

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

ANALÝZA HOJÍCÍ SE RÁNY U DIABETICKÉHO POTKANA ZDF
S DŮRAZEM NA HISTOLOGII
Bc. DENISA BYRTUSOVÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
2015

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

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

BC. DENISA BYRTUSOVÁ

MASTER THESIS

2015

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Denisa Byrtusová**
Osobní číslo: **C13725**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Analýza hojící se rány u diabetických potkanů ZDF s důrazem na histologii**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

- 1) Teoretická část:
 - a) struktura kůže
 - b) zpracování současného stavu problematiky hojení primárních a sekundárních ran
 - c) specifikace hojení ran u diabetiků
 - d) role jaderného receptoru PPAR α při hojení ran
- 2) Praktická část:
 - a) Zvládnout zalévání biologického materiálu do parafinových bločků a tvorbu histologických řezů.
 - b) Zavést základní histologické barvení trichromem.
 - c) Zavést imunohistochemické barvení s primární protilátkou PPAR α .
 - d) Provést histologická i imunohistochemická barvení u řezů z kožních ran potkanů ZDF.
 - e) Porovnat a obrazově zdokumentovat různé časové intervaly hojení.
 - f) Zjistit, zda jsou rozdíly mezi pohlavími a mezi zdravými a diabetickými jedinci.


Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Renata Köhlerová, Ph.D.**
Ústav lék.biochemie LF UK Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **1. října 2014**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2015**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


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

V Pardubicích dne 20. února 2015

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne: 11. 5. 2015

Bc. Denisa Byrtusová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala především vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Renátě Köhlerové, Ph.D., za odborné rady, vstřícnost, pomoc, a veškerý čas, který mi během zpracování diplomové práce věnovala. Za vstřícnost, ochotu a pomoc děkuji také pracovníkům Ústavu histologie a embryologie a Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

ANOTACE

Práce se zabývá histologickými změnami kůže během jednotlivých fází procesu hojení. Kromě morfologických alterací v procesu hojení se práce v menší míře věnuje také expresi PPAR α . Teoretická část shrnuje základní poznatky o histologické struktuře kůže, diabetu mellitu typu 2, ZDF potkanech a popisuje proces hojení jak za fyziologických, tak patologických podmínek. Krátce jsou zde zmíněny také receptory aktivované proliferátory peroxizomů, zejména pak izotyp alfa.

Experimentální část je věnována histologické a imunohistochemické analýze kůže ZDF potkanů. ZDF potkani slouží jako vhodný zvířecí model pro studium diabetu mellitu typu 2.

Klíčová slova: hojení ran, PPAR α , Zucker diabetic fatty rat, histologie kůže, diabetes mellitus

ANNOTATION

The thesis focuses on histological skin changes, within several phases of the wound healing. In addition to morphologic alterations in the healing, the thesis also marginally deals with the expression PPAR α . The theoretical part includes basic knowledge in histological skin structure, diabetes mellitus type 2 and ZDF rats. This part also describes the healing in physiological, as well as in pathological conditions. A short mention is devoted to peroxisome proliferator-activated receptors, especially to the isotype alpha.

The experimental part is focused on histological and immunohistochemical skin analysis of ZDF rats. ZDF rats represent an appropriate animal model for study of diabetes mellitus of type 2.

Keywords: wound healing, PPAR α , Zucker diabetic fatty rat, skin histology, diabetes mellitus

OBSAH

ÚVOD.....	10
CÍL PRÁCE.....	11
TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 HISTOLOGICKÁ STRUKTURA KŮŽE.....	12
2 HOJENÍ PRIMÁRNÍCH A SEKUNDÁRNÍCH RAN.....	16
2.1 Fáze hojení ran	18
2.1.1 Hemostáza.....	18
2.1.2 Fáze zánětlivá (exsudativní)	19
2.1.3 Fáze proliferační	19
2.1.4 Fáze remodelační	21
3 DIABETES MELLITUS	23
3.1 Definice	23
3.2 Klasifikace.....	23
3.3 Komplikace	24
3.3.1 Kožní komplikace	24
3.3.2 Diabetes a hojení ran.....	25
4 JADERNÉ RECEPTORY PPAR.....	27
5 DIABETICKÝ POTKAN ZDF.....	30
6 HISTOLOGIE.....	31
6.1 Fixace tkáně	31
6.2 Zalévání tkáně do parafínu.....	31
6.3 Krájení tkáně	32
6.4 Barvení tkáně	32
6.5 Montování řezů	33
7 IMUNOHISTOCHEMIE.....	34
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
8 PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ PRO HISTOLOGII.....	38
8.1 Odběr materiálu a fixace tkáně	38
8.2 Zalévání tkáně do parafínu.....	38
8.3 Krájení tkáně	40

8.4	Barvení	41
8.5	Montování a mikroskopování	44
9	PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ PRO IMUNOHISTOCHEMII.....	45
9.1	Odparafinování.....	46
9.2	Imunohistochemické barvení	46
9.3	Odvodnění	48
9.4	Montování a mikroskopování	48
10	VÝSLEDKY	49
11	DISKUSE.....	70
12	ZÁVĚR	75
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	76
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ.....	84
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86
	SEZNAM TABULEK.....	88
	SEZNAM PŘÍLOH.....	89

ÚVOD

Hojení ran je komplexní dynamický proces, na jehož průběhu se podílejí buňky imunitního systému, buňky epiteliální, endoteliální, krevní destičky a fibroblasty. Cytokiny a mediátory produkované těmito buňkami hrají v procesu hojení důležitou úlohu. Hojení je výsledkem souhry mnoha faktorů, složitých regulačních mechanismů a vzájemných interakcí všech buněčných komponent společně s růstovými faktory.

Za fyziologických podmínek probíhá hojení ve 4 fázích, které se v čase vzájemně překrývají. Jedná se o hemostázu, fázi zánětlivou, proliferační a remodelační. Do každé fáze se zapojuje jiná sorta buněk. Hemostázy se účastní krevní destičky, zánětlivá fáze je zprostředkována množstvím neutrofilů, které jsou v pozdější fázi zánětu vystřídány makrofágy a lymfocyty. Proliferační fáze se neobejde bez přítomnosti endotelových a epitelových buněk a zejména pak fibroblastů, které jsou důležité i v poslední fázi remodelační, během které se přeměňují na myofibroblasty zajišťující kontrakci rány.

Za patologických podmínek neprobíhá hojení podle normálního schématu, ale dochází k prodloužení jednotlivých fází, zejména fáze zánětlivé, při které jsou značně zmnoženy neutrofilové, makrofágy a mastocyty. Takto změněné rány se stávají chronickými a obtížně léčitelnými.

Jednou z častých příčin zhoršeného hojení ran je i systémové onemocnění diabetes mellitus, které je provázeno cévními změnami. Příčinou chronických ran u diabetiků je také ischemie vedoucí k tkáňové hypoxii, porušená mikrocirkulace, přítomnost bakteriální nebo mykotické infekce, malnutrice, polyneuropatie, nadměrná tvorba granulační tkáně s poruchou kontrakce rány, snížená exprese růstových faktorů, zvýšená aktivita tkáňových proteáz a mnoho dalších.

K lepšímu porozumění morfologických změn, které proces hojení provázejí, se v dnešní době využívá mnoho zvířecích modelů např. paviánů, prasat a zejména pak potkanů. Zucker diabetic fatty rat (ZDF) se vyznačují mutací v genu pro leptinový receptor. Na základě této genetické mutace dochází u potkanů k polyfagii, následné obezitě a inzulínové rezistenci vedoucí k rozvoji nemoci diabetes mellitus typu 2.

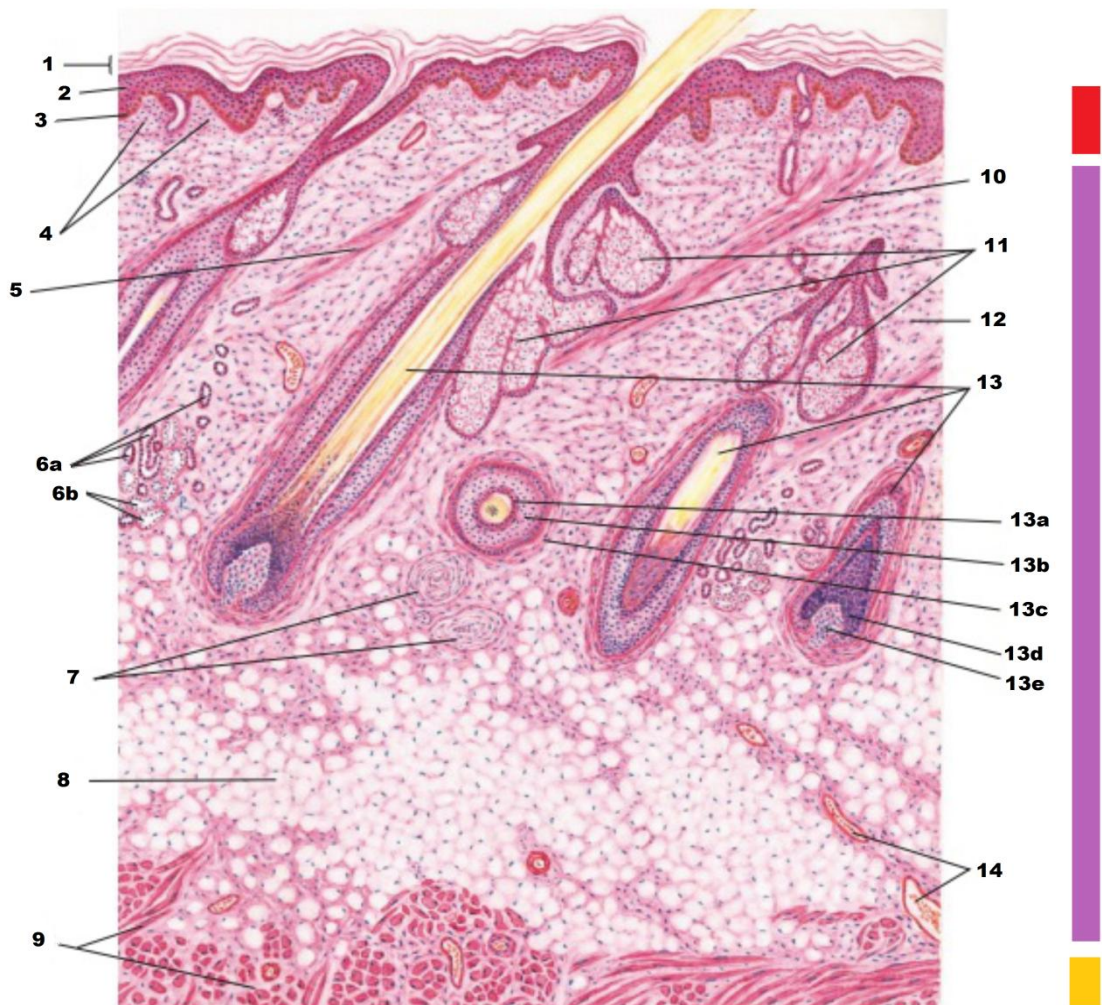
CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo histologické a imunohistochemické srovnání průběhu hojení kožních ran u ZDF potkanů – zjistit, zda existují rozdíly mezi pohlavími a mezi zdravými a diabetickými jedinci v různých časových intervalech.

TEORETICKÁ ČÁST

1 HISTOLOGICKÁ STRUKTURA KŮŽE

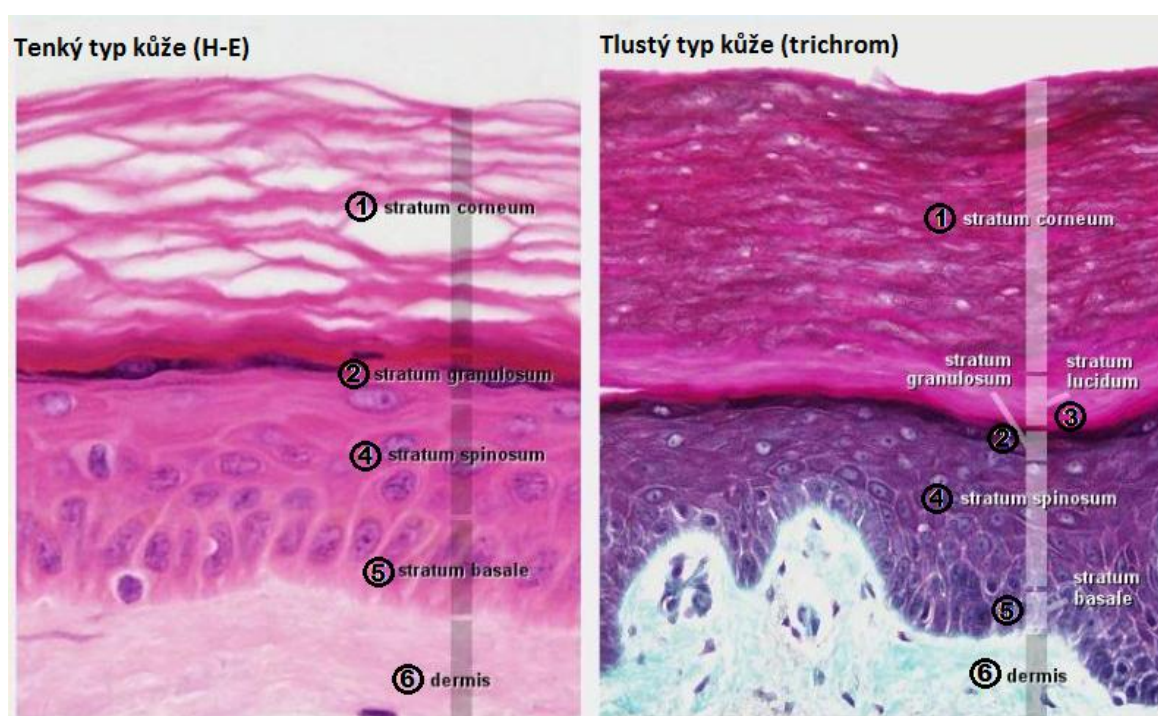
Kůže představuje největší a nejtěžší orgán lidského těla. U dospělého člověka tvoří 16 % jeho hmotnosti. Kůže zajišťuje ochranu před vlivy zevního prostředí, jakožto ultrafialovým zářením, teplem, radiací, chemikáliemi, mikroorganismy atd. Její velmi důležitou funkcí je regulace tělesné teploty [3,4].



Obr. 1: Histologická struktura lidské kůže, červeným pruhem vyznačena vrstva epidermis, fialovým pruhem dermis a žlutým subcutis (upraveno podle [55])

1 – stratum corneum, 2 – stratum spinosum, 3 – stratum basale s melaninovými granuly 4 – dermální papily, 5 – musculus arrector pili, 6a – vývod potních žláz, 6b – sekreční část potních žláz, 7 – Vater-Paciniho tělíska, 8 – subkutánní vrstva s tukovou tkání, 9 – kosterní sval, 10 – musculus arrector pili, 11 – mazové žlázy, 12 – retikulární vrstva, 13 – vlasové folikuly; 13a – vnitřní kořenová pochva; 13b – zevní kořenová pochva; 13c – vazivová pochva; 13d – vlasová cibulka; 13e – dermální papila, 14 – krevní cévy

Histologicky ji můžeme rozdělit na tři zřetelně odlišné složky (obr. 1): epidermis (pokožka), dermis (škára) a subcutis (podkoží). Epidermis představuje složku epitelovou, dermis složku vazivovou. Na základě tloušťky epidermis rozlišujeme kůži tlustého a tenkého typu. Kůže tlustého typu, nacházející se na ploskách nohou a dlaních, vytváří epidermis silnou 400 – 600 μm . Tenký typ kůže nacházíme na ostatních částech těla a epidermis zde dosahuje tloušťky 75 – 150 μm . Typické pro tento typ kůže je ochlupení [3,4].



