich experimentálních studií bylo ověřit potenciální hypolipidemické účinky studovaného přípravku MDOC™ na myším C57BL/6J apoE-deficientním modelu. Při studiích jsme zvířatům v předem zvoleném časovém intervalu podávali tři různé typy diety. Standardní laboratorní dieta (Chow diet) byla obohacena o 50mg/kg MDOC™ byla zvířatům podávána denně po dobu čtyř týdnů. Dále jsme ke studiu zvolili tzv. aterogenní dietu (Western type diet) s vysokým obsahem tuků a cholesterolu, která navíc obsahovala 50mg/kg MDOC™ v jedné dávce a byla zvířatům podávána také jednou za den. Jako poslední byla podávána dieta s přídatkem 5% MDOC™/den, a to po dobu osmi týdnů. Sledovali jsme především změny parametrů lipidového spektra v krvi, velikost aterosklerotických plátů a expresi buněčné adhezivní molekuly VCAM-1 ve vytvořených lézích za použití



imunohistochemických a stereologických metod. Dalším cílem bylo zjistit pravděpodobný mechanismus hypolipidemického působení a posoudit, zda lze přípravek MDOCTM řadit mezi rozpustnou dietní vlákninu.

Dietní vláknina je nedílnou součástí výživy člověka. Její fyziologický účinek závisí na velikosti a typu podaného polysacharidu (viskozitě) a na bakteriálním osídlení kolonu (schopnosti fermentace) (157). Pro pozitivní účinky má klíčový význam podíl rozpustné a nerozpustné dietní vlákniny (154). Dietetickou kvalitu vlákniny lze zhodnotit např. stanovením množství konečných produktů anaerobní fermentace po její aplikaci. Z markerů proběhlé fermentace lze stanovit např. methan ve vydechovaném vzduchu či přítomnost krátkých mastných kyselin (SCFA, zejména propionát, acetát, butyrát) ve stolici. SCFA mají důležitou úlohu v prevenci řady metabolických onemocnění (např. kolorektálního karcinomu), zejména u osob s vyšším příjmem tuků ve stravě a svou přítomností příznivě ovlivňují proliferaci a zrání kolonocytů ve střevě. Kyselina propionová dále přímo inhibuje klíčový enzym syntézy cholesterolu, HMG-CoA reduktázu (164).

Mechanismus působení dietní vlákniny je vysvětlován zejména ovlivněním absorpce cholesterolu a žlučových kyselin v tenkém střevě (157, 160). Vláknina vazbou žlučových kyselin zvyšuje jejich vylučování, obdobně jako např. iontoměničové pryskyřice přerušuje enterohepatální cyklus, čímž dochází také ke snížení syntézy cholesterolu *de novo* v játrech (165). Sekundárně je zvýšeno odbourávání cholesterolu v játrech. Vláknina se uplatňuje více mechanismy působení, z nichž jen některé jsou v současné době dostatečně prozkoumány (154).

Krátkodobým podáváním standardní laboratorní diety (Chow diet) apoE deficientním myším s přísadkou přípravku MDOCTM v množství 50mg/kg/den, jsme zjistili pouze mírný hypolipidemický účinek. Což může být důsledek nedostatečného časového intervalu v podávání diety. Hladina celkového cholesterolu byla ovlivněna mírně, hladina VLDL a LDL lipoproteinové frakce nebyla po podání MDOCTM ovlivněna nijak významně. Stereologickou analýzou imunohistochemického barvení jsme překvapivě prokázali signifikantní snížení endoteliální exprese adhezni molekuly VCAM-1. Tyto výsledky tedy naznačily pouze mírné hypolipidemické účinky MDOCTM. Tento nedostatečný efekt zřejmě souvisel s nižší dávkou MDOCTM, případně s tím, že se v dietě nepodařilo podávat cholesterol. V další studii jsme se proto zaměřili na sledování vlivu vyšší dávky MDOCTM u apoE/LDLR-deficientních myší.

Podávání 5% MDOCTM apoE/LDLR-deficientním myším spolu s aterogenní stravou (Western type) po dobu osmi týdnů, vedlo k signifikantnímu snížení hladiny celkového

cholesterolu a VLDL, která zde představuje hlavní lipoproteinovou frakci (145). U tohoto typu myšího modelu dochází k rozvoji těžké hyperlipidémie a aterosklerózy, a proto je hojně využíván ke studiu antiaterosklerotických účinků u různých typů studovaných přípravků (166). Po podání diety bohaté na MDOCTM jsme dále zjistili signifikantní zvýšení hladiny HDL cholesterolu, což je v souladu s prací autorů Frias a Sgarbieri (167), kteří dosáhli podobných výsledků na potkaním modelu po podání jiného typu rozpustní dietní vlákniny ve stravě, konkrétně guarové gumy. Řada studií provedených u lidí (168, 169, 170) i laboratorních zvířat (163, 171, 172) potvrzuje, že podáváním rozpustné dietní vlákniny ve stravě dochází k poklesu LDL lipoproteinové frakce. V naší studii jsme signifikantní snížení LDL neprokázali, nicméně důvodem může být použití výše popsaného myšího modelu, u kterého je většina cholesterolu uložena ve VLDL lipoproteinové frakci. Výsledky experimentálních prací na zvířecích modelech (153, 173) a také u lidí (162) potvrzují, že podáváním rozpustné dietní vlákniny ve stravě, dochází spolu se snížením LDL, také k redukci HDL lipoproteinové frakce. Snížení HDL cholesterolu je nežádoucím efektem, neboť snížení hladiny HDL v plazmě přímo koreluje s rizikem vzniku koronárních komplikací (174, 175).

Podávání 5% MDOCTM v aterogenní dietě apoE deficientním myším po dobu osmi týdnů vedlo k signifikantnímu snížení hladiny celkového cholesterolu a TAG v porovnání s kontrolní skupinou. Snížení hladiny celkového cholesterolu a TAG ovšem nijak neovlivnilo velikost aterosklerotických plátů. Stereologická analýza také prokázala nesignifikantní snížení exprese VCAM-1 po podávání MDOCTM.

Dalším cílem experimentálních studií bylo zjistit mechanismus hypolipidemického působení MDOCTM a posoudit, zda může být studovaná substance řazena do skupiny tzv. rozpustné dietní vlákniny. V první studii byl sledován vliv MDOCTM na absorpci cholesterolu v tenkém střevě u kmene C57BL/6J. MDOCTM podávaná v napájecí vodě a intragastricky sondou nijak neovlivnila absorpci cholesterolu v tenkém střevě v porovnání s pozitivní kontrolní skupinou, ve které byl podáván účinný inhibitor absorpce cholesterolu Ezetimib (176).

V další studii jsme použili jako pozitivní kontrolu pektin, známého zástupce rozpustné dietní vlákniny (7, 177) a sledovali jsme vliv přípravku MDOCTM na proces eliminace žlučových kyselin a fermentaci bakteriemi v tlustém střevě. Výsledky u myšího kmene C57BL/6J neprokázaly po podání zkoumaných látek žádný vliv na eliminaci žlučových kyselin. Existují však experimentální zvířecí studie, které potvrzují zvýšení exkrece žlučových kyselin po podání pektinu (178, 164). Tyto studie byly ovšem provedeny na

