

27. Souhrn

Nehojící se rána je velmi často nežádoucí komplikací řady onemocnění a cílem léčby je proto dosáhnout v co nejkratším čase funkční reparační. 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 obnově porušené rovnováhy mezi reparačními a degračními procesy v ráně, čímž hojící proces příznivě ovlivňují (56).

V naší studii jsme testovali nový přípravek, jehož základem je mikrodispergovaná oxidovaná celulóza (MDOCTM), 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⁻ skupin ionty Ca²⁺ a Na⁺ v požadovaném poměru získává MDOCTM 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 MDOCTM Apo-E (-/-) deficientním myším má mírný protizánětlivý a hypolipidemický účinek. Z hlediska rozvoje aterosklerózy 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 MDOCTM v dietě, na myším apo-E deficientním (-/-) 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 zhmžděné 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 adhezivní 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 textílie, 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 tkáně. 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 tržně zmožděné 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 zjištěna 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 věst 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 MDOCTM testované na myším C57BL/6J apoE-deficientním modelu byl krátkodobým podáváním standardní laboratorní diety s přísadkou MDOCTM (50mg/kg/den) potvrzen pouze mírný hypolipidemický účinek. Hladina celkového cholesterolu byla ovlivněna mírně, hladina VLDL a LDL nebyla po podání MDOCTM ovlivněna nijak významně v porovnání s kontrolní skupinou, které byla podávána standardní dieta. Stereologickou analýzou imunohistochemického barvení bylo prokázáno signifikantní snížení endoteliální exprese adhezni molekuly VCAM-1 a snížení ICAM-1. Ze získaných výsledků usuzujeme, že tento efekt může být pravděpodobně výraznější po delším podávání MDOCTM, protože metabolismus lipidů u myši vykazuje pomalejší obrat, tzn., že doba čtyř týdnů podávání tohoto přípravku může být nedostačující.

Osmítýdenní podávání 5% MDOCTM 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% MDOCTM 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 MDOCTM. U další části experimentu bylo cílem zjistit mechanismus hypolipidemického působení MDOCTM a posoudit, zda může být řazena do skupiny tzv. rozpustné dietní vlákniny. Při sledování vlivu intragastricky sondou podávané MDOCTM na absorpci cholesterolu v tenkém střevě u myšičí 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. MDOCTM a pektinu (kontrolní skupina) neprokázaly také žádný vliv na proces eliminace žlučových kyselin. Na druhou stranu bylo po podání MDOCTM prokázáno snížení celkového cholesterolu v játrech v porovnání s kontrolní skupinou. Výsledky *in vivo* a *in vitro* experimentů poukazují také na fermentační účinek MDOCTM v tlustém střevě. Při určení celkového obsahu dietní vlákniny v MDOCTM 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 MDOCTM 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 MDOCTM 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).