Obr. 2: Porovnání kůže tenkého a tlustého typu (upraveno podle [56])

(1) – *Stratum corneum*, (2) – *stratum granulosum*, (3) – *stratum lucidum*, (4) – *stratum spinosum*, (5) – *stratum basale*, (6) – *dermis*

Epidermis

Epidermis vytváří rohovějící vrstevnatý dlaždicový epitel. Olupující se (rohovějící) buňky jsou označovány jako keratinocyty. Součástí epidermis jsou i další buňky jako melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. Epidermis tlustého typu rozdělujeme do 5 vrstev (obr. 3).

Stratum basale je nejhlubší částí epidermis s výraznou mitotickou aktivitou. Tvoří ji vrstva kubických buněk.

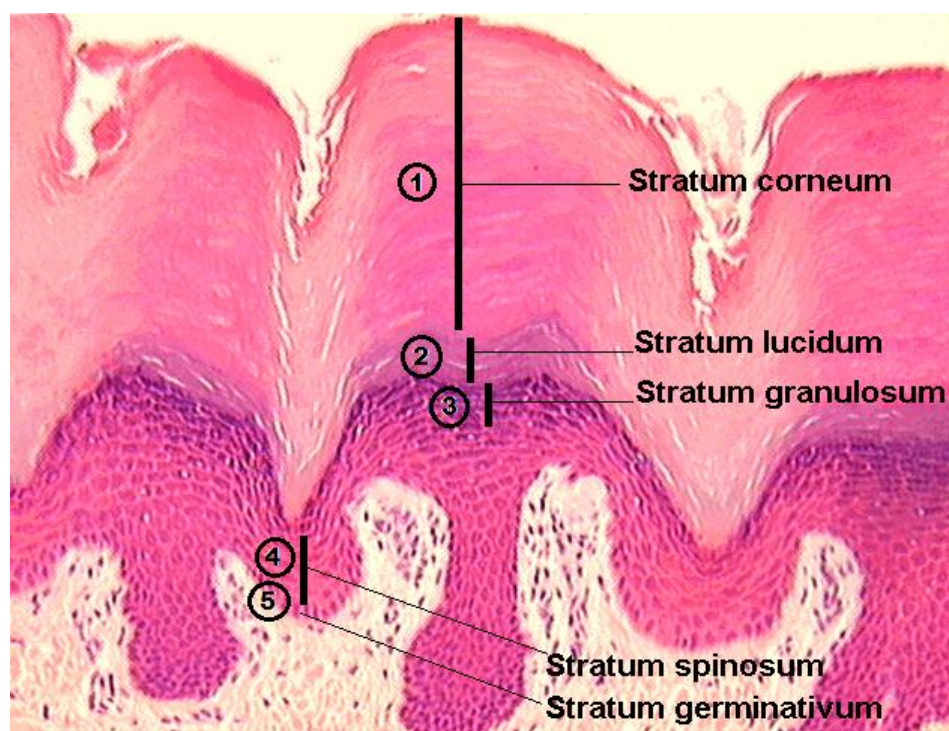
Stratum spinosum je formována buňkami kubického, polygonálního až oploštělého tvaru s četnými ostnatými výběžky. I zde probíhá mitotická aktivita a společně se stratum basale se hovoří o tzv. stratum germinativum Malpighi.

Stratum granulosum sestává z 3 – 5 vrstev oploštělých buněk polygonálního tvaru. Buňky obsahují hrubá bazofilní keratohyalinová granula a malá granula lamelární. Keratohyalin je prekurzorem keratinu.

Stratum lucidum je složena z extrémně oploštělých buněk a to zejména u tlustého typu kůže. Jádro a orgány buněk se stávají méně zřetelnými.

Stratum corneum se skládá z 15 – 20 vrstev oploštělých zrohovělých buněk obsahujících ve své cytoplazmě keratin. Buňky se označují jako korneocyty. Nemají patrně ani jádro ani buněčné orgány. Povrchová vrstva kůže se typicky odlupuje – dochází k tzv. deskvamaci korneocytů.

U tenkého typu kůže je stratum granulosum a stratum lucidum méně patrné (obr. 2).



Obr. 3: Vrstvy *epidermis* (upraveno podle [57] černou tlustou čarou vyznačena tloušťka jednotlivých vrstev) (1) – stratum corneum, (2) – stratum lucidum, (3) – stratum granulosum, (4) – stratum spinosum, (5) – stratum germinativum

Dermis

Dermis je tenká vrstva pojivového vaziva ležící pod vrstvou epidermis. Je složena z kolagenních, elastických a méně častých retikulinových vláken. Mezi epidermis a dermis se nachází zřetelná hranice zvaná lamina basalis. Tloušťka vrstvy dermis je na různých částech těla proměnlivá. Dermis sestává ze dvou vrstev: Stratum papillare tvořená řídkým kolagenním vazivem a stratum reticulare sestávající z hustého neuspořádaného kolagenního vaziva [3,4]. Mezi hlavní buňky dermis patří: fibroblasty, histiocyty a mastocyty. Fibroblasty hrají hlavní roli v syntéze vaziva. Histiocyty, které vznikají z monocytů, v dermis působí jako makrofágy. Mastocyty neboli žírné buňky obsahují ve své cytoplazmě metachromatická (červenofialová) granula. Při zánětlivých a alergických reakcích uvolňují do svého okolí mediátory typu histamin, serotonin, heparin a další [23].

Subcutis je nejhlubší vrstvou kůže, která je složena zejména z tukové tkáně a řídkého vaziva [23].

Histologická stavba kůže u potkanů je podobná kůži ostatních hlodavců. Od lidské kůže se však liší. U potkaní kůže rozlišujeme vrstvu epitelu (epidermis), tenkou vrstvu pojivové tkáně (dermis), vrstvu tukové tkáně (subcutis nebo panniculus adiposus) a vrstvu příčně pruhovaného svalu označovanou jako panniculus carnosus, která od kůže odděluje ostatní struktury. Tato vrstva se v lidské kůži nenachází [45].

Kosterní svalová tkáň

Kosterní svalová tkáň je tkání příčně pruhovanou. Morfologickou a funkční jednotkou je mnohoaderná buňka neboli svalové vlákno. Délka vlákna se udává od několika milimetrů do několika centimetrů při tloušťce 10 – 100 μm . Na podélných řezech vlákno vykazuje příčné pruhování [6].

Stavba svalového vlákna

Na povrchu svalového vlákna se nachází sarkolema. Každé vlákno může obsahovat až stovky buněčných jader, která jsou uložena pod sarkolemou. Vnitřek vlákna je vyplněn sarkoplazmou, jejíž součástí je myoglobin a myofibrily. V prostoru mezi myofibrilami se nacházejí mitochondrie a sarkoplazmatické retikulum. Četné Golgiho aparáty jsou situovány v blízkosti buněčných jader. Zrnka glykogenu a tukové kapky jsou zde zastoupeny jako buněčné inkluze [6].

2 HOJENÍ PRIMÁRNÍCH A SEKUNDÁRNÍCH RAN

Hojení ran je komplexní fyziologický děj, vyžadující koordinaci několika různých procesů a faktorů. Odehrává se ve všech tkáních a orgánech. Mnoho z reparativních procesů je společných pro všechny tkáně. Hojení zahrnuje kaskádu přesně regulovaných kroků a událostí, které korelují s výskytem různých typů buněk, které se v ráně v průběhu jednotlivých fází procesu objevují. Načasování a interakce mezi zúčastněnými komponenty se může u akutních a chronických ran lišit, nicméně hlavní fáze hojení zůstávají beze změn [33].

Mezi lokální faktory ovlivňující hojení patří bezesporu ischemie, bakteriální infekce, přítomnost cizích těles, výživa a mnoho dalších [54]. Zánětlivá infiltrace zpomaluje proliferaci fibroblastů a tím i syntézu a ukládání ECM. Znaky infekce zahrnují teplotu, citlivost, zarudnutí, otok a exsudát [33]. Dostatečný příjem kalorií je během hojení ran velmi důležitý. Adekvátní množství vitamínu C a A je nutné pro syntézu kolagenu, jeho zesíťování a proces reepitelizace. Mikronutrienty jako zinek a měď jsou součástí mnoha enzymů, které se na hojení ran podílejí. Proto může při jejich deficitu dojít ke zpomalení hojení [33].

Mezi dva mechanismy, kterými se tkáň může zahojit, patří regenerace a reparace. Regenerace představuje proces, při kterém se poškozené buňky nahradí novými identickými buňkami [15,16]. Jinak je tomu u reparace, kdy se poškozená tkáň nahradí tkání jinou, vazivovou. V závislosti na podmínkách hojení rozlišujeme dva způsoby hojení: per primam intentionem (primární hojení, obr. 4) a per secundam intentionem (sekundární hojení, obr. 5) [17].

Hojení za fyziologických podmínek probíhá ve čtyřech fázích: hemostáza, zánětlivá reakce, proliferace a remodelace (obr. 6). Jednotlivé fáze se překrývají a doba potřebná k vyléčení je individuální pro každého jedince [15,21].

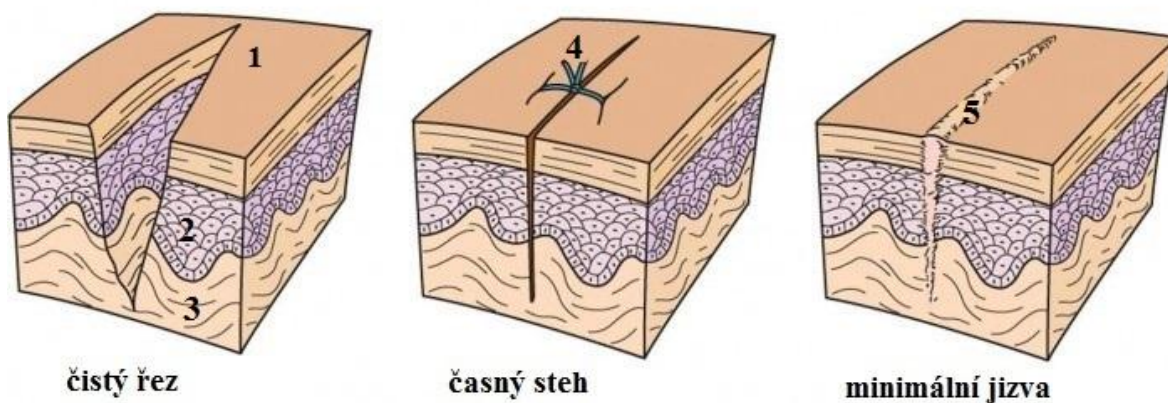
Hojení per primam

Probíhá u ran, které nejsou infikované a znečištěné, okraje jsou blízko sebe, nebo byly sešity chirurgickými stehy. Prostor mezi dvěma okraji je vyplněn erytrocyty, krevní plazmou a fibrinem. Takovýmto způsobem se převážně hojí řezné a operační rány, které nepodlehly infekci [17,19]. Narušena bývá jen malá část tkáně, dochází k tvorbě malého množství granulační tkáně, taktéž je zde minimalizována tvorba jizvy [5].

Hojení per secundam

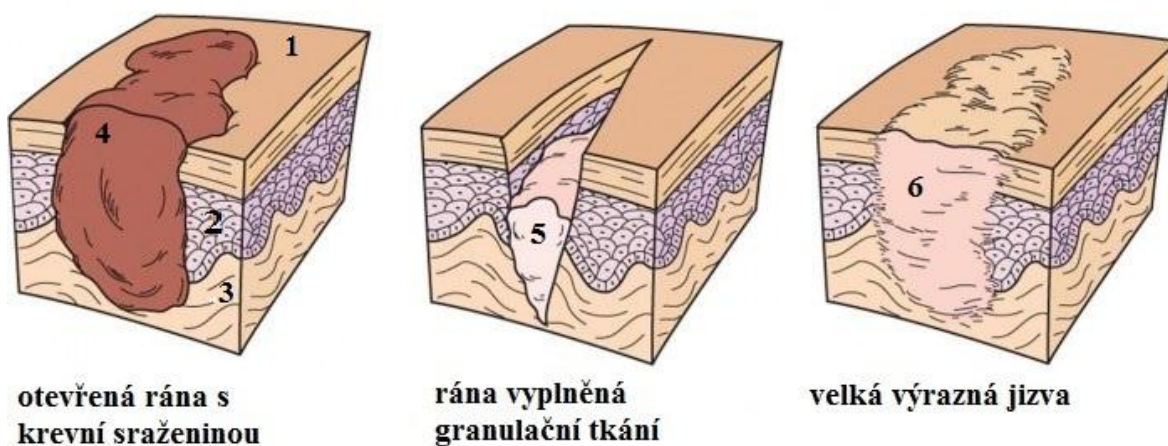
Tímto způsobem se hojí velké otevřené a znečištěné rány. Taktéž rány, u kterých došlo ke ztrátě tkáně či k infekci. Hojení probíhá na stejném principu jako je hojení per primam s tím rozdílem, že probíhá pomaleji a je potřeba nahradit větší část tkáně, než je tomu u hojení per primam. Ve většině případů je proces hojení ukončen vznikem dosti výrazné jizvy [17,19]. Pro maximální zahojení je velmi důležité zajistit správné mikroprostředí na povrchu rány [15].

Hojení per primam



*Obr. 4: Schematické znázornění hojení per primam (upraveno podle [58])
1 – neporaněná kůže, 2 – epidermis, 3 – dermis, 4 – stehem sešitá rána, 5 – jizva*

Hojení per secundam



*Obr. 5: Schematické znázornění hojení per secundam (upraveno podle [59])
1 – neporaněná kůže, 2 – epidermis, 3 – dermis, 4 – krevní sraženina, 5 – granulační tkáň, 6 – výrazná jizva*

Chronické rány

Hojení chronických ran se vyznačuje nekoordinovaností, nerovnováhou v produkci cytokinů, růstových faktorů, proteáz a endokrinních hormonů. Jejich hojení neprobíhá podle normálního schématu hojení. Jedná se o inkompletní proces narušený různými faktory, jejichž výsledkem je prodloužení jedné nebo více fází reparace. Mezi tyto faktory patří infekce, hypoxie, nekróza, exsudace a zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů. Přetrvávající zánět vede ke kaskádě tkáňových reakcí, které společně zpomalují hojení tkáně [33].

2.1 Fáze hojení ran

2.1.1 Hemostáza

Při poškození dermis dochází ke krvácení. V místě poranění dochází k vazokonstrikci, nahromadění krevních destiček, vytváří se provizorní hemostatická zátka, následuje kaskádovitá reakce plazmatických faktorů, končící vznikem fibrinové sítě a definitivního trombu. Později se trombus odstraní fibrinolýzou [18]. Uvnitř fibrinové sítě krevní destičky agregují a produkují řadu růstových faktorů, mimo jiné PDGF a (TGF) β 1.

Poškozením krevních cév nastává v ráně bezprostředně po poranění hypoxie, která je důležitá pro další fázi hojení. Díky ní narůstá migrace keratinocytů, dochází k časně angiogenezi, proliferaci a klonální expanzi fibroblastů. Také vzrůstá transkripce a syntéza důležitých růstových faktorů a cytokinů.

Během dvou až tří dnů jsou zánětlivé a dermální buňky rekrutovány do poškozeného místa. Cirkulující monocyty přestupují z krevního řečiště do místa poranění, kde se přeměňují na tkáňové makrofágy. Fibroblasty a endoteliální buňky formují časnou granulační tkáň, která zahajuje proces kontrakce [29].

2.1.2 Fáze zánětlivá (exsudativní)

Časná (neutrofilly) a pozdní (makrofágy) [33]

Zánětlivá odpověď začíná bezprostředně po poranění díky cirkulujícím leukocytům, které se do rány dostaly pasivně z poraněných cév. Impulz pro další aktivaci imunitních buněk zajišťují mastocyty, Langerhansovy buňky a T buňky, které tkáň přirozeně osídlují [43].