potkaním modelu. Na druhou stranu jsme po podání MDOC™ prokázali snížení celkového cholesterolu v játrech v porovnání s kontrolní skupinou. Tento efekt může být důsledkem snížené dodávky cholesterolových remnant do jater anebo zvýšením exkrece žlučových kyselin a cholesterolu (163). Nicméně ani jeden z uvedených mechanismů možného působení se nám v této studii nepodařilo prokázat. V další části studie jsme zjistili dvojnásobnou koncentraci methanu ve vydechovaném vzduchu u experimentálních skupin myši, tzn. po podání MDOC™ i pektinu v porovnání s experimentální skupinou, což poukazuje na zvýšenou fermentaci bakteriemi tlustého střeva po podání těchto substancí. Tyto *in vivo* experimenty ukazující na schopnost fermentace MDOC™ v tlustém střevě byl navíc potvrzen také *in vitro* metodou. Vliv dietní vlákniny na snížení hladiny cholesterolu je částečně spojován s procesem fermentace anaerobními bakteriemi tlustého střeva, jak již bylo uvedeno výše v textu. Procesem fermentace vznikají SCFA, jejichž množství závisí na konkrétním typu rozpustné dietní vlákniny. SCFA jsou přenášeny portální vénou do jater, kde dochází k jejich kompletní metabolizaci (8). Propionát inhibuje klíčový enzym syntézy cholesterolu, jaterní HMG-CoA reduktázu (158) a inhibuje syntézu cholesterolu *de novo* v játrech. Existují však studie, které snížení aktivity tohoto enzymu po podání stravy bohaté na dietní vlákninu nepotvrzují (7). Po podání dietní vlákniny byla naopak zjištěna zvýšená aktivita HMGCoA-reduktázy v důsledku snížené hladiny cholesterolu v játrech (178, 163). Je nutné dodat, že žádný z těchto efektů nebyl prokázán na myším experimentálním modelu. Z dosavadních výsledků studií u C57BL/6J myši usuzujeme, že přípravek MDOC™ zvyšuje fermentaci v tlustém střevě s následnou produkcí SCFA (zejména propionátu), které posléze inhibují syntézu cholesterolu v játrech.

Mechanismus hypolipidemického účinku působení MDOC™ může být druhově specifický, a proto je nutné v blízkém budoucnu provést srovnávací studie na jiném experimentálním modelu (např. potkan, morče). Další experimenty musí být zaměřeny na ověření mechanismu účinku MDOC™ a vlivu na aterogenní proces u pokročilejších aterosklerotických plátů či na případnou kombinaci podání s jiným hypolipidemikem. Z výsledků naší studie tedy vyplývá, že MDOC™ je fermentabilní substance a mechanismus hypolipidemického účinku je pravděpodobně obdobný jako u rozpustné vlákniny.

## 27. Souhrn

Nehojící se rána je velmi často nežádoucí komplikací řady onemocnění a cílem léčby je proto dosáhnout v co nejkratším čase funkční reparace. V současné době je preferováno ošetřování na bázi vlhké terapie, které je na trhu zastoupeno velkým množstvím obvazových materiálů. Tato krytí mají řadu pozitivních schopností, např. udržet v ráně vlhké prostředí, vytvořit optimální pH, eliminovat prozánětlivé faktory a zvýšit lokální koncentraci růstových působků (84). V klinické praxi se do popředí dostávají zejména hydrofilní materiály, jako jsou karboxycelulóza či jiné polysacharidy samostatně nebo v kombinaci např. s kolagenem. Ty mohou být moderními technologiemi zpracovány do textilní formy, která je při aplikaci na ránu schopná zabránit následné infekci. Navíc je známo, že absorbují sekret z rány a dále podporují migraci a proliferaci zánětlivých buněk, tvorbu ECM a angiogenezi. Přispívají tím tedy k obnovení porušené rovnováhy mezi reparačními a degradačními procesy v ráně, čímž hojící proces příznivě ovlivňují (56).

V naší studii jsme testovali nový přípravek, jehož základem je mikrodispergovaná oxidovaná celulóza (MDOC™), patent irské firmy Alltracel, která se v medicíně používá jako biokompatibilní zcela resorbovatelné hemostatikum. Je to kopolymer složený z opakujících se jednotek polyanhydroglukuronové kyseliny (PAGA) a polyanhydroglukózy. Jedná se materiál s nízkou toxicitou, který se používá ve formě spreje, gelu, prášku a textilie (87, 4). Neutralizací COO<sup>-</sup> skupin ionty Ca<sup>2+</sup> a Na<sup>+</sup> v požadovaném poměru získává MDOC™ nekyselý charakter a ve vodném prostředí vytváří koloidně disperzní systém či gel. Tento přípravek může být navíc využit jako polymerní nosič iontů či látek (např. antibiotik), což bylo během naší experimentální činnosti také zohledněno.

Náš experimentální model prokázal, že krátkodobé podávání MDOC™ Apo-E<sup>-/-</sup> deficientním myším má mírný protizánětlivý a hypolipidemický účinek. Z hlediska rozvoje aterogeneze byla pomocí řady experimentálních analýz intenzivně studována problematika adhezivních molekul, které jsou zásadní pro vstup leukocytů do intimy poškozených cév a udržení permeability endotelu. V dalších experimentech jsme se proto podrobně zaměřili na sledování parametrů lipidového spektra a expresi adhezivních molekul VCAM-1 a ICAM-1, po podání přípravku MDOC™ v dietě, na myším apo-E deficientním (E<sup>-/-</sup>) modelu aterosklerózy. A dále jsme zjišťovali možný mechanismus hypolipidemického působení tohoto přípravku.



Pro lepší přehlednost byla předkládaná disertační práce rozdělena na část zabývající se testováním efektu lokálně aplikovaného přípravku MDOC™ u experimentálně navozeného akutního zánětu kůže na modelu laboratorního potkana a prasete domácího a dále na studium vlivu perorálně podávaného přípravku MDOC™ na hladiny lipidů a aterogenezi u myššího modelu aterosklerózy.

Konkrétními cíli bylo:

1. Posoudit vliv lokálně aplikovaného přípravku MDOC™ v procesu akutního hojení kožních poranění na modelu laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) pomocí světelné mikroskopie.
2. Porovnat účinnost jednotlivých forem MDOC™ (prášek, sprej, gel a textilie).
3. Sledovat případnou změnu exprese vybraných prozánětlivých markerů a zhodnotit dynamiku hojení v jednotlivých fázích s využitím imunohistochemických metod.
4. Na velkém laboratorním zvířeti (*Sus scrofa domestica*) vytvořit model tržně zhmožděné kožní rány, pomocí světelné mikroskopie identifikovat kvalitativní a kvantitativní změny v jednotlivých fázích procesu hojení po lokální aplikaci PAGA v kombinaci s gentamicinem a ověřit účinnost PAGA u ranných infekcí vyvolaných bakteriálními kmeny (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*).
5. Studovat potenciální hypolipidemické účinky MDOC™ u apoE-deficientních myší sledováním parametrů lipidového spektra v krvi a velikosti aterosklerotických plátů a exprese buněčné adhezí molekuly VCAM-1 v těchto lézích pomocí imunohistochemických a stereologických metod.
6. Zjistit možný mechanismus hypolipidemického působení MDOC™ a posoudit, zda může být tato substance řazena do skupiny tzv. rozpustné vlákniny.

Ve studii provedené na modelu laboratorního potkana byl sledován vliv jednorázové lokální aplikace MDOC™ na akutní hojení rány. K detekci a identifikaci změn v kožní tkáni jsme použili makroskopickou analýzu, a to konkrétně k posouzení charakteru uzavírání ran. Dále byla provedena klasická světelná mikroskopie za pomoci základního histologického barvení ke zjištění lokalizace a zastoupení buněk, pak zhodnocení charakteru granulační tkáně, množství kolagenu, popř. i nově vytvořených cév a nakonec imunohistochemická analýza, kterou jsme sledovali změnu exprese specifických prozánětlivých markerů (TNFRI, CCR2, TGF-β RII) v jednotlivých fázích procesu hojení. Získanými výsledky (ve třetím, sedmém a čtrnáctém dnu po poranění) se však nepodařilo zjistit žádné významné rozdíly po

aplikaci jednotlivých forem MDOC™ v porovnání s kontrolní skupinou. Mírný rozdíl byl pozorován po aplikaci práškové formy a gelu, kdy bylo úplné uzavření defektu v porovnání s kontrolní skupinou časově prodlouženo, což ale nemělo žádný vliv na výsledné zhojení rány do jizvy. Studovaný přípravek působil již v iniciální fázi procesu hojení hemostatickým efektem, který mohl pravděpodobně působit příznivě i v následných fázích hojení. Zastoupení buněk zánětlivého infiltrátu, tzn. neutrofilních granulocytů, lymfocytů a makrofágů po aplikaci MDOC™ při spodní hranici hemoragické krusty a dále v dermis, poukazuje na významnou úlohu těchto buněk v iniciaci procesu hojení. Větší množství makrofágů v dermis v sedmém dnu po poranění bylo pozorováno u MDOC™ ve formě textilie, což lze vysvětlit chemoatraktivním účinkem oxidované celulózy. Nejvyšší epidermální kryt defektu včetně vysokého zastoupení epidermálních buněk byl patrný u práškové formy MDOC™. Dále jsme ve vytvořené extracelulární matrix u kontrolní skupiny v sedmém dnu po poranění pozorovali velké množství fibroblastů a organizovaných kolagenních vláken, zatímco u MDOC™ skupin bylo velké zastoupení těchto buněk patrné až čtrnáctý den.