Po zastavení krvácení nastává vazodilatace se zvýšenou permeabilitou cév. Dochází k tvorbě extravaskulárního výpotku, do rány migrují proteiny společně s leukocyty. Neutrofilly hrají roli první obranné linie, secernují mediátory zánětu $\text{TNF}\alpha$, IL-1 a IL-2, pomocí fagocytózy a produkovaných proteáz likvidují jak choroboplodné zárodky, tak ireverzibilně poškozenou tkáň [20]. V ráně se objevují přibližně 6 hodin (24 – 36 hodin [33]) po poranění, během 1 až 2 dní se jejich množství zvyšuje na maximum a po 2 až 3 dnech toto množství začíná klesat [40]. Fagocytární aktivita neutrofilů je pro následující fáze rozhodující. V případě nedostatečné funkce neutrofilů by došlo k bakteriální nerovnováze, a akutní rána by se stala nehojící [33]. Neutrofilly jsou poté vytlačeny v podobě strupu nebo fagocytovány makrofágy [32].

Makrofágy se v ráně objevují 48 – 72 hodin po poranění [33]. Společně s endotelem jsou hlavním producentem prozánětlivých cytokinů IL-1 β a $\text{TNF}\alpha$ [16,20]. Jimi produkované růstové faktory (b-FGF, EGF, $\text{TGF}\alpha$ a $\text{TGF}\beta$) řídí migraci a proliferaci buněk, které jsou důležité pro novotvorbu vaskularizované tkáně. Hlavním cílem zánětlivé reakce je vyčištění rány, což je základní podmínka pro následující fázi [21].

Poslední buňky vstupující do rány jsou lymfocyty, které jsou sem přitahovány přibližně po 72 hodinách po poranění působením IL-1, složkami komplementu a rozpadovými produkty imunoglobulinu G. IL-1 je důležitý pro regulaci kolagenáz, které později sehrávají důležitou roli v remodelaci kolagenu, produkci složek extracelulární matrix (ECM) a také degradaci ECM [33].

2.1.3 Fáze proliferační

Proliferace je charakterizována angiogenezí, epitelizací, formováním granulační tkáně a ukládáním kolagenu [32,54]. Fibroblasty, endoteliální a epiteliální buňky, zde hrají hlavní roli. Proliferační fáze nastává v řádu několika hodin po poranění [32]. Velnar a kol., udávají začátek proliferační fáze třetí den po poranění a konec přibližně dva týdny poté

[33]. Důležitou roli zde sehrávají cytokiny a růstové faktory TGF β , VEGF a PDGF stimulující fibroblasty a endoteliální buňky [21].

Angiogeneze

Adekvátní krevní zásobení a výživu v nově vznikající granulační tkáni zajišťuje proces angiogeneze neboli neovaskularizace, během kterého se formují nové krevní cévy [5,53]. Proces neovaskularizace začíná z intaktních krevních cév vyskytujících se na okraji rány [21,53]. Na základě angiogenních stimulů migrují proliferující endoteliální buňky do místa poranění. Angiogenezi stimuluje tkáňová hypoxie, kyselina mléčná, biogenní aminy a cytokiny produkované makrofágy, krevními destičkami a lymfocyty [15,32]. Buněčným dělením se v místě poranění vytvářejí malé „pupeny“ nebo „klíčky“, které se postupně formují v trubkovité útvary směřující k epidermis. Spojením s ostatními arteriálními nebo venózními pupeny vzniká funkční kapilární síť [15,53]. Tato nově vzniklá kapilární pleteň mění vzhled rány na lososově červenou/růžovou barvu, což svědčí o správné krevní cirkulaci. Pokud však rána jeví známky naředlé barvy s povlaky nebo s ostře červenými útvary, jedná se o známku neadekvátního krevního zásobení, stagnace hojení nebo infekce. Optimální vlhkost a teplota urychluje proces hojení [22,5].

Epitelizace

V této fázi probíhá další migrace, proliferace a diferenciacie buněk, jejímž výsledkem je překrytí povrchu rány a vytvoření tak ochranné bariéry [21,53]. Epitelizace charakterizuje migraci epiteliálních buněk napříč povrchem rány, které postupně uzavírají ránu směrem od okraje ke středu [5,21]. Obrovský mitotický potenciál zde mají buňky bazální vrstvy migrující pod strupem směrem k povrchu kůže [21]. Epitelizace může začít také z epitelizačních ostrůvků uvnitř rány, ze zbytků vlasových folikulů, potních a mazových žláz [5,15,53]. Poté, co se migrující buňky z protilehlých okrajů střetnou, dojde k zastavení jejich pohybu. Následně dochází k utváření bazální membrány a postupné diferenciaci epiteliálních buněk v jednotlivé vrstvy epidermis [33]. Proces epitelizace zhoršuje přítomnost nekrotické tkáně a strupu [15].

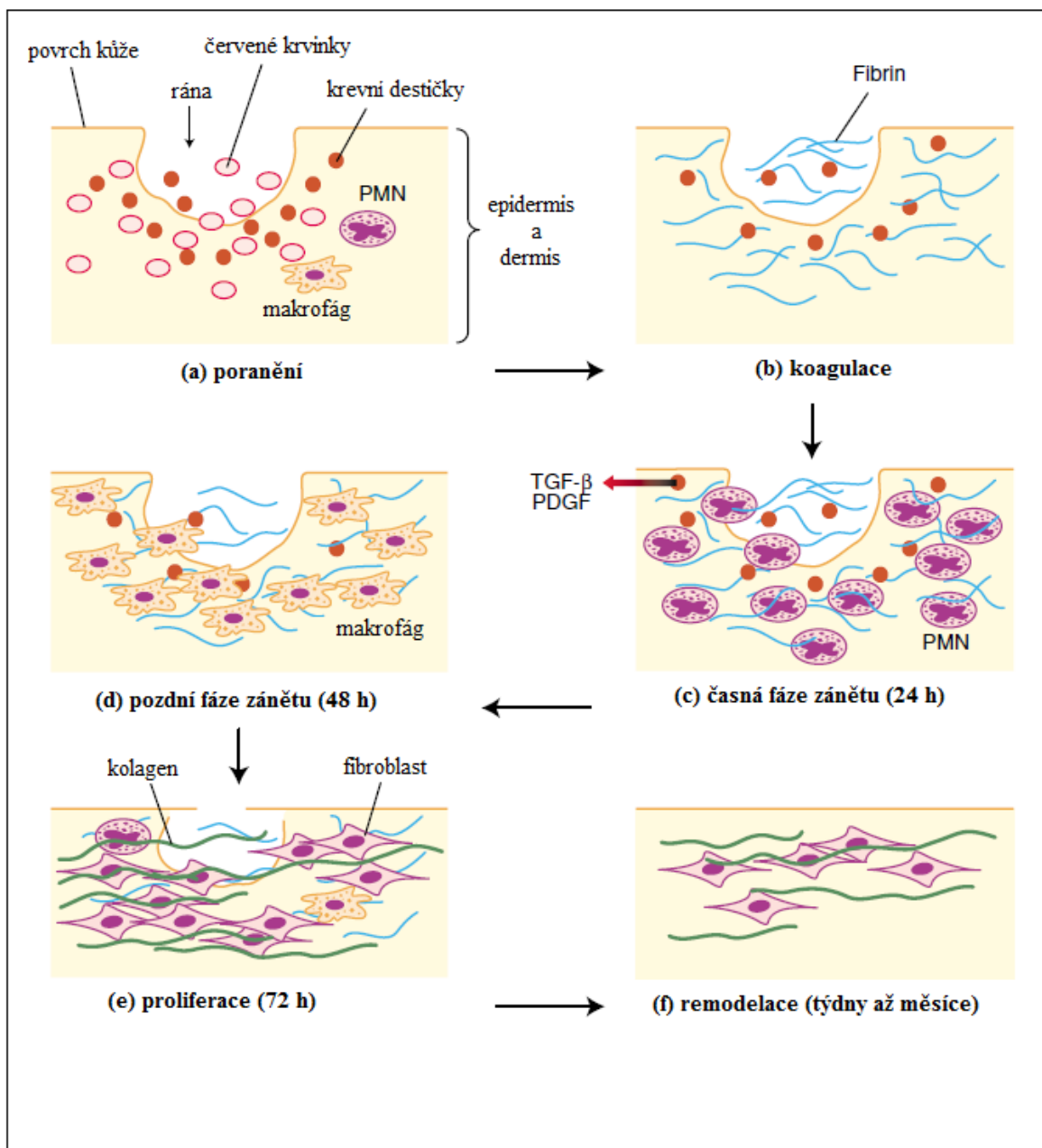
Formování granulační tkáně

Nově vznikající stroma označované jako granulační tkáň nahrazuje fibrinovou sraženinu [44]. Krevní sraženina tvořená kolagenem, krevními destičkami, trombinem a fibronektinem slouží jako síť pro adhezi a migraci buněk [54]. Fibroblasty migrující z nepoškozené dermis na okrajích rány zde hrají zásadní úlohu, proliferují a produkují

proteiny kolagen typu III, glykosaminoglykany a fibronektiny [5,32,54]. Provizorní extracelulární matrix je postupně nahrazena matrix sestávající z kolagenu [54]. Fibroblasty jsou získávány také z cirkulujících fibrocytů, progenitorových buněk kostní dřeně, ale také jsou rekrutovány z multipotentních buněk uložených v dermis a pericytů v blízkosti krevních cév [44]. Později produkce kolagenu ustává a na fibroblasty bohatá granulační tkáň je nahrazena relativně bezbuněčnou jizvou. Buňky v místě rány podléhají apoptóze [32].

2.1.4 Fáze remodelační

Poslední fáze je zodpovědná za vyzrání epitelu a finální formování jizvy. Tato fáze může trvat 1 – 2 roky [36]. Granulační tkáň se zmenšuje, kapiláry se spojují do větších cév, fibroblasty se transformují na myofibroblasty obsahující obrovské svazky aktinových mikrofilament, díky nimž je zajištěna kontrakce rány [21,32]. Kolagenní matrix produkovaná fibroblasty se stává lépe organizovanou. Kolagen III vyzrává a je nahrazen kolagenem I [5,33]. Kolagen tvořící jizvu je ve srovnání s kolagenem uloženým v neporušené tkáni odlišně organizovaný. Taktéž pevnost nově vytvořené jizvy se od originální tkáně liší a nikdy nedosáhne 100 % původní pevnosti. Pevnost jizvy se většinou pohybuje okolo 80 % [5,54]. Tkáň se tak přeměňuje v méně pružnou jizvu, která je náchylnější k traumatu [22]. Správná remodelace kolagenních vláken během formování jizvy je závislá na rovnováze mezi jejich syntézou a odbouráváním. Degradaci kolagenních vláken zajišťují matrix metaloproteinázy (MMP) produkované neutrofilů, makrofágy a fibroblasty. Postupným formováním se jizva stává bezcévnatou a téměř bezbuněčnou [53].



Obr. 6: Schematické znázornění jednotlivých fází hojení ran (upraveno podle [60])

a) Ihned po poranění dochází k vyplavení krevních elementů a vazoaktivních aminů z poškozených cév nacházejících se v dermis. Díky dočasně zvýšené permeabilitě cév může proběhnout infiltrace rány neutrofily (PMN), krevními destičkami a plazmatickými proteiny. Faktory uvolňované těmito buňkami spouští vazokonstrikci. (b) Kaskádovitou reakcí plazmatických faktorů vzniká fibrinová síť. (c) Krevní destičky agregující uvnitř fibrinové sítě produkují řadu faktorů, zejména PDGF a TGF-β, které do místa poranění přitahují PMN. Masivní infiltrace PMN indikuje začátek časně fáze zánětu. (d) PMN jsou přibližně po 48 hodinách od poranění nahrazeny makrofágy, které stejně jako PMN fagocytují odumřelé buňky a poškozenou tkáň. Mimo jiné startují reorganizaci ECM. (e) Přibližně po 72 hodinách je započata proliferací fáze, během které fibroblasty syntetizují kolagen. (f) V poslední fázi dochází k zesíťování kolagenu a jeho reorganizaci. Rána se hojí jizvou v rozmezí týdnů až měsíců.

3 DIABETES MELLITUS

3.1 Definice

Diabetes mellitus (DM) neboli úplavice cukrová patří do skupiny chronických metabolických onemocnění. DM je charakterizována hyperglykemií způsobenou poruchou sekrece inzulínu, rezistence na účinek inzulínu nebo se může jednat o kombinaci obojího. Chronická hyperglykemie vede k poškození, dysfunkci a selhání orgánů obzvláště pak očí, ledvin, nervů a srdce. Poškozeny jsou drobné (mikroangiopatie) i velké cévy (makroangiopatie) [7].

Mezi příznaky DM patří polyurie, polydipsie, ztráta hmotnosti případně polyfagie či rozmazané vidění. Chronické DM se rovněž přisuzují časté infekce. Život ohrožující komplikací DM je hyperglykemie s ketoacidózou, hyperosmolární a hypoglykemické kóma [7].

3.2 Klasifikace

DM rozdělujeme do dvou hlavních typů, které jsou označovány jako diabetes mellitus 1. (DM1) a 2. typu (DM2).

Diabetes mellitus 1. typu nazýváme rovněž jako inzulín-dependentní typ (DM závislý na inzulínu) nebo juvenilní DM. Projevuje se zejména v mládí, avšak jedna z jeho forem LADA (Latent Autoimmune Diabetes of Adults) se může objevit i v pozdějším věku [10]. Příčinou DM1 je absolutní nedostatek inzulínu, který bývá obvykle důsledkem buněčně zprostředkované autoimunitní destrukce β -buněk pankreatu. Hovoříme o tzv. imunitně-zprostředkované diabetes, která tvoří 5 – 10 % všech diabetes. Některé formy DM1 mají neznámou etiologii, přítomná inzulínopenie je bez autoimunitního podkladu. Obecně se tyto formy DM1 označují jako idiopatické. Do této kategorie však spadá jen minoritní počet nemocných [7].

Diabetes mellitus 2. typu neboli non-inzulín-dependentní typ (DM nezávislý na inzulínu) se vyskytuje u 90 – 95 % nemocných [7]. Převážná část pacientů jsou starší 40 let, ale k manifestaci může dojít v kterémkoli věku [9]. Vyskytuje se u obézních pacientů nebo u pacientů s větší distribucí tuku v abdominální oblasti. Riziko vzniku zvyšuje i nedostatek pohybové aktivity, kouření, nadměrný přísun kalorií nebo předchozí gestační diabetes

mellitus. Velkou roli hraje i genetická predispozice [7,9]. Na rozdíl od DM1 se nejedná o ztrátu schopnosti β -buněk pankreatu produkovat inzulín. Příčinou DM2 je jev označovaný jako inzulínová rezistence (pokles vnímavosti receptorů pro inzulín), při kterém orgány, zvláště játra, tuková tkáň, kosterní a srdeční sval, nedokážou adekvátně reagovat na inzulín a vstřebávat glukosu [9]. Celý proces vede postupně ke zvyšování nároků na sekreci inzulínu. Přetrvávající hyperinzulinizmus posléze navodí stav, kdy β -buňky pankreatu nejsou schopny již dále zvládat vyšší nároky na produkci inzulínu, až se nakonec jeho tvorba úplně vyčerpá [8].

3.3 Komplikace

DM2 probíhá často skrytě a bezpříznakově, a to může trvat i řadu let. Větší nebezpečí než samotné onemocnění způsobují akutní a obzvláště pak chronické (pozdní) komplikace [11]. Akutní komplikace DM2 zahrnují hyperosmolární neketoacidotický syndrom a hypoglykemické kóma. U DM1 je závažnou akutní komplikací diabetická ketoacidóza a rovněž hypoglykemické kóma [12]. Z pozdních jsou typické mikrovaskulární a makrovaskulární komplikace. Všechny ohrožují pacienta na kvalitě života i na životě samotném. Mikrovaskulární komplikace souvisejí s poškozením drobných cév a jsou spojovány s diabetickou retinopatií, nefropatií a neuropatií. Zato u makrovaskulárních komplikací dochází k poškození endotelu středně velkých a velkých tepen. Přítomné aterosklerotické změny mohou vyústit v ischemickou chorobu srdeční (ICHS), ischemickou chorobu dolních končetin (ICHDK) a cévní mozkovou příhodu (CMP) [11]. Škála komplikací je rozdílná u obou typů DM. Zatímco pro DM1 jsou častější mikrovaskulární komplikace, u DM2 je to přesně naopak [10,11].

3.3.1 Kožní komplikace

Dosti časté jsou kožní komplikace, které během života postihnou 25 – 50 % pacientů. Část z nich souvisí s nekompenzovanou hyperglykemií (pruritus, kožní infekce, xantomatóza a karotínémie) a po její kompenzaci spontánně vymizí. Druhá část zahrnuje kožní projevy diabetické mikroangiopatie, makroangiopatie a neuropatie. Třetí část souvisí s vlastní terapií DM (lipodystrofie při léčbě inzulínem a alergické kožní reakce). Zcela samostatnou kapitolu tvoří syndrom diabetické nohy (SDN) [11]. SDN označujeme jako tkáňový defekt

distálně od kotníků, jehož výsledkem jsou značné ulcerace, gangrény a v neposlední řadě také amputace [14].

3.3.2 Diabetes a hojení ran

Správná mikrocirkulace zajišťuje výživu tkáně, odstraňuje odpadní produkty a též je důležitá pro zánětlivou odpověď organismu a regulaci teploty [30]. Dlouhotrvající hyperglykemie v raném stádiu diabetes vede ke zvýšení mikrocirkulace. Vysvětluje to zvýšená produkce oxidu dusnatého endoteliálními buňkami jako reakce na poškození stěny cév a na zvýšení viskozity krve způsobené glykosylací hemoglobinu [27].

Postupně se ovšem mikrocirkulace snižuje. Kromě vyšší viskozity krve k tomu přispívá zvýšená agregabilita a adhezivita trombocytů [14], rigidita buněčných stěn daná neenzymatickou glykosylací složek extracelulární membrány. To má za následek deficit kyslíku i živin, hlavně glukosy v periferních buňkách. Organismus to kompenzuje využíváním energie z mastných kyselin, které jsou důležitou součástí buněčných membrán, tím je zpomalená syntéza buněčných membrán i celý proces hojení [27]. Alterace buněčných membrán negativně ovlivňuje pohyblivost a deformovatelnost buněk, jakožto reakce na signální proteiny [31].

Vaskulopatie a abnormality endotelií

Ztluštění bazální membrány a ECM pod výstelkou buněk cév, snížení velikosti kapilár a hyalinizace arteriol může vést ke snížení syntézy oxidu dusnatého. Porušená mikrocirkulace, společně s denervací sympatického nervu a autonomní neuropatií vede k maldistribuci krevního toku. Diabetici mají také porušenou citlivost vůči tlaku a teple. Absence bolesti a abnormální vazodilatační autoregulace přispívají k rozvoji diabetické nohy [29].

Tkáňová hypoxie

Význam hypoxie je stále velice spekulativní. Brzy po úrazu hypoxie stimuluje migraci keratinocytů, angiogenezi, proliferaci a klonální expanzi fibroblastů a produkci klíčových růstových faktorů a cytokinů. Dlouho trvající hypoxie naopak zapříčiňuje reperfuční poškození a taktéž vznik volných kyslíkových radikálů. Rovněž je ovlivněna funkce neutrofilů a makrofágů. Izolované fibroblasty z diabetických ulcerací vykazují známky stárnutí se současně sníženou proliferativní odpovědí na růstové faktory. Makrofágy

vykazují snížené uvolňování cytokinů zahrnující TNF, Interleukin 1 a VEGF, zatímco nadměrná aktivace MMP9 může porušit migraci buněk a vézt k rozpadu některých důležitých proteinů ECM a růstových faktorů [29]. Snížený pCO₂ pod 35 mm Hg vede k narušení procesu hojení. Za takových podmínek nejsou fibroblasty schopny replikovat se a syntéza kolagenu je tak vážně narušena [30].

Prolongovaná zánětlivá fáze

Prolongované hojení zánětlivé fáze u diabetiků je způsobeno opožděným vstupem makrofágů a zhoršenou migrací leukocytů do místa poranění. To je způsobeno slabší **imunitní odpovědí** diabetického organismu [27]. Je ovlivněna chemotaxe a fagocytóza bílých krvinek [31].

Růstové faktory a enzymy matrix metaloproteinázy hrají majoritní roli v regulaci ECM. Růstové faktory posouvají včasnou zánětlivou fázi do pozdní fáze formace granulační tkáně. Špatně hojící se rány se často vyznačují defekty v typu a množství růstových faktorů. U chronických venózních ulcerací bývají zvýšeny zejména prozánětlivé růstové faktory TNF- α , IL-1 β a IL-6. Dlouhotrvající záněť vede k nárůstu neutrofilů a proteázové aktivity. Taktéž zeslabená odpověď růstových faktorů jako je PDGF a TGF- β je často spojována s diabetickými ranami. Mechanismus, jakým dochází k dysbalanci růstových faktorů, není zatím zcela jasný [28].

Hojení ran nevyžaduje pouze tvorbu ECM. Důležitá je také její postupná degradace a remodelace. MMPs jsou enzymy primárně zajišťující tuto degradaci. Regulace je docílena působením jejich inhibitorů – tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMPs). Dysbalance MMP a dalších degradačních enzymů vede ke zpomalení hojení ran [28].

4 JADERNÉ RECEPTORY PPAR

Jaderné receptory neboli receptory aktivované tzv. proliferátory peroxizomů (PPAR) jsou specifické receptory regulující expresi některých genů, které patří do stejné rodiny receptorů jako receptory pro tyreoidální a steroidní hormony [37]. PPARs patří mezi transkripční faktory kontrolující různé dráhy buněčné reparace. Identifikací těchto molekul lze snáze porozumět odpovědím organismu na tkáňové poškození [42]. Tyto pleotropní regulátory hrají důležitou roli v regulaci energetického metabolismu, kromě toho jsou zapojené do dalších procesů jako je zánět, buněčná proliferace a diferenciací [36].

Agonisté PPAR mohou být syntetické molekuly, jež jsou využívány k léčbě hypertriglyceridémie (fibráty) a inzulínové rezistence (thiazolidindiony). Mezi přirozené ligandy PPAR patří mastné kyseliny a jejich deriváty eikosanoidy. Nedávné studie odhalily různé deriváty lipidů aktivující PPARs, ovšem o jejich účincích *in vivo* je známo doposud málo [42].

Rozlišujeme jejich tři izotypy: PPAR α , PPAR β a PPAR γ [37]. V keratinocytech byly zjištěny všechny izotypy, jak v embryonálním, tak v postnatálním období [37,39].

Exprese PPAR α

PPAR α jsou lokalizovány především v buňkách metabolizující mastné kyseliny a v buňkách s vysokou peroxizomovou aktivitou (hepatocyty, kardiomyocyty, proximální tubulus ledvin, střevní sliznice, svaly). Ale nachází se i v cévní stěně buněk hladké svaloviny, endoteliálních buňkách a hnědé tukové tkáni [41,43]. PPAR α jsou exprimovány v keratinocytech lidí a hlodavců, kde hrají důležitou roli v proliferaci a diferenciaci epidermální vrstvy, v obnově homeostázy a neméně také v regulaci apoptózy [38]. Výsledky studií ukazují, že exprese PPAR α je v lidské epidermis velmi nízká. Nicméně důležitost je významná hlavně při diferenciaci keratinocytů a utváření epidermální bariéry [35].

Dále jsou PPAR α exprimovány v mazových žlázách, makrofázích a T-lymfocytech. Taktéž nevyzrálé Langerhansovy buňky exprimují PPAR α , ale ve vyzrálých Langerhansových buňkách u myši je jejich exprese snížena [38].

Funkce PPAR α

Významným účinkem zejména PPAR α a PPAR γ je kontrola homeostázy lipidů. Aktivátory PPAR α ovlivňují metabolismus lipidů při přestavbě epidermis. Bylo také prokázáno, že topická léčba pomocí PPAR α ligandů podporuje diferenciaci, a brání indukci hyperproliferace epidermis u myší [35]. PPAR α aktivátory značně zvyšují tvorbu lamelárních tělísek obsahující lipidy (Odlandovy tělíska) v epidermis. Tyto organely sekretují svůj obsah do extracelulárního prostoru stratum corneum, a vytvářejí tak propustnou epidermální vrstvu [38]. Účinky PPAR jsou systémové i buněčné. Mezi systémové jsou řazeny protizánětlivé, antioxidační a metabolické účinky normalizující inzulínovou rezistenci a cirkulující lipidy [42].

Exprese PPAR γ a PPAR β

PPAR γ jsou lokalizovány především v adipocytech, částečně také v sítnici, v cévní stěně buněk hladké svaloviny, endoteliích, v buňkách jater a kosterního svalstva a ve stopovém množství také v dalších orgánech. PPAR β jsou všudypřítomné a hojně se vyskytující v mnoha tkáních [41,43].

Exprese PPAR v keratinocytech

Predominantně vyskytujícím se typem metabolických jaderných receptorů v lidských keratinocytech je PPAR β , který je vysoce exprimován především v bazálních buňkách, méně v buňkách suprabazálních. Exprese PPAR α a PPAR γ v lidských keratinocytech je značně nižší, a vzor exprese je navíc opačný oproti exprese PPAR β , tzn. nižší v bazálních buňkách, vyšší v buňkách suprabazálních. Lokalizace PPAR β je v bazálních buňkách jak v jádře, tak v cytoplazmě. V suprabazálních buňkách pouze v jádře. PPAR γ lokalizace v suprabazálních buňkách je vázána výhradně na jádro. Epidermis PPAR α deficitních a divokých typů myší jsou až na malé rozdíly stejné. PPAR α deficitní myši nevytvářejí fenotyp spontánně prozánětlivé kůže, pravděpodobně k tomu dochází díky kompenzačních mechanismů ostatních PPAR izotypů [38]. Tyto nálezy naznačují, že PPAR α nehrají zásadní roli v proliferaci a diferenciaci epidermálních buněk, ale také mohou poukazovat na existenci transkripčních faktorů, které kompenzují nedostatečnou expresi PPAR α [35].

PPAR α a záněť

Všechny tři izotypy PPAR jsou v epidermis dospělých myší nedetekovatelné, nicméně po poranění dochází ke zvýšení exprese PPAR α v keratinocytech vyskytujících se na okrajích poraněné kůže do 24 hodin po poranění. Taktéž je zvýšená exprese PPAR γ . Exprese přetrvává přibližně ještě 3 dny po poranění [38,42]. Po poranění dochází jen přechodně ke zvýšení exprese PPAR α . Zvýšená hladina protizánětlivých glukokortikoidů během zánětlivé fáze vede ke zvýšení exprese PPAR α . Po poranění během časné zánětlivé fáze je produkce PPAR ligandů stimulována působením lipoxygenáz a cyklooxygenáz. Inhibice aktivace transkripčního faktoru NF κ B se jeví jako klíčová cesta časné zánětlivé fáze [42]. Transkripční faktor NF κ B zodpovídá za syntézu prozánětlivých cytokinů jako je IL-1 a IL-6, TNF α a také adhezivních molekul ICAM a VCAM. Aktivací PPAR α dochází k potlačení syntézy NF κ B a zároveň ke zvýšení syntézy inhibitoru NF κ B. Mimo to dochází také k ovlivnění genu pro endotelin-1, fibrinogen- β a inhibitor trombinu [41]. Studie ukazují, že protizánětlivý efekt glukokortikoidů může být posilován PPAR α . Testováním účinku dexametazonu u PPAR α deficitních myší byl prokázán jeho slabší protizánětlivý účinek. PPAR α participují nejen diferenciaci keratinocytů, ale rovněž jsou regulátory kožního zánětu. Jako léčiva v oblasti dermatologie mají tyto jaderné receptory velký potenciál [38].

Hojení u PPAR α deficitních myší

Během prvních 4 dní po poranění je hojení ran u deficitních myší zpomaleno, i velikost rány těchto zvířat se zmenšuje pomaleji v porovnání s kontrolními myšmi. Pozdější fáze hojení ovšem rozdíl mezi kontrolními a PPAR α deficitními myšmi nevykazují. Toto přechodné zpomalení v hojení PPAR α deficitních myší koreluje se zvýšenou expresí PPAR α , která se běžně vyskytuje u kontrolních myší během zánětlivé fáze. To vysvětluje proč je během velmi časné zánětlivé fáze množství neutrofilů a monocytů u PPAR α deficitních myší sníženo. Později během procesu hojení už tyto rozdíly v množství imunitních buněk nevidíme, a proto může u PPAR α deficitních myší probíhat v pozdějších fázích normální hojení [38].

5 DIABETICKÝ POTKAN ZDF

Zucker Diabetic Fatty Rat (ZDF, obr. 7) je jeden ze stěžejních modelů zvířat široce využívaných pro výzkum a léčbu DM2. Jedná se o inbrední kmen s diabetogenním fenotypem vzniklý jako následek mutace outbredního kmene Zucker Fatty Rat (ZFR) [25]. ZFR, obézní potkan, je výsledkem spontánní mutace [26]. ZDF potkani jsou na rozdíl od ZFR méně obézní, ale naopak se u nich projevuje těžká inzulínová rezistence, kterou nejsou schopni kompenzovat kvůli stupňující se apoptóze β -buněk pankreatu [25]. Stárnutím potkanů dochází k těžké hyperglykémii vedoucí ke snížení funkce β -buněk pankreatu, ztrátě podstatné masy β -buně, snížení citlivosti jater a ostatních tkání k účinkům glukózy a inzulínu [24]. U samců začíná rozvoj diabetu přibližně za 8 – 10 týdnů po narození. Samice jsou taktéž obézní a podléhají inzulínové rezistenci, nicméně známky diabetu nejeví [25]. Genetickou podstatou obezity ZDF a ní plynoucích komplikací je mutace v receptoru pro leptin (Ob-receptor, fa gene). Leptin, protein s dominantní expresí v tukové tkáni, informuje mozek o množství tukové tkáně, reguluje energetický příjem a výdej. Leptin indukuje pocit sytosti, proto při jeho nedostatku dochází k hyperfagii, snižování energetického výdeje s následným vznikem obezity [26].



Obr. 7: Zdravá (nahore) a diabetická samice (dole)

6 HISTOLOGIE

Histologie je vědní obor zabývající se strukturou buněk a tkání. K jejich studiu je potřeba zhotovit histologický preparát. Aby byly struktury tkáně ve světelném mikroskopu dobře viditelné a rozeznatelné, je nutné z tkání připravit dostatečně tenké a průhledné řezy. K tomuto účelu se využívá tzv. histologická technika. Mezi jednotlivé kroky při zpracování tkání jsou: fixace, zalévání tkáně do parafínu, krájení, barvení a montování.

6.1 Fixace tkáně

Fixace je rychlou a šetrnou metodu denaturace tkáňových bílkovin, která brání autolytickému působení buněčných enzymů. Hraje velmi důležitou roli v celém procesu zpracování vzorku. K jedné z nejpoužívanějších metod fixace patří bezesporu fixace chemická, z níž nejvíce užívanou fixační tekutinou je formol, neboli formaldehyd. Při tomto způsobu denaturace se tkáňový bloček ponoří co nejdříve do zvolené fixační tekutiny, přičemž se dbá na to, aby byl objem tekutiny minimálně 20x větší než je objem tkáňového bločku [2].