Imunohistochemickou analýzou exprese vybraných zánětlivých markerů nebyl taktéž potvrzen žádný významný efekt MDOC™ na hojení kožních ran. Ve shodě s publikovanými výsledky podobných studií byla prokázána exprese TNFRI v makrofázích, lymfocytech a endotelových buňkách v časně fázi hojení, třetí den a dále v sedmém dnu po poranění u obou skupin zvířat bez rozdílu. Expese TNFRI byla zaznamenána také v migrujících bazálních keratinocytech a ve čtrnáctém dnu v prostředí ECM, dále v proliferujících fibroblastech, přičemž intenzita histologického barvení byla obdobná u obou skupin. Dále jsme po lokální aplikaci MDOC™ prokázali přítomnost TGF-β RII již ve třetím dnu po poranění s největší intenzitou imunohistochemického barvení v buňkách zánětlivého infiltrátu při hranici hemoragického koagula a tvořící se granulační tkáň. Dále ve fibroblastech a v endotelových buňkách dilatovaných a také nově vytvořených cév, což bylo více patrné u kontrolní skupiny. S rozvojem procesu hojení byla sedmý den po poranění i v naší studii zaznamenána expese TGF-β RII také zánětlivým infiltrátem u MDOC™ skupiny a fibroblasty v prostředí ECM s větší intenzitou barvení u kontrolní skupiny. Ve čtrnáctém dnu po poranění byla expese TGF-β RII potvrzena rovněž ve fibroblastech kontrolní skupiny, epidermálních buňkách obou skupin a také v kožních adnexech intaktních částí kůže. Expresi CCR2 jsme zaznamenali u kontrolní skupiny již ve třetím dnu po poranění buňkami zánětlivého infiltrátu v místě při spodní hranici krusty kryjící ránu a v sedmém a čtrnáctém dnu epidermálními a endotelovými buňkami výrazně vyjádřené reakce barvení také u MDOC™ skupin.

V pilotní studii na modelu akutního hojení trzně zhmžděné infikované rány byl sledován vliv lokálně aplikované PAGA v kombinaci s gentamicinem (Alltracel company, Ireland). Na spodinu ran u prasete domácího byly v den operace aplikovány konkrétní bakteriální kmeny a studovaný přípravek. V makroskopickém hodnocení studovaného přípravku se výrazně projeví hlavní pozitivní vlastnosti, tzn. biokompatibilita a schopnost kompletní resorpce v sedmém dnu po operaci. U kontrolní skupiny s aplikovaným Garamycinem Schwamm® byla doba vstřebání prodloužena zejména u infikovaných ran, které ještě sedmý den vykazovaly známky infekce. Nicméně mikroskopickým vyšetřením zjištěná přítomnost bohaté granulační tkáně, infiltrace centra i okolí rány prozánětlivými buňkami (zejména makrofágy) i vysoký stupeň reepitelizace, angiogeneze a fibroplazie, nepotvrdila progresi procesu hojení v porovnání s kontrolní skupinou. Na základě výsledků z kultivací na krevním agaru ze sedmého dne po operaci nebyl potvrzen statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými aplikovanými agens, tzn. *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* na proces hojení u léčených ran. Pouze v případě ran infikovaných kmenem *E. coli* vykazovaly oba přípravky mírný efekt pro potlačení infekce. Mikrobiologickým hodnocením byla dále potvrzena sekundární kontaminace ran, což mohlo být způsobeno nedostatečnou vzdáleností ran a vést ke zkreslení výsledků. Pro další potvrzení vlivu tohoto plně vstřebatelného nosiče na hojící procesy v ráně je potřeba provést konfirmační studie s technologicky upravenou formou textilie a koncentrací navázaného antibiotika, popř. změnou experimentálních podmínek (větší rozestupy mezi ranami, opakovaná aplikace materiálu).

Ve studii cílené na hypolipidemický účinek MDOC™ testované na myším C57BL/6J apoE-deficientním modelu byl krátkodobým podáváním standardní laboratorní diety s přidávkou MDOC™ (50mg/kg/den) potvrzen pouze mírný hypolipidemický účinek. Hladina celkového cholesterolu byla ovlivněna mírně, hladina VLDL a LDL nebyla po podání MDOC™ ovlivněna nijak významně v porovnání s kontrolní skupinou, které byla podávána standardní dieta. Stereologickou analýzou imunohistochemického barvení bylo prokázáno signifikantní snížení endoteliální exprese adhezní molekuly VCAM-1 a snížení ICAM-1. Ze získaných výsledků usuzujeme, že tento efekt může být pravděpodobně výraznější po delším podávání MDOC™, protože metabolismus lipidů u myši vykazuje pomalejší obrat, tzn., že doba čtyř týdnů podávání tohoto přípravku může být nedostačující.

Osmítýdenní podávání 5% MDOC™ v aterogenní dietě apoE/LDLRKO deficientním myším vedlo k signifikantnímu snížení hladiny celkového cholesterolu a VLDL a zvýšení HDL v porovnání s kontrolní skupinou. A dále osmítýdenní podávání 5% MDOC™ v aterogenní dietě apoE-deficientním myším kmene C57BL/6J vedlo k signifikantnímu

snížení hladiny celkového cholesterolu a TAG v porovnání s kontrolní skupinou, což ovšem nijak neovlivnilo velikost aterosklerotických plátů. Stereologická analýza také prokázala nesignifikantní snížení exprese VCAM-1 po podávání MDOC™. U další části experimentu bylo cílem zjistit mechanismus hypolipidemického působení MDOC™ a posoudit, zda může být řazena do skupiny tzv. rozpustné dietní vlákniny. Při sledování vlivu intragastricky sondou podávané MDOC™ na absorpci cholesterolu v tenkém střevě u myšičího kmene C57BL/6J, nebyla prokázána žádná změna v porovnání s pozitivní kontrolní skupinou, ve které byl podáván účinný inhibitor absorpce cholesterolu Ezetimib. Výsledky u této kmene po podání zkoumaných látek, tzn. MDOC™ a pektinu (kontrolní skupina) neprokázaly také žádný vliv na proces eliminace žlučových kyselin. Na druhou stranu bylo po podání MDOC™ prokázáno snížení celkového cholesterolu v játrech v porovnání s kontrolní skupinou. Výsledky *in vivo* a *in vitro* experimentů poukazují také na fermentační účinek MDOC™ v tlustém střevě. Při určení celkového obsahu dietní vlákniny v MDOC™ byl zjištěn nízký podíl vlákniny, což bylo pravděpodobně způsobeno nedokonalou precipitací ethanolem.

Závěrem lze tedy říci, že získané výsledky histologické a imunohistochemické analýzy ukazují, že studovaný přípravek MDOC™ pravděpodobně nepřinese očekávaný benefit v pozitivním ovlivnění a urychlení procesu hojení akutní rány na potkaním a prasečím experimentálním modelu. Dále je řadou analýz potvrzeno, že MDOC™ je fermentabilní substance s hypolipidemickým působením a s obdobným mechanismem účinku jako u rozpustné dietní vlákniny. Tento mechanismus může být druhově specifický, a proto je nutné provést srovnávací studie na jiném experimentálním modelu (např. potkan, morče).