6.2 Zalévání tkáně do parafínu

Zalévání tkáně do parafínu představuje soubor několika kroků. Celý proces se skládá ze čtyř etap: *odvodnění tkáně, prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafín, prosycení tkáně parafínem a vlastní zalití.*

K odvodnění tkání se využívá stoupající řada (koncentrace) ethanolů, při které je minimalizováno riziko smrštění tkáně [2].

Pro dokonalé odstranění ethanolu ze tkání, se vybírá látka se schopností rozpouštět parafín a zároveň taková látka, která se mísí s bezvodým ethanolem. Při nedokonalém odstranění ethanolu ze tkání dochází k jejich ztvrdnutí, s čímž souvisí i zhoršené krájení. Nejběžnější látkou, která se v praxi využívá, je xylen. Jde o látku s nižším bodem varu (140 °C), jehož nevýhodou jsou však kancerogenní účinky. Z dalších látek je to například benzen (80 °C), methylbenzoát (190 °C), methylsalicylát (240 °C) a cedrový olej (240 °C) [2].

Po prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafín následuje prosycení tkáně parafínem. Tkáň se přenáší přímo do parafínu zahřátého v termostatu na 56 – 58 °C. Prosycení probíhá

ve 2-3 lázních parafínu. Teplota parafínu v lázni nesmí překročit 58 °C, protože by došlo ke ztvrdnutí a smrštění tkáně, která by se poté špatně krájela i barvila [2]. Všechny předešlé kroky se dnes provádí automaticky pomocí autotechnikonu (obr. 12).

K vlastnímu zalití používáme zkvalitněného a přefiltrovaného parafínu. Parafín, který byl použit k prosycení tkáně, se nepoužívá. V praxi se běžně k zalévání používají kovové komůrky o různých velikostech. Dnes se hojně využívá tzv. parafinových zalévacích linek. Sestávají z parafinového dispenzeru, předehřívacího a chladícího modulu. [2]

6.3 Krájení tkáně

Ke krájení tkáně lze využít 3 druhy mikrotomů: sáňkový, rotační nebo zmrazovací tzv. kryotom. V našem případě jsme použili mikrotom sáňkový. Nejdůležitější součástí mikrotomu je mikrometrický šroub, který umožňuje nastavení požadované tloušťky řezu v mikrometrech (μm). Optimální tloušťka řezu se pohybuje kolem 5 μm . Pro upevnění parafinového bločku slouží svorka. Další svorka slouží k upevnění žiletky [2].

6.4 Barvení tkáně

Barvení tkáně sestává ze tří kroků: odparafinování, vlastní barvení a odvodnění.

1. Odparafinování

Jelikož byly použity vodné roztoky barviv, musel se před vlastním barvením zařadit krok pro odparafinování. Odparafinovací řada sestává se 4 lázní xylenu, díky němuž dojde k rozpuštění parafínu. Protože xylen se také ve vodě nerozpouští, musí se řezy dále převést sestupnou řadou ethanolů [2].

2. Vlastní barvení

Barvení je důležitou součástí celého procesu tvorby histologického preparátu. Neobarvený preparát není ve světelném mikroskopu viditelný, jednotlivé složky tkáně nelze rozeznat a to z důvodu jejich téměř stejné lomivosti světla. Podle toho, zda se jednotlivé složky tkáně barví kyselými či zásaditými barvivy, rozeznáváme struktury eozinofilní, bazofilní nebo neutrofilní. Bezsporně nejpoužívanějším kyselým barvivem je eozin, ze zásaditých barviv je to hematoxylin. Druhů barvení je spousta, ale téměř vždy se jedná o kombinaci barviva bazické povahy s barvivem kyselým [2].

3. Odvodnění

Po dobarvení se řezy odvodňují vzestupnou řadou ethanolů. Nakonec se provádí projasnění xylenem, po kterém by měly být řezy zcela průhledné.

6.5 Montování řezů

Finálním krokem tvorby histologického preparátu je montování řezu mezi podložní a krycí sklíčko do montovacího média. Látka používaná jako montovací médium musí mít několik vlastností, musí být průhledná, mít vysoký index lomu a nesmí poškozovat tkáňové zbarvení. V dnešní době se jako montovací média používají pryskyřice a to buď přírodní, nebo syntetické [2]. Takto hotový histologický preparát je možno prohlížet ve světelném mikroskopu.

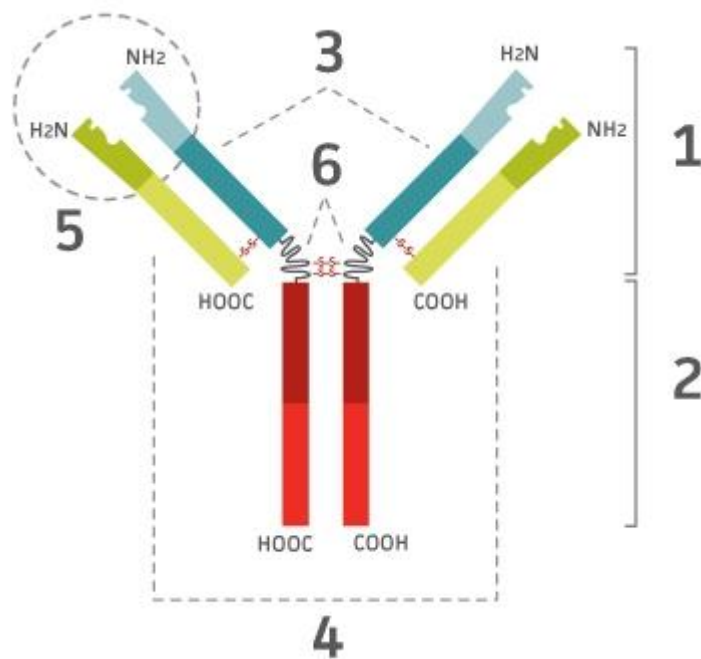
7 IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemie (IHC) je vyšetřovací metoda, která se používá ke studiu buněčných nebo tkáňových antigenů [50]. K identifikaci buněk využívá imunologických principů, při nichž dochází ke specifické vazbě antigenu a protilátky. IHC zaujímá v dnešní době důležité místo jak ve výzkumu, tak i v histopatologické diagnostice [1].

Antigeny jsou molekuly rozpoznávané imunitním systémem, které vyvolávají tvorbu protilátek. Nejvýznamnějšími antigeny jsou proteiny, polysacharidy, ale také lipidy nebo lipoproteiny [49]. Vazebná místa pro protilátku se označují jako antigenní determinanty (epitopy). Jedná se o vysoce specifické oblasti antigenu [1].

Protilátky jsou imunoglobuliny (glykoproteiny, obr. 8) specificky reagující s antigenem. Sestávají ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců spojených disulfidickými můstky. Variabilní domény na N-konci těžkého i lehkého řetězce společně vytvářejí vazebné místo pro antigen [49]. Podle toho, zda jsou použité protilátky produkovány z jednoho nebo více klonů plazmatických buněk, rozlišujeme protilátky monoklonální a polyklonální.

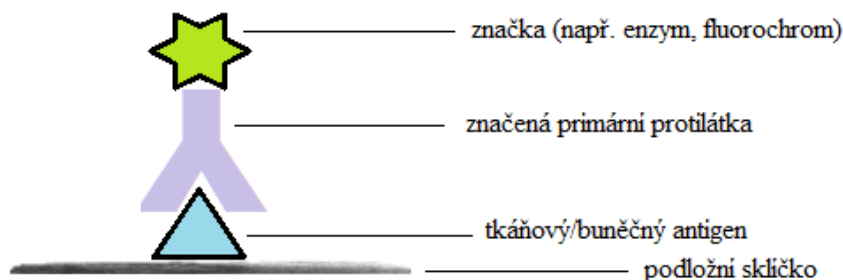
Komplex antigen-protilátka může být vizualizován různými značkami, např. fluorochromy, enzymy, biotinem, radioizotopy, koloidními částicemi [1].



Obr. 8: Schematické znázornění imunoglobulinu G (upraveno podle [61])

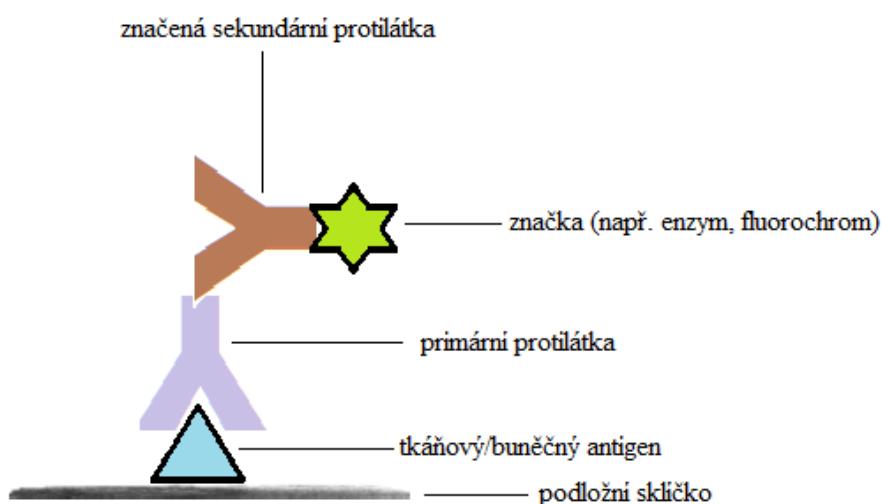
1 – Fab fragment, 2 – Fc fragment, 3 – těžký řetězec, 4 – lehký řetězec, 5 – vazebné místo pro antigen tzv. paratop, 6 – pantová (hinge) oblast

V IHC rozlišujeme dvě metody průkazu, přímou (obr. 9) a nepřímou (obr. 10). U přímé metody je antigen rozpoznán přímo značenou primární protilátkou, nejčastěji fluorochromem nebo enzymem.



Obr. 9: Schematické znázornění přímé metody IHC

V současnosti více využívanými a zejména citlivějšími metodami, jsou metody nepřímé, které probíhají v několika krocích. Nejdříve dojde k navázání specifické nekonjugované primární protilátky na antigen. V dalším kroku se přidá konjugovaná sekundární protilátka, která je namířená proti Fc fragmentu primární protilátky. Tento popis platí pro tzv. dvoustupňovou metodu. V případě trojstupňové metody se do reakce přidává ještě další konjugovaná protilátka (terciární) [1].



Obr. 10: Schematické znázornění nepřímé metody IHC

Pro imunohistochemickou detekci antigenu je nutné používat řezy v rozmezí 3 – 7 μm . Řezy tenčí než 3 μm se barví imunohistochemicky slaběji. Naopak u řezů tlustších víc jak

7 μm může dojít během procesu k odplavení tkáně. Stejně tak může být znemožněna i samotná analýza výsledného barvení [47].

Důležitou součástí každého imunohistochemického barvení je pozitivní a negativní kontrola. Slouží jako důkaz, že každé IHC barvení (vzorek) bylo provedeno úspěšně s očekávanou citlivostí a přesností [48]. Pozitivní i negativní kontroly by měly být zahrnuty v každém barvicím panelu [47].

Demaskování epitopů

Fixace tkáně formalinem je důležitým krokem ve zpracování histologických i imunohistochemických vzorků. Způsobuje denaturaci bílkovin a zabraňuje tak autolytickému působení enzymů na tkáň [2]. Dnes je však dobře známo, že pro většinu tkáňových antigenů může fixace formalinem vést ke ztrátě imunoreaktivity [50]. Ačkoliv je morfologie tkáně zachována, dochází během fixace také ke konformačním změnám tkáňových proteinů [49]. Avšak ne všechny peptidy jsou tomuto fenoménu vystaveny [50]. Jiná studie popisuje, že při demaskování nedochází pouze k zpřístupnění epitopů, nýbrž i elektrostatických nábojů, které jsou důležité pro vazbu s protilátkou [49].

Proto se provádí tzv. revitalizace antigenu (Antigen Retrieval). Nepříznivé vlivy fixace lze zmírnit za použití proteáz, zahřátí tkáňových řezů v autoklávu nebo tlakové nádobě, nejčastěji však v mikrovlnné troubě.

Blokace endogenní aktivity enzymů

Při IHC se používají protilátky značené enzymem např. křenuvá peroxidáza (HRP), alkalická fosfatáza (ALP), které nám umožňují vizualizovat místo vazby imunokomplexu, tedy antigenu a protilátky. Tyto enzymy se ovšem přirozeně vyskytují i v buňkách tkání. Proto je důležité tuto endogenní aktivitu enzymů blokovat, jinak by mohlo dojít k interferenci při detekci antigenů a tím i k falešně pozitivním výsledkům [51]. K utlumení endogenní aktivity enzymů se využívá jejich substrátů.

Blokace pozadí

Blokace pozadí zlepšuje citlivost testu snížením interference pozadí. Výběr vhodného blokovacího systému závisí na antigenu samotném a také na použité detekční značce. K blokování nespecifických vazeb pozadí se využívá nespecifické sérum, bovinní sérový albumin (BSA), sušené mléko nebo komerčně dostupné pufrý [51].

V nedávné studii byl ovšem tento po několik desítek let přijímaný fakt důležitosti blokace pozadí vyvrácen. Hodnocení proběhlo na tkáňových řezech s blokovacím krokem a bez něj. U vzorků bez blokovacího kroku nebyl překvapivě zjištěn žádný sklon k nespecifickým vazbám [52].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

K experimentu jsme vybrali skupinu kontrolních a diabetických potkanů ZDF ve stáří 16-20 týdnů, kterým jsme na hřbetě vytvořili excizní kruhovou ránu o průměru 2 cm. Do každé skupiny i intervalu jsme zahrnuli 3 – 5 potkanů. Histologicky a imunohistochemicky jsme zhodnotili rány v různých časových intervalech hojení. Jednalo se o interval d0 (zdravá kůže), d1 (den 1), d3 (den 3), d5 (den 5), d10 (den 10), jizva. Kůže pro získání obrazu normální neporušené tkáně, d1 – d3 zahrnující časnou a pozdní zánětlivou fázi, d3 – d10 fázi proliferační a d10 – jizva fázi remodelační. Odebranou tkáň jsme následně zafixovali, zalili do parafínu, nakrájeli na podložní sklíčka a obarvili dle Massonova modrého a/nebo zeleného trichromu. Taktéž jsme provedli imunohistochemické barvení za použití PPAR α protilátky.

8 PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ PRO HISTOLOGII

8.1 Odběr materiálu a fixace tkáně

Potřeby: latexové rukavice (Chemos, Cítov, CZ), anatomická pinzeta (Medin, Nové město na Moravě, CZ), skleněné nádoby s uzávěrem (P-LAB, Praha, CZ), filtrační papír (P-LAB, Praha, CZ), tužka, chirurgické nůžky (Wittex, Simbach, DE)

Chemikálie: formol p.a. (40% roztok formaldehydu = 100% formol, k fixaci se používá 4 % roztok formaldehydu) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, US)

V celkové narkóze jsme potkanům odebrali ránu s cca 2 mm okrajem. Tuto jsme poté urovnali na filtračním papíře a uložili do roztoku formaldehydu minimálně na 24 hodin.