## 28. Summary

Occurrence of hard-to-heal wound is very frequent especially in association with diseases that is why the wound care specialists are interested in rapid tissue reparation. Generally, in the wound treatment moist interactive wound healing is preferred. It is represented by various dressing products with appropriate properties. This kind of dressing helps to create moist wound environment and optimal pH, supports protection against infection, facilitates elimination of inflammatory cytokines and an increase of the local growth factors concentration. Hydrophilic materials such as carboxycellulose or other saccharides have been launched into the market as individual material or in combination e.g. with collagen. Modern textile manufacturing provides various layered textile forms exhibiting antimicrobial properties. Moreover, these materials are able to remove excess exudate from wound and support cell migration and proliferation, and moreover extracellular matrix formation together with angiogenesis which result in optimal healing.

A new substance, a patent of Alltracel laboratories (Ireland, Dublin) microdispersed oxidised cellulose (MDOC™), was employed in our study. MDOC™ is a random copolymer of polyanhydroglucose and polyanhydroglucuronic acid (PAGA) which was identified to be effectively used as a biocompatible and completely absorbable haemostatic agent. This material exhibits low toxicity and is usually used in the powder, spray, gel or textile form. No acid character is manifested due to COO<sup>-</sup> neutralization by Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> ions. MDOC™ forms in water the colloidal disperse system or gel. Further it can be also used as a polymeric ion or drug carrier (e. g. antibiotics), which was also explored in our project.

An experimental Apo-E (-/-) deficient mouse model of atherosclerosis revealed that short term administration of MDOC™ in the diet possesses mild anti-inflammatory and hypolipidemic effect. From the point of atherogenesis especially adhesion molecule were studied because these molecules are important for transendothelial leukocyte migration and for the maintenance of normal endothelial permeability. So the aim of our next project was detailed exploratory study of lipid spectrum and adhesive molecules expression (VCAM - 1 and ICAM - 1) after the MDOC™ administration in the diet in the apo-E deficient (-/-) mouse model of atherosclerosis. Moreover, we investigated the possible hypolipidemic mechanism of MDOC™ action

For the better understanding this dissertation thesis was divided into the part dealing with locally applied MDOC™ effects on the wound healing process employing the rat and pig model and into another part concerning orally applied MDOC™ effects on the lipid spectrum and atherogenesis in the mouse model of atherosclerosis.

The particular aims of this dissertation thesis were:

1. Investigate an effect of locally applied MDOC™ on acute cutaneous wound healing by light microscopy in the experimental rat model.
2. Compare the efficiency of various MDOC™ forms (powder, spray, gel, and textile variant).
3. Explore the expression of proinflammatory markers in the wound by immunostaining technique.
4. Create a pig model of infected wound healing (*Staph. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli*) and investigate changes in the healing process after the locally PAGA application in combination with ATB gentamicine by light microscopy.
5. Investigate the potential hypolipidemic effects of MDOC™ on atherogenesis in the apo-E deficient mouse model employing lipid spectrum analysis in blood and additionally carry out an expression analysis of cell adhesion molecule VCAM-1 in atherosclerotic plaques by immunostaining and stereology techniques.
6. Find out the MDOC™ mechanism of possible hypolipidemic effect and determine whether MDOC™ possesses action as a soluble dietary fiber.

In the experimental rat model we studied the locally applied MDOC™ effect on wound healing process. For skin changes detection and identification was used gross pathology, specifically for wound contraction observation. Moreover, light microscopy with basic staining was used for detection of cell localization and, abundance, granulation tissue properties or collagen mass, and finally we used immunohistochemistry technique for detection of specific markers (TNFR1, CCR2, TGF-β RII) expression changes in all phases of wound healing. However our results (obtained the third, seventh, and fourteenth day after injury) did not show any significant differences after the application of any form of MDOC™. Mild difference was observed when applying the powder and gel into the wound. In this case prolonged wound contraction but without any influence on the final scar formation was revealed. Studied substance showed haemostatic action at the beginning of experiment which might positively affect the subsequent healing phases. Localization of wound healing infiltrate (remarkable reaction) involving accumulation of neutrophils, lymphocytes and macrophages

after the MDOCTM application on the border between hemorrhagic crust and the dermis, indicated their important role in the acute wound healing phase. Mass of macrophages in the dermis were detected in the seventh day after the injury treated with the textile MDOCTM form application, which can be explained by the chemoattractive properties of any oxidised cellulose. The maximum of epidermis recreation with abundant presence of epidermal cells was seen when the MDOCTM powder form was used. Moreover, we revealed a mass of fibroblasts with organized collagen fibers in the extracellular matrix in the control group during the seventh day after the injury, while in the MDOCTM group was this observation apparent till the fourteenth day.

Immunohistochemical analysis of specific proinflammatory markers did not also confirmed any significant influence of MDOCTM substance on the wound healing process. In accordance with the similar analysis published it was proven that TNFRI expression is visible in macrophages, lymphocytes and endothelial cell during the acute healing phase in the third, seventh day in both MDOCTM treated group and the control group. Expression of TNFRI was also detected in the migrating basal keratinocytes in the ECM during the fourteenth day, in the proliferating fibroblasts without any distinct intensity in immunohistochemical staining comparing MDOCTM and control groups. Moreover, we confirmed presence of TGF- $\beta$  RII in the third day post injury in the MDOCTM treated group, whereas the most intensity of inflammatory cells reaction on the border between hemorrhagic coagulum and granulation tissue, further, TGF- $\beta$  RII was more expressed in the fibroblasts and endothelial cells of dilated vessels. During the wound healing process TGF- $\beta$  RII was also expressed by the inflammatory cells in the MDOCTM group and more intensively by the fibroblasts in the control group. In the fourteenth day this factor was also confirmed in the control group expressed by fibroblasts and additionally by epidermal cells in both groups, and in the hair follicles of intact tissue. CCR2 expression was captured in the inflammatory cells of the control group on the border of crust. Seventh and fourteenth day CCR2 expression was more pronounced in the epidermal and endothelial cells more of MDOCTM group.

PAGA with attached antibiotic gentamicine (kindly provided by Alltracel lab, Ireland) or already established Garamycin Schwamm® used as a sort of positive control, were tested in the pilot wound healing study on porcine infectious wound healing model. Wounds were created on the backs of pigs, infected with experimental inoculum of *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E. coli* and covered with studied products. Gross analysis confirmed main positive benefit of PAGA substance, which meant biocompatibility and completely resorption in the seventh day after the operation. In the control group with Garamycin Schwamm® prolonged

resorption was visible mainly in the infected wounds with signs of infection mainly the seventh day after the injury. However, light microscopy showed the granulation tissue formation, accumulation of proinflammatory cells infiltrate (mainly macrophages) in the centre and in the wound surroundings, as well as the high rate of epithelialization, angiogenesis and fibroplasia, but these results did not confirmed any wound healing progression in comparison with the control group. Statistical analysis of microbiology results acquired by CFU counting from primo cultures from seventh day after the operation did not show any significant differences among the applied microbes. Only in the *E. coli* group, both PAGA and Garamycin Schwamm® showed mild effect on infection elimination. Microbiological findings indicate the secondary wound contamination probably caused by insufficient gaps between the wounds. However other investigations must be completed to clarify precisely the effects of PAGA with attached gentamicine, e.g. studies focused on antibiotic dose precise identification, technological textile PAGA form modification or experimental conditions adjustment (bigger wound distances or changing material in the wound with respect to maintenance moist microenvironment).

After the short term administration of MDOCTM in the diet (50mg/kg/day) in the C57BL/6J apo-E deficient mouse model of atherosclerosis, was revealed only mild hypolipidemic effect. Total cholesterol level was slightly influenced and VLDL and LDL levels were not significantly changed when compared to control group with administration of standard diet. Stereological analysis of immunohistochemistry staining revealed significant decreasing of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 expression. We concluded that this effect could be probably marked after the long term MDOCTM administration, because the lipid metabolism in mice has slower turn-over, so fourth weeks administration was insufficient.