8.2 Zalévání tkáně do parafínu

Přístrojové vybavení: autotechnikon Leica (Leica Microsystems, Buffalo Grove, US), kovová nádoba (Leica Microsystems, Buffalo Grove, US), zalévací linka Medite TES 99 (Medite, Dietikon, CH)

Chemikálie: 96% ethanol p.a. (Penta, Praha, CZ), koncentrovaný aceton p.a. (Penta, Praha, CZ), xylen p.a. (Penta, Praha, CZ), parafín (Bamed, České Budějovice, CZ)

Potřeby: latexové rukavice (Chemos, Cítov, CZ), anatomická pinzeta (Medin, Nové město na Moravě, CZ), plastové histologické kazety (P-LAB, Praha, CZ), zalévací komůrky (Sakura, Alphen aan den Rijn, NL), plastové prstence (P-LAB, Praha, CZ)



Obr. 11: Parafínová zalévací linka

Tab. 1: Časové schéma jednotlivých lázní v autotechnikonu

Lázeň	Čas
1 alkohol	30 min.
2 alkohol	60 min.
3 alkohol	120 min.
4 alkohol	120 min.
5 alkohol	210 min.
aceton	30 min.
aceton II.	30 min.
1 xylool	30 min.
2 xylool	60 min.
3 xylool	120 min.
1 parafín	po zbytek doby
2 parafín	po zbytek doby

Po fixaci jsme provedli prosycení tkání parafínem v autotechnikonu (obr. 12), kde zalévání probíhá automaticky dle nastaveného časového programu (tab. 1). Využitím parafínové zalévací linky (obr. 11), jsme prosycené tkáně zalili do parafínových bločků.



Obr. 12: Autotechnikon Leica

8.3 Krájení tkáně

Přístrojové vybavení: sáňkový mikrotom Leica SM 2000 R (Leica Microsystems, Buffalo Grove, US), vyhřívací ploténky (P-LAB, Praha, CZ), termostat (Sanyo, Japonsko)

Chemikálie: destilovaná voda, želatina s 0,5% kamencem (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA; Penta, Praha, CZ)

Potřeby: anatomická pinzeta (Medin, Nové město na Moravě, CZ), preparační jehly (Medin, Nové město na Moravě, CZ), žiletkové nože (Feather, Osaka, JP), podložní sklíčka (P-LAB, Praha, CZ), Pasteurovy pipety (P-LAB, Praha, CZ)

Dokonale ztuhlé parafínové bločky jsme nakrájeli na sáňkovém mikrotomu (obr. 13). Řezy o tloušťce 6 μm jsme napínali na podložní sklo s destilovanou vodou. Sklíčka jsme poté

přenesli na vyhřívanou plotnu. Po napnutí, jsme přebytečnou vodu slili a řezy nechali doschnout v termostatu nebo volně na vyhřívacích plotýnkách (obr. 13) do druhého dne. Pro lepší ulpění řezu na sklíčku, jsme je nejprve potřeli směsí želatiny s kamencem.



Obr. 13: Sáňkový mikrotom a vyhřívací ploténky

8.4 Barvení

Přístrojové vybavení: laboratorní digestoř (Helago, Hradec-Králové, CZ), laboratorní váhy (KERN)

Chemikálie: xylen p.a. (Lach-Ner, Neratovice, CZ), 96% ethanol p.a. (Lach-Ner, Neratovice, CZ), Weigertův hematoxylin (Lachema, Brno, CZ), pramenitá voda, montovací médium: DPX Mountant For Histology (Sigma-Aldrich, Saint Louis, US), 35% kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Neratovice, CZ), ponceau de xyloidin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), kyselina fosfowolframová (Penta, Praha, CZ), kyselina octová 99% (Penta, Praha, CZ), anilínová modř (Penta, Praha, CZ), oranž G (Penta, Praha, CZ), fuchsin S (Penta, Praha, CZ), světlá zeleň (Penta, Praha, CZ)

Potřeby: latexové rukavice (Chemos, Cítov, CZ), nádobky na barvení preparátů (P-LAB, Praha, CZ), skleněná vložka pro nádobku na barvení preparátů (P-LAB, Praha, CZ), odměrné válce (Kavalier, Sázava, CZ), Pasteurovy pipety (P-LAB, Praha, CZ), podložní deska, krycí sklíčka (P-LAB, Praha, CZ), skleněná tyčinka, preparační jehla (Medin, Nové město na Moravě, CZ), laboratorní lžička, anatomická pinzeta (Medin, Nové město na Moravě, CZ), stopky (Carl Roth, Karlsruhe, DE)

Před vlastním obarvením jsme řezy nejprve odparafinovali v několika lázních xylenu a ethanolu (tab. 2).

Tab. 2: Odparafinovací řada

Chemikálie	Čas
Xylen	4x5 min.
96% ethanol	5 min.
85% ethanol	5 min.
70% ethanol	5 min.

Barvení dle Massonova modrého trichromu

Barvení pomocí Massonových trichromů patří mezi speciální barvicí metody, kterých se využívá zejména ke zvýraznění a průkazu kolagenního vaziva. Podle použitého trichromu se kolagenní vlákna barví modře, zeleně nebo žlutě. Řezy jsme obarvili postupným překládáním z jednoho roztoku do druhého dle postupu uvedeného v tabulce (tab. 3).

Tab. 3: Vlastní postup barvení dle Massonova modrého trichromu

Chemikálie	Čas
Weigertův hematoxylin	5 min.
70% alkohol	2 – 3x oplach
Kyselý alkohol (70% alkohol + kapka HCl)	Diferenciace dle uvážení
Pramenitá voda	5 min.
Destilovaná voda	Oplach
Ponceau	3 min.
Destilovaná voda	Oplach
Kyselina fosfowolframová 1%	5 min.
Anilínová modř	3 min.
Destilovaná voda	Oplach
Kyselina octová 1%	Diferenciace dle uvážení
Pramenitá voda	5 min.

Výsledek barvení:

- a) Jádra buněk – modře až hnědočerně
- b) Kolagenní vazivo – modře
- c) Svalstvo – červeně

Barvení dle Massonova zeleného trichromu

Tkáňové řezy jsme obarvili podle postupu uvedeného v tabulce (tab. 4). Složení roztoku I, II a III je uvedeno v tabulce (tab. 5).

Tab. 4: Vlastní postup barvení dle Massonova zeleného trichromu

Chemikálie	Čas
Weigertův hematoxylin	5 min.
70% alkohol	2 – 3x oplach
Kyselý alkohol (70% alkohol, + kapka HCl)	Diferenciace dle uvážení
Pramennitá voda	5 min.
Destilovaná voda	Oplach
Roztok I	5 min.
Destilovaná voda	Oplach
Roztok II	5 min.
Roztok III	2 min.
Destilovaná voda	Oplach
Diferencovaný alkohol (70% alkohol + kapka HCl)	Diferenciace dle uvážení

Výsledek barvení:

- a) Jádra buněk – modře až hnědočerně
- b) Kolagenní vazivo – zeleně
- c) Svalstvo – červeně

Tab. 5: Složení roztoků pro Massonův zelený trichrom

Roztok I		Roztok II		Roztok III	
Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství	Chemikálie	Množství
Ponceau de xyloidin	1 g	Kyselina fosfowolframová	1 g	Světlá zeleň	3 g
Kyselina octová 99%	1 ml	Destilovaná voda	100 ml	Kyselina octová 99%	4 ml
Destilovaná voda	100 ml			Destilovaná voda	200 ml
Oranž G	1 g				
Kyselina octová 99%	1 ml				
Destilovaná voda	100 ml				
Fuchsin S	1 g				
Kyselina octová 99%	1 ml				
Destilovaná voda	100 ml				

Po dobarvení jsme řezy odvodnili vzestupnou řadou ethanolů a projasnili ve třech lázních xylenu (tab. 6).

Tab. 6: Odvodňovací řada

Chemikálie	Čas
70% ethanol	3x oplach
80% ethanol	3x oplach
96% ethanol	3x oplach
Aceton	5 min.
Xylen	3x5 min.

8.5 Montování a mikroskopování

Přístrojové vybavení: PC sestava hp (hp, Palo Alto, US), mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokyo, JP), kamera DS-Fi1 + DS-U2 (Nikon, Tokyo, JP), program Nis-Elements AR 3.2 (Nikon, Tokyo, JP)

Chemikálie: montovací médium (KLIN PATH, HOLADSKO; Bamed s.r.o. České Budějovice)

Potřeby: krycí sklíčka, skleněná tyčinka, anatomická pinzeta (Medin, Nové město na Moravě, CZ)

Nabarvené a odvodněné řezy jsme v konečné fázi přípravy histologického materiálu zamontovali do montovacího média. Montovací médium jsme nanесли na tkáňový řez pomocí skleněné tyčinky, poté jsme na něj uložili krycí sklíčko a opatrně přitlačili tak, aby médium pokrývalo celý řez. Dbali jsme na to, aby řez nepřekrývaly vzduchové bubliny. Takto hotový histologický preparát jsme nechali doschnout do dalšího dne. Preparáty jsme mikroskopovali při různých zvětšeních: 40x, 100x, 200x, 400x, 600x.

9 PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ PRO IMUNOHISTOCHEMII

Přístrojové vybavení: pH metr (WTW series, Wilhelm, DE), mikrovlnná trouba (Daewoo, Soul, Jižní Korea), PC sestava hp (hp, Palo Alto, US), mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokyo, JP), kamera DS-Fi1 + DS-U2 (Nikon, Tokyo, JP), program Nis-Elements AR 3.2 (Nikon, Tokyo, JP)

Chemikálie: PBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, US), citrátový pufr 0,01M pH 6,0 (kyselina citronová p.a., citrát sodný p.a.; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 30% H₂O₂ p.a. (Penta, Praha, CZ), 5% BSA, sušené mléko (Blotting Grade Blocker, Non Fat Dry Milk; Hercule, California, USA), PPAR α (ab45859, polyklonální králičí; Abcam, Cambridge, UK), Biotinylet Link Universal (Dako LSAB, Code K0679; DAKO, Glostrup, DK), Streptavidin – HRP (System-HRP, Code K0690; DAKO, Glostrup, DK); DAB chromogen (Dako Liquid DAB + Substrate, Code K3468; DAKO, Glostrup, DK), Mayerův hematoxylin (Lachema, Brno, CZ), Xylen p.a. (Lach-Ner, Neratovice, CZ), 96% ethanol p.a. (Lach-Ner, Neratovice, CZ), Montovací médium DPX Mountant for Histology (Sigma-Aldrich, Saint Louis, US), imerzní olej (P-LAB, Praha, CZ)

Potřeby: latexové rukavice (Chemos, Cítov, CZ), nádobky na barvení (P-LAB, Praha, CZ), skleněná vložka pro nádobku na barvení preparátů (P-LAB, Praha, CZ), odměrné válce (Kavalier, Sázava, CZ), umělohmotné zkumavky s uzávěrem (P-LAB, Praha, CZ), stopky (Carl Roth, Karlsruhe, DE), umělohmotná zvlhčovací komůrka M·I·S·T (Bamed, České Budějovice, CZ), xylenový fix super PAP Pen (Beckman Coulter, Brea, US), Pasteurovy pipety (P-LAB, Praha, CZ), automatické pipety a špičky (Eppendorf, Hamburk, DE), krycí sklíčka (P-LAB, Praha, CZ), skleněná tyčinka, anatomická pinzeta (Medin, Nové město na Moravě, CZ), krycí sklíčka (P-LAB, Praha, CZ)

Jednotlivé kroky přípravy histologického preparátu jsou stejné jako u histologického zpracování. Odebranou tkáň jsme nechali prosytit v několika lázních parafinu, poté jsme ji zalili do parafinových bločků a nakrájeli na sáňkovém mikrotomu. Všechny řezy použity pro tuto práci měly tloušťku 5 μ m. Před vlastním barvením jsme řezy nejprve odparafinovali v několika lázních xylenu a ethanolu (tab. 7). Poté jsme řezy mohli imunohistochemicky nabarvit (tab. 8). Nabarvené řezy jsme poté odvodnili vzestupnou řadou alkoholů (tab. 9).

9.1 Odparafínování

Tab. 7: Odparafínovací řada

Chemikálie	Čas
Xylen	3x10 min.
Xylen:100% ethanol; 1:1	10 min.
96% ethanol	10 min.
80% ethanol	10 min.
75% ethanol	10 min.
Destilovaná voda	10 min.

9.2 Imunohistochemické barvení

IHC barvení je výsledkem několika dílčích kroků, které na sebe vzájemně navazují. Mezi jednotlivými kroky jsme tkáňové řezy promývali ve fosfátovém pufru (PBS). Z ekonomických a také praktických důvodů jsme každý řez ohraničili parafínovou tužkou. Na každý řez pak připadlo pouze 100 – 150 μ l konkrétního roztoku. V této práci jsme použili jako chromogenní činidlo diaminobenzidin (DAB), který barví tkáňové řezy hnědě. Jednotlivé kroky a časy jsou uvedeny v tabulce (tab. 8).

1. Demaskování epitopů

K revitalizaci antigenů v našich vzorcích jsme tkáňové řezy povařili v citrátovém pufru (pH 6) za použití mikrovln. Přitom jsme museli dbát na to, aby citrátový pufr nevřel a tím aby nedošlo k uvolnění a odplavení řezů z podložních sklíček. Časové schéma je zaznamenáno v tabulce (tab. 8). Po dokončení revitalizace jsme nádobku s řezy nechali přibližně 20 minut odstát a vychladnout.

2. Blokace endogenní aktivity enzymů

V našem případě jsme jako sekundární protilátku použili protilátku konjugovanou s HRP. Veškerou endogenní aktivitu peroxidázy jsme potlačili působením 3% vodného roztoku peroxidu vodíku na tkáňovém řezu po několik minut (tab. 8).

3. Blokace pozadí

V naší studii jsme blokovací krok do IHC protokolu zahrnuli. K zablokování možných nespecifických vazeb jsme na tkáňových řezech zkoušeli nespecifické sérum, 5% BSA i sušené mléko o koncentraci 2,5% a 5%. Nejlepších výsledků jsme dosáhli s 5% BSA.

4. Aplikace primární protilátky

Použili jsme protilátku proti PPAR α (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Tkáňové řezy jsme inkubovali s primární protilátkou v lednici při 4 °C přes noc (cca 20 hodin). Na tkáňových řezech jsme zkoušeli aplikovat různá ředění protilátky: 1:200, 1:300 a 1:400. Nejreprezentativnějších výsledků jsme dosáhli při ředění 1:300. Protilátku jsme ředili v PBS. Jelikož jsme používali velmi malý objem protilátky (4 μl), bylo nezbytné ředění provést ve dvou krocích. Nejprve jsme protilátku naředili v poměru 1:100 (4 μl + 396 μl) a poté jsme provedli námi požadované ředění, 1:200, 1:300 nebo 1:400. Na jeden řez připadlo vždy 150 μl naředěné protilátky.

Jako negativní kontrolu jsme pro naši práci použili tkáňové řezy, u kterých jsme vynechali krok s primární protilátkou. Pro posouzení účinnosti blokování endogenní peroxidázové aktivity a zkřížené reaktivity detekčního systému jsme použili negativní kontrolu bez primární i sekundární protilátky. Pozitivní kontrolou byl sval, který se nacházel na každém preparátu.

5. Aplikace detekčního systému

Ke kvalitativní identifikaci tkáňových antigenů jsme použili kit firmy Dako, jehož součástí je biotinylovaná sekundární protilátka (biotinem značené kozi anti-králičí a kozi anti-myší imunoglobuliny; Biotinylated Link Universal) a streptavidin konjugovaný křenovou peroxidázou (Streptavidin-HRP). Obojí roztoky byly připraveny rovnou k použití.

Během 15 minutové inkubace se biotinylovaná sekundární protilátka naváže na primární protilátku. V dalším kroku se na tento komplex antigen-primární protilátka-sekundární protilátka váže streptavidin konjugovaný křenovou peroxidázou.

6. Vizualizace

K vizualizaci jsme rovněž použili kit firmy Dako - DAB chromogen (3,3'-diaminobenzidin v chromogenovém roztoku) se substrátovým pufrem (DAB Substrate Buffer). Tento roztok jsme museli před každou aplikací připravit. Na 1 ml substrátového pufru jsme použili 20 μl (1 kapka) DAB chromogenu. V případě pozitivní reakce je v místě antigenu hnědý precipitát.

7. Dobarvení jader

K dobarvení buněčných jader jsme použili Mayerův hematoxylin, který jsme nechali na tkáňových řezech působit přibližně 30 sekund. Poté jsme řezy nechali modrat v tekoucí vodě po dobu 10 minut.