The results from apo-E/LDLRKO deficient mice showed that administration of 5% MDOCTM for eight weeks in atherogenic diet led to a significant decrease of total cholesterol and VLDL level, and increase of HDL level compared to control group. Analysis of acquired results from apo-E deficient C57BL/6J mice showed that administration of 5% MDOCTM for eight weeks with an atherogenic diet resulted in a significant decrease of total cholesterol and TAG level when compared to control group. However, total cholesterol and TAG level decrease did not influence the size of atherosclerotic lesions. Stereology also showed insignificant VCAM-1 expression after the MDOCTM administration. The aim of our next studies was to find out the possible mechanism of hypolipidemic action of MDOCTM and whether MDOCTM possesses effect as a soluble dietary fiber. Determination of MDOCTM influence on cholesterol absorption in the small intestine in C57BL/6J mice showed that this



substance did not affect this process compared with positive control (Ezetimibe group). Results also showed that neither MDOC™ nor pectin (control group as a soluble fiber) affected bile acid elimination in cholesterol-fed C57BL/6J mice. Contrary, we demonstrated that MDOC™ and pectin significantly decrease cholesterol content in the liver when compared with control animals. *In vivo* analysis revealed increased fermentation in the large intestine after the MDOC™ administration. Moreover, *in vitro* experiment showed that MDOC™ is a fermentable substance under the conditions mimicking the conditions in the large intestine. MDOC™ probably acts increase the SCFAs production, which in turns inhibits the synthesis of cholesterol in the liver. This mechanism of action is of MDOC™ may be species-/strain-specific to mice, and therefore other studies with MDOC™ in different species, e.g., rats or guinea pigs, have to confirmed to reveal other possible mechanism of hypolipidemic effect of MDOC™.

## 29. Seznam literatury

1. Singer, A. J. & Clark, R. A. (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341: 738-746.
2. Baum, C. L. & Arpey, C. J. (2005) Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 31: 674-686; discussion 686.
3. Kollar, P., Suchy, P., Muselik, J., Bajerova, M., Havelka, P. & Sopuch, T. (2008) [Hemostatic effects of oxidized cellulose]. *Ceska Slov Farm* 57: 11-16.
4. Jelinkova, M., Briestensky, J., Santar, I. & Rihova, B. (2002) In vitro and in vivo immunomodulatory effects of microdispersed oxidized cellulose. *Int Immunopharmacol* 2: 1429-1441.
5. Rysava, J., Masova, L., Dyr, J. E., Suttnar, J., Salaj, P., Dostalek, J., Myska, K. & Pecka, M. (2002) [Effect of oxidized cellulose on fibrin formation and blood platelets]. *Cas Lek Cesk* 141 Suppl: 50-53.
6. Nachtigal, P., Pospisilova, N., Pospechova, K., Jamborova, G., Kopecky, M., Jaynes, R., Briestensky, J., Santar, I., Smahelova, A. et al. (2006) MDOC and atorvastatin have potential antiinflammatory effects in vascular endothelium of apoE<sup>-/-</sup> mouse model of atherosclerosis. *Life Sci* 78: 1983-1989.
7. Fernandez, M. L. (1995) Distinct mechanisms of plasma LDL lowering by dietary fiber in the guinea pig: specific effects of pectin, guar gum, and psyllium. *J Lipid Res* 36: 2394-2404.
8. Stewart, M. L. & Slavin, J. L. (2006) Molecular weight of guar gum affects short-chain fatty acid profile in model intestinal fermentation. *Mol Nutr Food Res* 50: 971-976.
9. Trojan, S. e. a. (2003) Lékařská fyziologie.
10. Brakebusch, C., Grose, R., Quondamatteo, F., Ramirez, A., Jorcano, J. L., Pirro, A., Svensson, M., Herken, R., Sasaki, T. et al. (2000) Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. *Embo J* 19: 3990-4003.
11. Nečas, E. (2005) Přehled lékařské fyziologie.
12. Toyokawa, H., Inaba, M., Takai, S., Satoi, S., Beuth, J., Ko, H. L., Matsui, Y., Kwon, A. H., Kamiyama, Y. & Ikehara, S. (2002) Enhancement of circulating dendritic cell activity by immunomodulators (OK432 and KP-40). *Anticancer Res* 22: 2137-2145.
13. Konrádová, V., Uhlík, J. & Vajner, L. (1998) Funkční histologie. 319-335.
14. Hulín, I. (1998) Patofyziológia.
15. Werner, S. & Grose, R. (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83: 835-870.
16. Kapoor, M. C. & Ramachandran, T. R. (2004) Inflammatory Response to Cardiac Surgery and Strategies to Overcome it. *Ann Card Anaesth* 7: 113-128.

17. Li, J., Chen, J. & Kirsner, R. (2007) Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 25: 9-18.
18. Krejsek, J. & Kopecký, O. (2004) *Klinická imunologie.*: 385-405.
19. Soares, L. P., Oliveira, M. G., Pinheiro, A. L., Fronza, B. R. & Maciel, M. E. (2008) Effects of laser therapy on experimental wound healing using oxidized regenerated cellulose hemostat. *Photomed Laser Surg* 26: 10-13.
20. Pecka, M. (2002) *Laboratorní hematologie v přehledu - Buňka a krevetvorba.*: 86-154.
21. Aukhil, I. (2000) Biology of wound healing. *Periodontol* 2000 22: 44-50.
22. Garrard, C. L., Clements, R. H., Nanney, L., Davidson, J. M. & Richards, W. O. (1999) Adhesion formation is reduced after laparoscopic surgery. *Surg Endosc* 13: 10-13.
23. Pierce, G. E. (1991) Trauma surgery: every surgeon's specialty--presidential address, Western Trauma Association. *J Trauma* 31: 1575-1578.
24. Clark, R. A. (2003) Epithelial-mesenchymal networks in wounds: a hierarchical view. *J Invest Dermatol* 120: ix-xi.
25. Lorenz, H. P., Lin, R. Y., Longaker, M. T., Whitby, D. J. & Adzick, N. S. (1995) The fetal fibroblast: the effector cell of scarless fetal skin repair. *Plast Reconstr Surg* 96: 1251-1259; discussion 1260-1251.
26. Thomas, D. W. & Harding, K. G. (2002) Wound healing. *Br J Surg* 89: 1203-1205.
27. Agaiby, A. D. & Dyson, M. (1999) Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing. *J Anat* 195 ( Pt 4): 531-542.
28. Kunkel, S. L., Standiford, T., Kasahara, K. & Strieter, R. M. (1991) Stimulus specific induction of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gene expression. *Adv Exp Med Biol* 305: 65-71.
29. Sherry, B., Tekamp-Olson, P., Gallegos, C., Bauer, D., Davatelis, G., Wolpe, S. D., Masiarz, F., Coit, D. & Cerami, A. (1988) Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *J Exp Med* 168: 2251-2259.
30. Duffield, J. S. (2003) The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* 104: 27-38.
31. Xia, Z. & Triffitt, J. T. (2006) A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed Mater* 1: R1-9.
32. Lewis, J. S., Lee, J. A., Underwood, J. C., Harris, A. L. & Lewis, C. E. (1999) Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol* 66: 889-900.

33. Simone, R., Zicca, A. & Saverino, D. (2008) The frequency of regulatory CD3+CD8+CD28-CD25+ T lymphocytes in human peripheral blood increases with age. *J Leukoc Biol*.
34. Otterdal, K., Smith, C., Oie, E., Pedersen, T. M., Yndestad, A., Stang, E., Endresen, K., Solum, N. O., Aukrust, P. & Damas, J. K. (2006) Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. *Blood* 108: 928-935.
35. Feghali, C. A. & Wright, T. M. (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2: d12-26.
36. Noli, C. & Miolo, A. (2001) The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol* 12: 303-313.
37. Carvalho, B., Clark, D. J. & Angst, M. S. (2008) Local and systemic release of cytokines, nerve growth factor, prostaglandin E2, and substance P in incisional wounds and serum following cesarean delivery. *J Pain* 9: 650-657.
38. Krysl, D. (2007) [Contemporary models of experimental cerebral ischemia: photothrombosis and intracerebral application of endothelin-1]. *Cesk Fysiol* 56: 4-9.
39. Shao, R. & Rockey, D. C. (2002) Effects of endothelins on hepatic stellate cell synthesis of endothelin-1 during hepatic wound healing. *J Cell Physiol* 191: 342-350.
40. Carretero, O. A. (2005) Vascular remodeling and the kallikrein-kinin system. *J Clin Invest* 115: 588-591.
41. Stavrou, D. (2008) Neovascularisation in wound healing. *J Wound Care* 17: 298-300, 302.
42. Ferrara, N. (2000) VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 11: 617-624.
43. Nissen, N. N., Polverini, P. J., Koch, A. E., Volin, M. V., Gamelli, R. L. & DiPietro, L. A. (1998) Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 152: 1445-1452.
44. Zaja-Milatovic, S. & Richmond, A. (2008) CXC chemokines and their receptors: a case for a significant biological role in cutaneous wound healing. *Histol Histopathol* 23: 1399-1407.
45. Sporn, M. B. & Roberts, A. B. (1992) Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 119: 1017-1021.
46. Amadeu, T. P., Coulomb, B., Desmouliere, A. & Costa, A. M. (2003) Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds* 2: 60-68.
47. Moses, H. L., Yang, E. Y. & Pietenpol, J. A. (1990) TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 63: 245-247.



48. Masopust, J. (2003) Patobiochemie buňky.
49. David-Raoudi, M., Tranchepain, F., Deschrevel, B., Vincent, J. C., Bogdanowicz, P., Boumediene, K. & Pujol, J. P. (2008) Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen* 16: 274-287.
50. Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. & Eccleston, G. M. (2008) Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci* 97: 2892-2923.
51. Matsumoto, Y., Arai, K., Momose, H. & Kuroyanagi, Y. (2009) Development of a wound dressing composed of a hyaluronic Acid sponge containing arginine. *J Biomater Sci Polym Ed* 20: 993-1004.
52. Madlener, M., Parks, W. C. & Werner, S. (1998) Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res* 242: 201-210.
53. Harding, K. G., Morris, H. L. & Patel, G. K. (2002) Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *Bmj* 324: 160-163.
54. Nithya, M., Suguna, L. & Rose, C. (2003) The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing. *Biochim Biophys Acta* 1620: 25-31.
55. Iocono, J. A., Colleran, K. R., Remick, D. G., Gillespie, B. W., Ehrlich, H. P. & Garner, W. L. (2000) Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds. *Wound Repair Regen* 8: 216-225.
56. Smeets, R., Ulrich, D., Unglaub, F., Woltje, M. & Pallua, N. (2008) Effect of oxidised regenerated cellulose/collagen matrix on proteases in wound exudate of patients with chronic venous ulceration. *Int Wound J* 5: 195-203.
57. Chin, D., Boyle, G. M., Parsons, P. G. & Coman, W. B. (2004) What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? *Br J Plast Surg* 57: 215-221.
58. Hirt-Burri, N., Scaletta, C., Gerber, S., Pioletti, D. P. & Applegate, L. A. (2008) Wound-healing gene family expression differences between fetal and foreskin cells used for bioengineered skin substitutes. *Artif Organs* 32: 509-518.
59. Gojová, A. (2002) Morfologický obraz modelového poškození kardiovaskulárního systému - ateroskleróza. . Dizertační práce.: 19-21.
60. Lyons, R. M. & Moses, H. L. (1990) Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem* 187: 467-473.
61. Steed, D. L. (1997) The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am* 77: 575-586.
62. Ashcroft, G. S., Horan, M. A. & Ferguson, M. W. (1995) The effects of ageing on cutaneous wound healing in mammals. *J Anat* 187 ( Pt 1): 1-26.

63. Schmid, P., Cox, D., Bilbe, G., McMaster, G., Morrison, C., Stahelin, H., Luscher, N. & Seiler, W. (1993) TGF-beta s and TGF-beta type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds. *J Pathol* 171: 191-197.
64. Whicher, J. T. & Evans, S. W. (1990) Cytokines in disease. *Clin Chem* 36: 1269-1281.
65. Vilcek, J. & Lee, T. H. (1991) Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266: 7313-7316.
66. Sklavounou, A., Chrysomali, E., Scorilas, A. & Karameris, A. (2000) TNF-alpha expression and apoptosis-regulating proteins in oral lichen planus: a comparative immunohistochemical evaluation. *J Oral Pathol Med* 29: 370-375.
67. Kirkaldy, A. A., Musonda, A. C., Khanolkhar-Young, S., Suneetha, S. & Lockwood, D. N. (2003) Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. *Clin Exp Immunol* 134: 447-453.
68. Sozzani, S., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Zhou, D., Piemonti, L., D'Amico, G., Power, C. A., Wells, T. N. et al. (1997) Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 159: 1993-2000.
69. Yamashiro, S., Takeya, M., Kuratsu, J., Ushio, Y., Takahashi, K. & Yoshimura, T. (1998) Intradermal injection of monocyte chemoattractant protein-1 induces emigration and differentiation of blood monocytes in rat skin. *Int Arch Allergy Immunol* 115: 15-23.
70. Berger, O., Gan, X., Gujuluva, C., Burns, A. R., Suler, G., Stins, M., Way, D., Witte, M., Weinand, M. et al. (1999) CXC and CC chemokine receptors on coronary and brain endothelia. *Mol Med* 5: 795-805.
71. Brandner, J., Houdek, P. & Quitschau, T. (2006) An ex vivo model to evaluate dressings and drugs for wound healing. *EWMA journal* 6: 11-15.
72. Vardaxis, N. J., Brans, T. A., Boon, M. E., Kreis, R. W. & Marres, L. M. (1997) Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies. *J Anat* 190 ( Pt 4): 601-611.
73. Velandar, P., Theopold, C., Hirsch, T., Bleiziffer, O., Zuhaili, B., Fossum, M., Hoeller, D., Gheerardyn, R., Chen, M. et al. (2008) Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound Repair Regen* 16: 288-293.
74. Gottrup, F., Agren, M. S. & Karlsmark, T. (2000) Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair Regen* 8: 83-96.
75. Middelkoop, E., van den Bogaardt, A. J., Lamme, E. N., Hoekstra, M. J., Brandsma, K. & Ulrich, M. M. (2004) Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. *Biomaterials* 25: 1559-1567.

76. Bernatchez, S. F., Parks, P. J., Grussing, D. M., Matalas, S. L. & Nelson, G. S. (1998) Histological characterization of a delayed wound healing model in pig. *Wound Repair Regen* 6: 223-233.
77. Eming, S. A., Krieg, T. & Davidson, J. M. (2007) Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127: 514-525.
78. auf dem Keller, U., Kumin, A., Braun, S. & Werner, S. (2006) Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds. *J Invest Dermatol Symp Proc* 11: 106-111.
79. Sobotka, L. (2006) Metabolické, systémové a lokální aspekty hojení ran. *Interní Med.* 4: 182-184.
80. Schonauer, C., Tessitore, E., Barbagallo, G., Albanese, V. & Moraci, A. (2004) The use of local agents: bone wax, gelatin, collagen, oxidized cellulose. *Eur Spine J* 13 Suppl 1: S89-96.
81. Wigger-Alberti, W., Kuhlmann, M., Ekanayake, S. & Wilhelm, D. (2009) Using a novel wound model to investigate the healing properties of products for superficial wounds. *J Wound Care* 18: 123-128, 131.
82. Kumar, S., Wong, P.F., Leaper, D.J. (2004) What is new in wound healing? *Journal of medicine Science* 34: 147-160.
83. Buimer, M. G., Ankersmit, M. F., Wobbles, T. & Klinkenbijn, J. H. (2008) Surgical treatment of hidradenitis suppurativa with gentamicin sulfate: a prospective randomized study. *Dermatol Surg* 34: 224-227.
84. Gomes, B. P., Vianna, M. E., Sena, N. T., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. & de Souza Filho, F. J. (2006) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod* 102: 544-550.
85. Sobotka, L., Velebny, V., Smahelova, A. & Kusalova, M. (2006) [Sodium hyaluronate and an iodine complex--Hyiodine--new method of diabetic defects treatment]. *Vnitr Lek* 52: 417-422.
86. Shinzawa, H., Takeda, A., Sone, Y., Murashita, K. & Uchinuma, E. (2007) Wound healing process of a full-thickness skin wound model in rats. *Int Surg* 92: 63-72.
87. Alltracel pharmaceuticals plc, I., Dublin (1999) First issue of Alltracel Device Master File.: 1-36.
88. Mleziva, J. & Šňupárek, J. (2000) Polymery, výroba, struktura, vlastnosti a použití. *Sobotáles, Praha*: 336-471.
89. Krizova, P., Masova, L., Suttar, J., Salaj, P., Dyr, J. E., Homola, J. & Pecka, M. (2007) The influence of intrinsic coagulation pathway on blood platelets activation by oxidized cellulose. *J Biomed Mater Res A* 82: 274-280.