Tab. 8: Časové schéma jednotlivých kroků IHC barvení

Dílčí krok	Chemikálie	Čas
Demaskování epitopů	Citrátový pufr pH 6 (mikrovlny, 800 W, 60% vařit)	3x5 min.
Blokace endogenní aktivity enzymů	3% H ₂ O ₂	3x10 min.
	PBS	3x5 min.
Blokace pozadí	Sušené mléko 2,5%; 5% BSA; nespecifické sérum	30 min.
Aplikace primární protilátky	PPAR α	Přes noc
	PBS	3x5 min.
Aplikace detekčního systému	Biotinylated Link Universal	15 min.
	PBS	3x5 min.
Aplikace detekčního systému	Streptavidin-HRP	15 min.
	PBS	3x5 min.
Vizualizace	DAB Chromogen, DAB Substrate Buffer	4 min.
	Destilovaná voda	2 min.
Dobarvení jader	Mayerův hematoxylin	cca 30 s.
	Tekoucí voda	5 min.

9.3 Odvodnění

Tab. 9: Odvodňovací řada

Chemikálie	Čas
75% ethanol	3x oplach
80% ethanol	3x oplach
96% ethanol	3x oplach
100% ethanol	3x oplach
Aceton	5 min.
Xylen	3x5 min.

9.4 Montování a mikroskopování

Preparáty jsme zamontovali do montovacího média DPX Mountant for Histology stejným způsobem jako u histologických vzorků. Mikroskopovali jsme při zvětšeních: 40x, 100x, 200x, 400x, 600x a 1000x za použití imerzního oleje.

10 VÝSLEDKY

Proces hojení kožních ran vytvořených první, třetí, pátý a desátý den po poranění a v den úplného překrytí rány epitelem (jizva) jsme studovali na histologických řezech u obou sledovaných skupin potkanů ZDF. Pro každou studovanou skupinu a interval jsme vybrali 3 – 5 potkanů (kontrolní samec, diabetický samec, kontrolní samice, diabetická samice). Pro zvýraznění kolagenního vaziva, jsme řezy obarvili modrým a/nebo zeleným Massonovým trichromem. Na fotografiích jsme u jednotlivých skupin zaznamenali přehled průběhu hojení celých ran v mikroskopickém (obr. 16; 17) i makroskopické měřítku (obr. 18).

Kůže

Porovnáním kůže kontrolní a diabetické samice jsme zjistili zřetelný rozdíl v tloušťce dermis (obr. 14/A, B). Diabetické samice se vyznačují přítomností silné vrstvy tukové tkáně, která je u zdravých samic minimální nebo zcela chybí. Větší rozměry vykazuje dermis samců oproti samicím, nicméně samice disponují větším podílem tukové tkáně.

Interval d1

První den po vytvoření rány jsme v nově vytvořené granulační tkáni oproti kontrolám zaznamenali více adipocytů (obr. 19/H; 20/F,G). Oproti kontrolním zvířatům (obr. 19/B, C; 20/B), jsme v ráně diabetických samců zjistili větší podíl erytrocytů a zároveň sníženou denzitu PMN (obr. 19/G; 20/G). Rány diabetiků v časné fázi zánětu (d1) obsahovaly menší množství zánětlivých buněk PMN. Na fotografiích samčích i samičích ran je dobře vidět další obvyklý jev – vytočení okraje rány směrem k povrchu. To způsobí, že sval i podkožní vazivo jsou vytlačeni téměř (obr. 19/A; 20/A) nebo úplně na povrch rány (obr. 20/E).

Interval d3

Třetí den po poranění upoutá pozornost velké množství tukové tkáně v granulační tkáni diabetické rány (obr. 21/D, F; 22/D, E, F). Nově vznikající cévy zejména na okrajích rány, utvářejí jakousi linii směřující k povrchu rány (obr. 21/A, C). V blízkosti cév jsme dosti často zaznamenali adipocyty (obr. 21/A, B, C). U okrajů rány, se nacházelo množství migrujících buněk směřujících k povrchu rány, které migrovaly zejména zespod svalu (obr. 21/A, D; 22/B, D). V ranách zdravých potkanů je již zřetelný „jazyk“ epidermis – keratinocyty, které migrují z okrajů zdravé tkáně nad granulační tkáň (obr. 22/A). U diabetiků k postupu epidermis nedocházelo (obr. 21/D; 22/D). Kromě keratinocytů se

v ráně objevovaly endoteliální buňky a fibroblasty. Zejména na okrajích ran se začínala objevovat první vlákna nevyzrálého kolagenu (obr. 21/E).

Interval d5

U zdravých jedinců pátý den hojení postupuje jazyk epidermis po povrchu stále více ke středu rány (obr. 23/A; 24/B). Z epidermálních buněk nově vznikající epidermis se tvoří nové chlupy (obr. 24/B, C) a mazové žlázy (obr. 24/C). Nejpočetnějšími buňkami reprezentující interval d5 u kontrol jsou fibroblasty syntetizující nová kolagenní vlákna (obr. 24/A, B). V diabetických ranách je stále mnoho tuku, v jeho okolí vznikají ostrůvkovitě nové cévy a kolagenní vlákna (obr. 23/E; 24/D). I u diabetických potkanů začíná být výrazná posouvající se epidermis nad granulační tkáň, tvoří se nové cévy (obr. 23/D; 24/E, F). Na okraji rány diabetických potkanů se tvoří první chlupy (obr. 24/E).

Interval d10

Desátý den po poranění diabetické rány na první pohled zaujmou přítomností velkého množství fibroblastů (obr. 25/E; 26/E, F), mezi kterými v o dost menší míře probíhají kolagenní vlákna. Kontrolní samci vykazují větší podíl kolagenních vláken (obr. 25/B, C) oproti kontrolním samicím (obr. 26/A, B) i diabetickým potkanům. Intenzivní novotvorbu cév lze vidět jak u kontrolních tak diabetických zvířat (obr. 25/A, C, D, E; 26/A, B, D, E, F). V ranách diabetických potkanů je stále přítomný tuk (obr. 25/D, F; 26/F).

Jizva

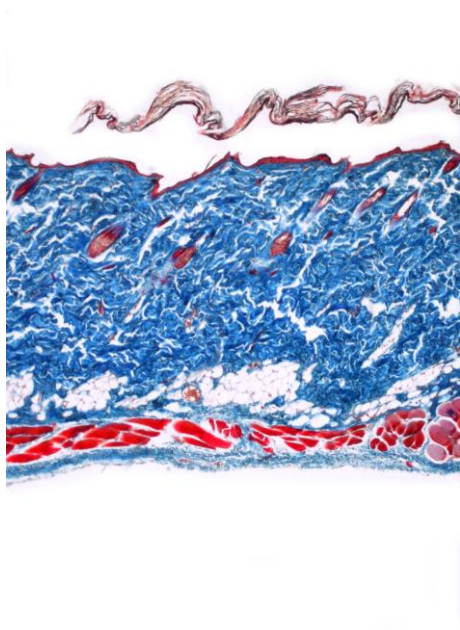
Tkáň zhojená jizvou je plně překryta epidermis a obsahuje spoustu chlupů (obr. 27/A, B, C, D). Diabetičtí a kontrolní samci se hojí lépe v porovnání se samicemi. U samic je jizva také po celé délce kůže, ale kolagenní vlákna uložená v dermis jeví známky menší organizovanosti a vyzrálosti (obr. 28/A, B, D, E). Nejméně kolagenních vláken nalézáme v jizvě diabetických samic a navíc je zde velké množství fibroblastů (obr. 28/E, F).

Imunohistochemické barvení PPAR α protilátkou

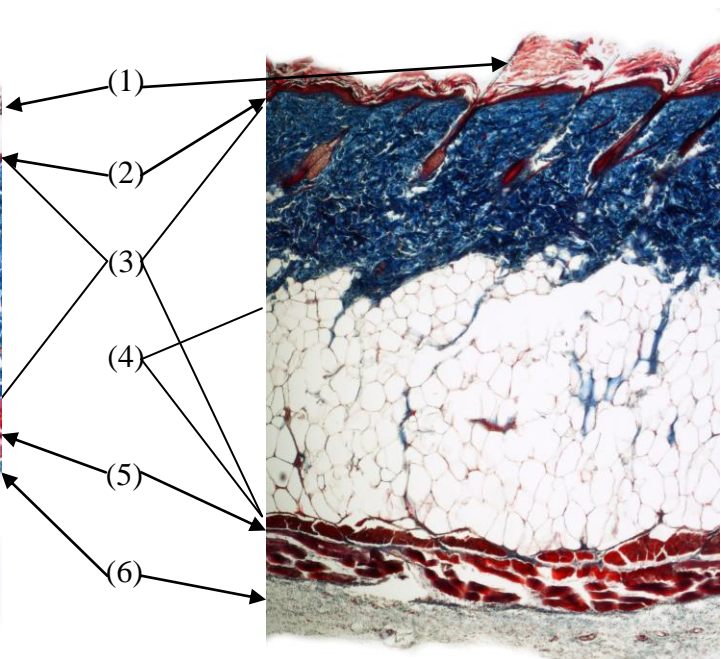
Na řezech neporušené kůže jsme prokázali expresi PPAR α ve svalu (obr. 29/A, B, C; 31/F), epidermis (obr. 29/D, E, F), vlasových folikulech (obr. 29/D, F; 30/C, D, F) a mazové žláze (obr. 29/D, F; 30/E, F). Kromě nepoškozené kůže jsme expresi PPAR α hodnotili první a desátý den po poranění a na ráně zhojené jizvou. Také mnoho přítomných buněk vykazovalo pozitivitu (obr. 29/D; 30/C; 31/A, B, C, D, E, F). Negativní kontroly jsme zaznamenali na fotografiích (obr. 30/A, B).

První den po poranění se v ráně vyskytovaly PPAR α pozitivní lymfocyty (obr. 31/A, C, D). Desátý den po poranění to pak byly silně pozitivní PPAR α makrofágy (obr. 31/F) a keratinocyty na okrajích ran (obr. 29/F). U diabetických zvířat byla pozitivita těchto buněk slabší. Jizva diabetických potkanů vykazovala slabší expresi PPAR α v epidermis oproti kontrolám.

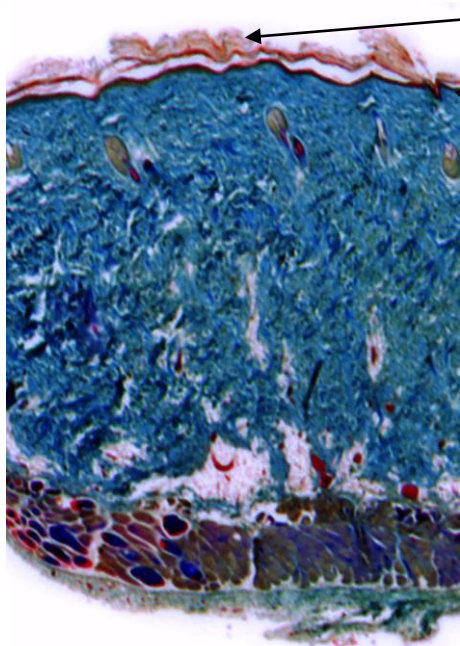
A. Kůže kontrolní samice



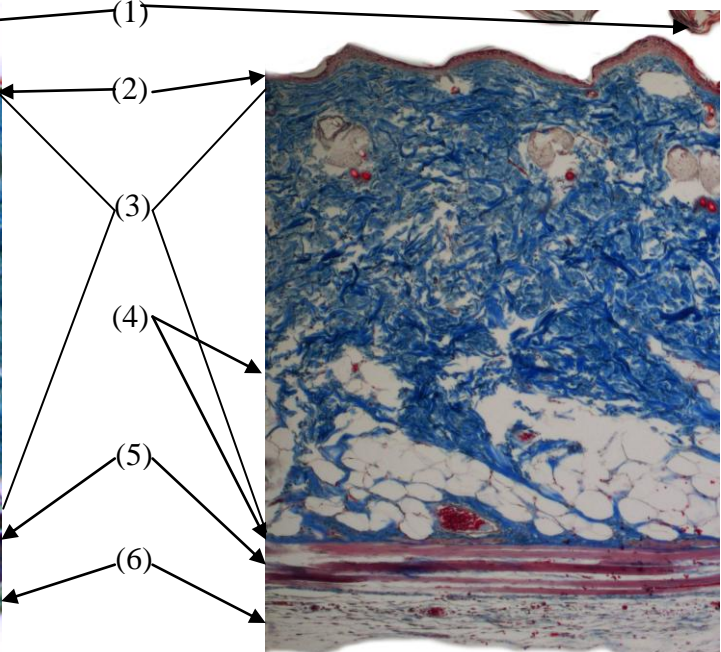
B. Kůže diabetické samice



C. Kůže kontrolního samce

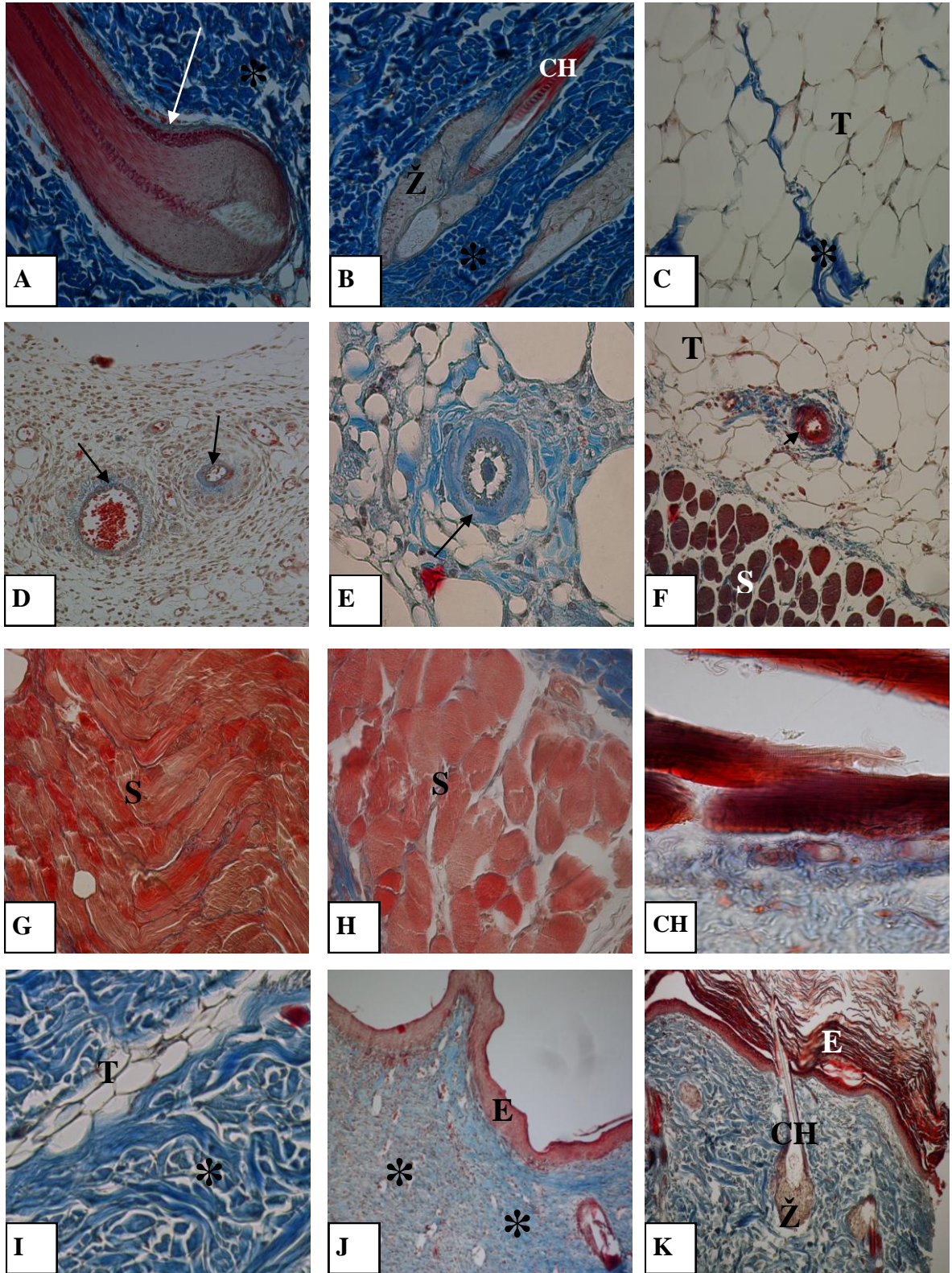


D. Kůže diabetického samce



Obr. 14: Srovnání histologického řezu kůží kontrolních a diabetických potkanů: A – Zdravá samice, kůže, zvětšení 40x (modrý trichrom); B – Diabetická samice, kůže, zvětšení 40x (modrý trichrom); C – Zdravý samec, kůže, zvětšení 40x (modrý trichrom); D – Diabetický samec, kůže, zvětšení 40x (modrý trichrom); (1) deskvamující epidermis, (2) epidermis, (3) dermis, (4) tuková tkáň, (5) sval, (6) subcutis