90. Masova, L., Rysava, J., Krizova, P., Suttar, J., Salaj, P., Dyr, J. E., Homola, J., Dostalek, J., Myska, K. & Pecka, M. (2003) Hemostyptic effect of oxidized cellulose on blood platelets. *Sb Lek* 104: 231-236.
91. Davidson, J. M. (1998) Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res* 290 Suppl: S1-11.
92. Ghelase, M. S., Traila, H., Margaritescu, D., Ghelase, F., Georgescu, I., Ramboiu, S. & Cartu, D. (2009) [A study of the incidence and the specific risk factors for surgical site nosocomial infections]. *Chirurgia (Bucur)* 104: 41-47.
93. Tourmousoglou, C. E., Yiannakopoulou, E. C., Kalapothaki, V., Bramis, J. & St Papadopoulos, J. (2008) Surgical-site infection surveillance in general surgery: a critical issue. *J Chemother* 20: 312-318.
94. O'Meara, S. M., Cullum, N. A., Majid, M. & Sheldon, T. A. (2001) Systematic review of antimicrobial agents used for chronic wounds. *Br J Surg* 88: 4-21.
95. Eklund, A. M., Valtonen, M. & Werkkala, K. A. (2005) Prophylaxis of sternal wound infections with gentamicin-collagen implant: randomized controlled study in cardiac surgery. *J Hosp Infect* 59: 108-112.
96. Friberg, O., Svedjeholm, R., Kallman, J. & Soderquist, B. (2007) Incidence, microbiological findings, and clinical presentation of sternal wound infections after cardiac surgery with and without local gentamicin prophylaxis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26: 91-97.
97. Anaya, D. & Dellinger, E. (2004) Novinky v prevenci infekce operační rány. *Gynekologie po promoci*: 20-31.
98. Ki, V. & Rotstein, C. (2008) Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 19: 173-184.
99. Fialova, L., Sinkorova, B. & Schmoranzova, A. (1998) [Use of Schwamm Garamycin in surgery of the hand]. *Rozhl Chir* 77: 396-398.
100. Řehák, F. (2001) Ošetření a převaz rány. *Česká chirurgická společnost JEP*.
101. Gal, P., Toporcer, T., Vidinsky, B., Mokry, M., Novotny, M., Kilik, R., Smetana, K., Jr., Gal, T. & Sabo, J. (2006) Early changes in the tensile strength and morphology of primary sutured skin wounds in rats. *Folia Biol (Praha)* 52: 109-115.
102. Haroon, Z. A., Raleigh, J. A., Greenberg, C. S. & Dewhirst, M. W. (2000) Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia. *Ann Surg* 231: 137-147.
103. Jeschke, M. G., Sandmann, G., Schubert, T. & Klein, D. (2005) Effect of oxidized regenerated cellulose/collagen matrix on dermal and epidermal healing and growth factors in an acute wound. *Wound Repair Regen* 13: 324-331.



104. Vidinský, B., Gál, P. et al. (2006) Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. *Acta Veterinaria*, Brno: 197-202.
105. Richter, G. T., Fan, C. Y., Ozgursoy, O., McCoy, J. & Vural, E. (2006) Effect of vascular endothelial growth factor on skin graft survival in Sprague-Dawley rats. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 637-641.
106. Gal, P., Vidinsky, B., Toporcer, T., Mokry, M., Mozes, S., Longauer, F. & Sabo, J. (2006) Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. *Photomed Laser Surg* 24: 480-488.
107. Medrado, A. R., Pugliese, L. S., Reis, S. R. & Andrade, Z. A. (2003) Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* 32: 239-244.
108. Šefr, R. (2007) Testování účinnosti lokálního hemostatika Traumastem Taf v onkologické chirurgii. Souhrnná zpráva - ověření účinnosti, aplikační šíře, bezpečnosti a jednoduchosti použití.
109. Hart, J., Silcock, D., Gunnigle, S., Cullen, B., Light, N. D. & Watt, P. W. (2002) The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in wound repair: effects in vitro on fibroblast biology and in vivo in a model of compromised healing. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1557-1570.
110. Tian, Y. W. & Stacey, M. C. (2003) Cytokines and growth factors in keratinocytes and sweat glands in chronic venous leg ulcers. An immunohistochemical study. *Wound Repair Regen* 11: 316-325.
111. Salomon, G. D., Kasid, A., Cromack, D. T., Director, E., Talbot, T. L., Sank, A. & Norton, J. A. (1991) The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing. *Ann Surg* 214: 175-180.
112. Toyokawa, H., Matsui, Y., Uhara, J., Tsuchiya, H., Teshima, S., Nakanishi, H., Kwon, A. H., Azuma, Y., Nagaoka, T. et al. (2003) Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 724-729.
113. Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Lingelbach, J., Masakowski, V. R., Gramates, P. & Deuel, T. F. (1989) Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2229-2233.
114. Kiritsy, C. P., Lynch, A. B. & Lynch, S. E. (1993) Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 729-760.
115. Faler, B. J., Macsata, R. A., Plummer, D., Mishra, L. & Sidawy, A. N. (2006) Transforming growth factor-beta and wound healing. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther* 18: 55-62.

116. Jude, E. B., Blakytyn, R., Bulmer, J., Boulton, A. J. & Ferguson, M. W. (2002) Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 19: 440-447.
117. Wei, D., Ge, S., Chen, Y., Dai, F. & Su, B. (1997) Expression of endogenous transforming growth factor-beta and its type I and type II receptors in rat burn wounds. *Wound Repair Regen* 5: 229-234.
118. Schmid, P., Itin, P., Cherry, G., Bi, C. & Cox, D. A. (1998) Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 152: 485-493.
119. Cromack, D. T., Pierce, G. F. & Mustoe, T. A. (1991) TGF-beta and PDGF mediated tissue repair: identifying mechanisms of action using impaired and normal models of wound healing. *Prog Clin Biol Res* 365: 359-373.
120. Weber, K. S., Nelson, P. J., Grone, H. J. & Weber, C. (1999) Expression of CCR2 by endothelial cells: implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2085-2093.
121. Conti, P., Pang, X., Boucher, W., Letourneau, R., Reale, M., Barbacane, R. C., Thibault, J. & Theoharides, T. C. (1997) Monocyte chemotactic protein-1 is a proinflammatory chemokine in rat skin injection sites and chemoattracts basophilic granular cells. *Int Immunol* 9: 1563-1570.
122. Gibran, N. S., Ferguson, M., Heimbach, D. M. & Isik, F. F. (1997) Monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in the human burn wound. *J Surg Res* 70: 1-6.
123. Vestergaard, C., Just, H., Baumgartner Nielsen, J., Thestrup-Pedersen, K. & Deleuran, M. (2004) Expression of CCR2 on monocytes and macrophages in chronically inflamed skin in atopic dermatitis and psoriasis. *Acta Derm Venereol* 84: 353-358.
124. Frink, M., Lu, A., Thobe, B. M., Hsieh, Y. C., Choudhry, M. A., Schwacha, M. G., Kunkel, S. L. & Chaudry, I. H. (2007) Monocyte chemoattractant protein-1 influences trauma-hemorrhage-induced distal organ damage via regulation of keratinocyte-derived chemokine production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1110-1116.
125. Low, Q. E., Drugea, I. A., Duffner, L. A., Quinn, D. G., Cook, D. N., Rollins, B. J., Kovacs, E. J. & DiPietro, L. A. (2001) Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol* 159: 457-463.
126. Češka, R. (2005) Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií, 1 ed. Triton, Praha.
127. Keaney, J. F., Jr. (2000) Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 21: 99-166.
128. Gudev, A. (1996) [The role of the oxidative modification of LDL in the pathogenesis of atherosclerosis]. *Mol Med (Sofia)* 1: 31-38.

129. Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272: 20963-20966.
130. Ii, H., Hontani, N., Toshida, I., Oka, M., Sato, T. & Akiba, S. (2008) Group IVA phospholipase A2-associated production of MMP-9 in macrophages and formation of atherosclerotic lesions. *Biol Pharm Bull* 31: 363-368.
131. Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126.
132. Kansas, G. S. & Pavalko, F. M. (1996) The cytoplasmic domains of E- and P-selectin do not constitutively interact with alpha-actinin and are not essential for leukocyte adhesion. *J Immunol* 157: 321-325.
133. Cybulsky, M. I., Won, D. & Haidari, M. (2004) Leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions. *Can J Cardiol* 20 Suppl B: 24B-28B.
134. Faggiotto, A., Ross, R. & Harker, L. (1984) Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 4: 323-340.
135. Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. & Wissler, R. W. (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89: 2462-2478.
136. Huo, Y. & Ley, K. (2001) Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* 173: 35-43.
137. Manka, D. R., Wiegman, P., Din, S., Sanders, J. M., Green, S. A., Gimple, L. W., Ragosta, M., Powers, E. R., Ley, K. & Sarembock, I. J. (1999) Arterial injury increases expression of inflammatory adhesion molecules in the carotid arteries of apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res* 36: 372-378.
138. Albelda, S. M. (1991) Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4: 195-203.
139. Woodfin, A., Voisin, M. B. & Nourshargh, S. (2007) PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2514-2523.
140. Galkina, E. & Ley, K. (2007) Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2292-2301.
141. Drobnik, J., Dabrowski, R., Szczepanowska, A., Giernat, L. & Lorenc, J. (2000) Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vassopressin-induced hypertension or hypercholesterolemia. *J Physiol Pharmacol* 51: 521-533.
142. Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L. & Ross, R. (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14: 133-140.

143. Jawien, J., Nastalek, P. & Korbut, R. (2004) Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55: 503-517.
144. Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., de Vries-Van der Weij, J., van der Hoorn, J., Princen, H. M. & Kooistra, T. (2007) Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1706-1721.
145. Breslow, J. L. (1996) Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272: 685-688.
146. Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A. & Maeda, N. (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-471.
147. Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1994) The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4431-4435.
148. Witting, P. K., Pettersson, K., Ostlund-Lindqvist, A. M., Westerlund, C., Eriksson, A. W. & Stocker, R. (1999) Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *Faseb J* 13: 667-675.
149. Leppanen, P., Luoma, J. S., Hofker, M. H., Havekes, L. M. & Yla-Herttuala, S. (1998) Characterization of atherosclerotic lesions in apo E3-leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* 136: 147-152.
150. Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R. et al. (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 96: 857-881.
151. Nachtigal, P., Semecky, V., Kopecky, M., Gojova, A., Solichova, D., Zdansky, P. & Zadak, Z. (2004) Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract* 200: 219-229.
152. Nachtigal, P. (2002) Experimentální navození patologických změn v kardiovaskulárním systému - morfometrické metody. *Dizertační práce.*: 11-13, 33-34.
153. Fernandez, M. L. (2001) Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol* 12: 35-40.
154. Ticha, A., Hyspler, R., Zadak, Z., Indrova, M. & Hysplerova, L. (2003) Dietní vláknina a její vlivy na lidský organismus. *Klinická biochemie a metabolismus.*: s. 27-31.
155. Hearing, S. D., Thomas, L. A., Heaton, K. W. & Hunt, L. (1999) Effect of cholecystectomy on bowel function: a prospective, controlled study. *Gut* 45: 889-894.



156. Jenkins, D. J., Axelsen, M., Kendall, C. W., Augustin, L. S., Vuksan, V. & Smith, U. (2000) Dietary fibre, lente carbohydrates and the insulin-resistant diseases. *Br J Nutr* 83 Suppl 1: S157-163.
157. Dikeman, C. L. & Fahey, G. C. (2006) Viscosity as related to dietary fiber: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46: 649-663.
158. Levrat, M. A., Favier, M. L., Moundras, C., Remesy, C., Demigne, C. & Morand, C. (1994) Role of dietary propionic acid and bile acid excretion in the hypocholesterolemic effects of oligosaccharides in rats. *J Nutr* 124: 531-538.
159. Lewis, S. J. & Heaton, K. W. (1997) Increasing butyrate concentration in the distal colon by accelerating intestinal transit. *Gut* 41: 245-251.
160. Mekki, N., Dubois, C., Charbonnier, M., Cara, L., Senft, M., Pauli, A. M., Portugal, H., Gassin, A. L., Lafont, H. & Lairon, D. (1997) Effects of lowering fat and increasing dietary fiber on fasting and postprandial plasma lipids in hypercholesterolemic subjects consuming a mixed Mediterranean-Western diet. *Am J Clin Nutr* 66: 1443-1451.
161. Hofker, M. H. & Breuer, M. (1998) Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol* 110: 63-78.
162. Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W. & Sacks, F. M. (1999) Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 69: 30-42.
163. Moundras, C., Behr, S. R., Remesy, C. & Demigne, C. (1997) Fecal losses of sterols and bile acids induced by feeding rats guar gum are due to greater pool size and liver bile acid secretion. *J Nutr* 127: 1068-1076.
164. Terpstra, A. H., Lapre, J. A., de Vries, H. T. & Beynen, A. C. (1998) Dietary pectin with high viscosity lowers plasma and liver cholesterol concentration and plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hamsters. *J Nutr* 128: 1944-1949.
165. Bennett, W. G. & Cerda, J. J. (1996) Dietary fiber: fact and fiction. *Dig Dis* 14: 43-58.
166. Wursch, P. & Pi-Sunyer, F. X. (1997) The role of viscous soluble fiber in the metabolic control of diabetes. A review with special emphasis on cereals rich in beta-glucan. *Diabetes Care* 20: 1774-1780.
167. Frias, A. C. & Sgarbieri, V. C. (1998) Guar gum effects on food intake, blood serum lipids and glucose levels of Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr* 53: 15-28.
168. Naumann, E., van Rees, A. B., Onning, G., Oste, R., Wydra, M. & Mensink, R. P. (2006) Beta-glucan incorporated into a fruit drink effectively lowers serum LDL-cholesterol concentrations. *Am J Clin Nutr* 83: 601-605.
169. Moreyra, A. E., Wilson, A. C. & Koraym, A. (2005) Effect of combining psyllium fiber with simvastatin in lowering cholesterol. *Arch Intern Med* 165: 1161-1166.

170. Williams, C. L., Bollella, M., Spark, A. & Puder, D. (1995) Soluble fiber enhances the hypocholesterolemic effect of the step I diet in childhood. *J Am Coll Nutr* 14: 251-257.
171. Fernandez, M. L. & Volek, J. S. (2006) Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutr Metab (Lond)* 3: 17.
172. Seal, C. J. & Mathers, J. C. (2001) Comparative gastrointestinal and plasma cholesterol responses of rats fed on cholesterol-free diets supplemented with guar gum and sodium alginate. *Br J Nutr* 85: 317-324.
173. Overton, P. D., Furlonger, N., Beety, J. M., Chakraborty, J., Tredger, J. A. & Morgan, L. M. (1994) The effects of dietary sugar-beet fibre and guar gum on lipid metabolism in Wistar rats. *Br J Nutr* 72: 385-395.
174. Pal, M. & Pillarisetti, S. (2007) HDL elevators and mimetics--emerging therapies for atherosclerosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 5: 55-66.
175. Rader, D. J. (2007) Mechanisms of disease: HDL metabolism as a target for novel therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4: 102-109.
176. Toth, P. P. & Davidson, M. H. (2005) Cholesterol absorption blockade with ezetimibe. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 5: 455-462.
177. Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S., Besson, C., Manach, C., Bernalier, A., Morand, C., Remesy, C. & Demigne, C. (2003) Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *J Nutr* 133: 1860-1865.
178. Hexeberg, S., Hexeberg, E., Willumsen, N. & Berge, R. K. (1994) A study on lipid metabolism in heart and liver of cholesterol- and pectin-fed rats. *Br J Nutr* 71: 181-192.