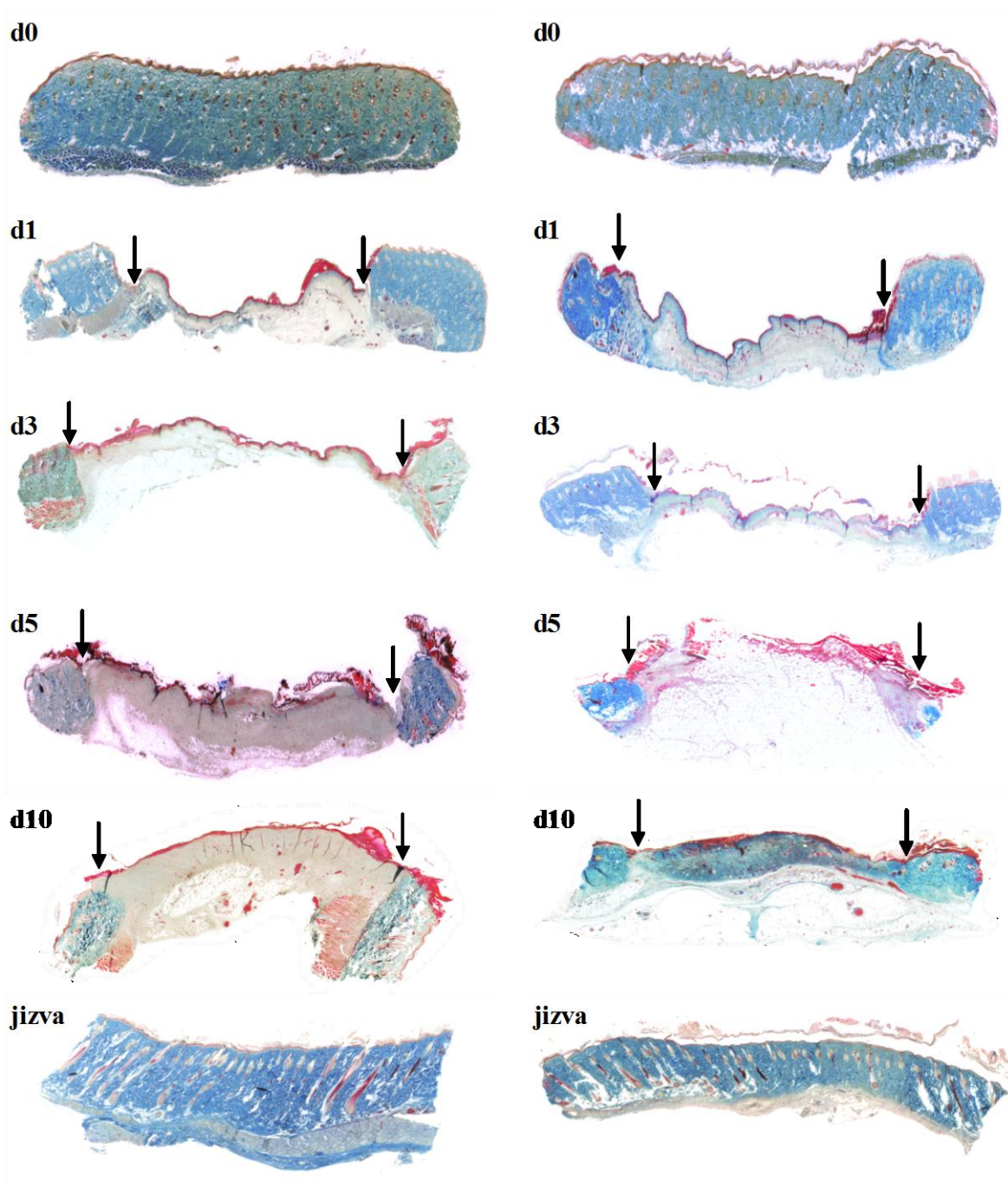
Porovnáním kůže kontrolní a diabetické samice vidíme zřetelný rozdíl v tloušťce dermis. Diabetické samice se vyznačují přítomností silné vrstvy tukovité tkáně, která je u zdravých samic minimální nebo zcela chybí. Taktéž vidíme rozdíl mezi kůží zdravých samic a zdravých samců. Dermis zdravých samců je tlustší na rozdíl od dermis samic. Zřejmé rozdíly jsou také v tloušťce tukové vrstvy diabetických samic a samců. Samice vykazují větší podíl tukové tkáně.



Obr. 15: Kůže a její součásti: A (zvětšení 600x) – chlup (bílá šipka); B (zvětšení 400x) – mazová žláza (Ž) s chlupem (CH); C (zvětšení 400x) – tuková tkáň (T), kolagenní vlákna (*); D (zvětšení 400x) – cévy v granulační tkáni (šipka); E (zvětšení 600x) – arteriola (šipka); F (zvětšení 400x) – céva v tukové tkáni (šipka), tuk (T), sval (S); G (zvětšení 400x) – sval (podélný řez); H (zvětšení 400x) – sval (příčný řez); CH (zvětšení 600x) – sval, příčné pruhování; I (zvětšení 400x) – vyzrálá kolagenní vlákna (*), tuk (T); J (zvětšení 200x) – nevyzrálá kolagenní vlákna (*), epidermis (E); K (zvětšení 200x) – mazová žláza (Ž), deskvamující epidermis (E), chlup (CH)

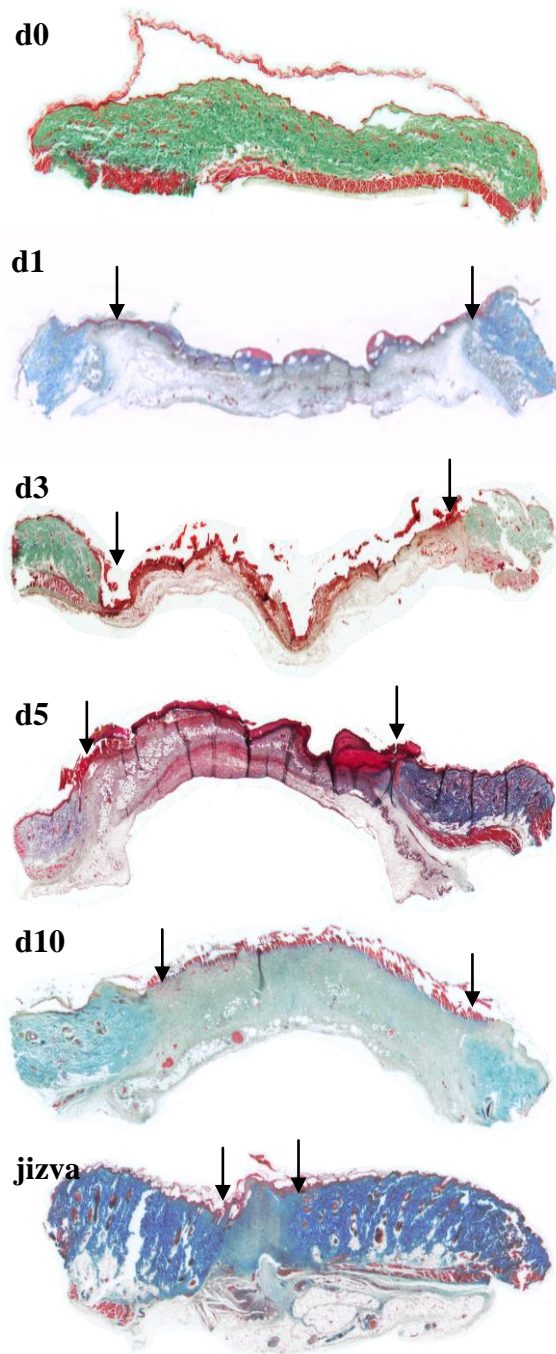
Kontrolní samci

Diabetičtí samci

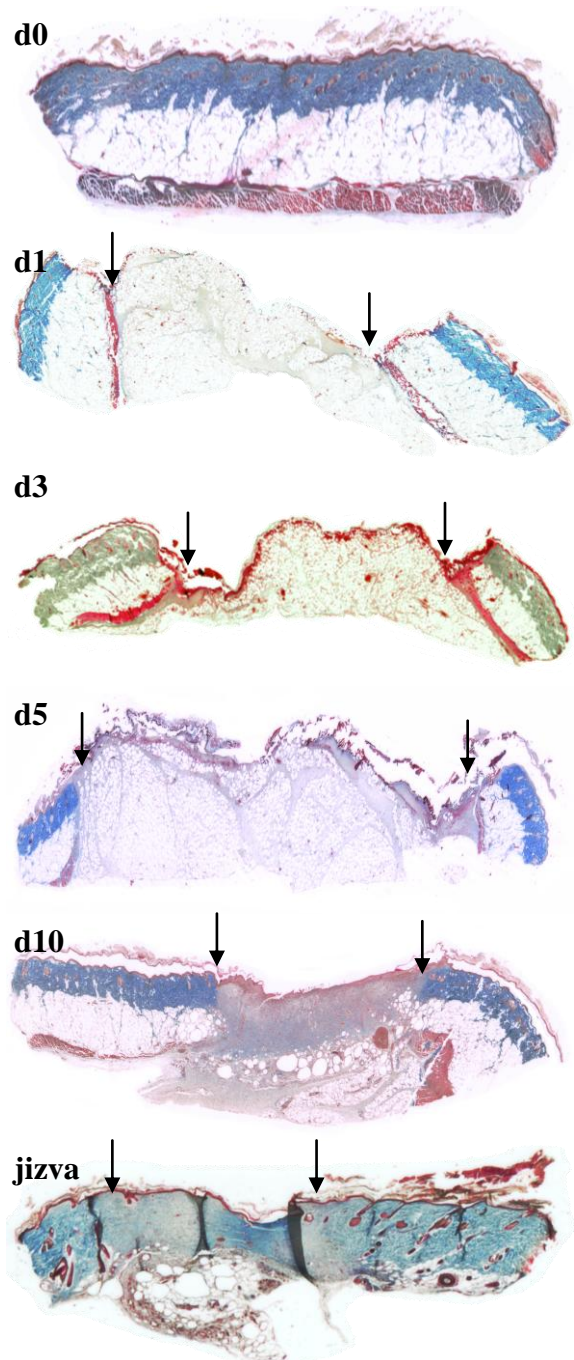


Obr. 16: Průběh hojení – srovnání kontrolních a diabetických samců, okraj rány vyznačen šipkami

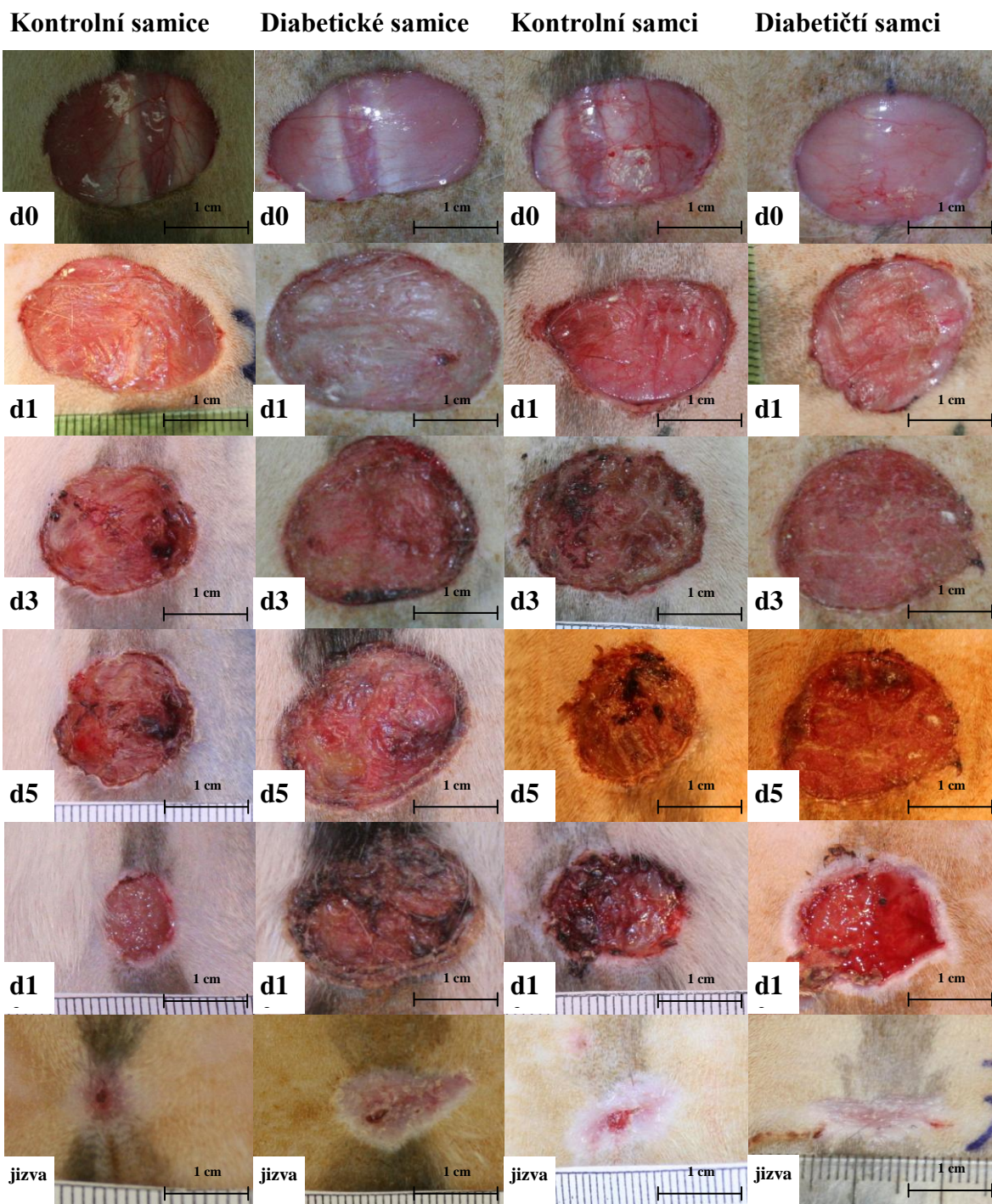
Kontrolní samice



Diabetické samice



Obr. 17: Průběh hojení – srovnání kontrolních a diabetických samic, okraj rány vyznačen šipkami



Obr. 18: Přehled hojících se ran kontrolních a diabetických potkanů v jednotlivých časových intervalech

Interval d0 – čerstvě vytvořená rána je hladká a bledá. Na povrchu můžeme dobře vidět prokrvení tkáně.

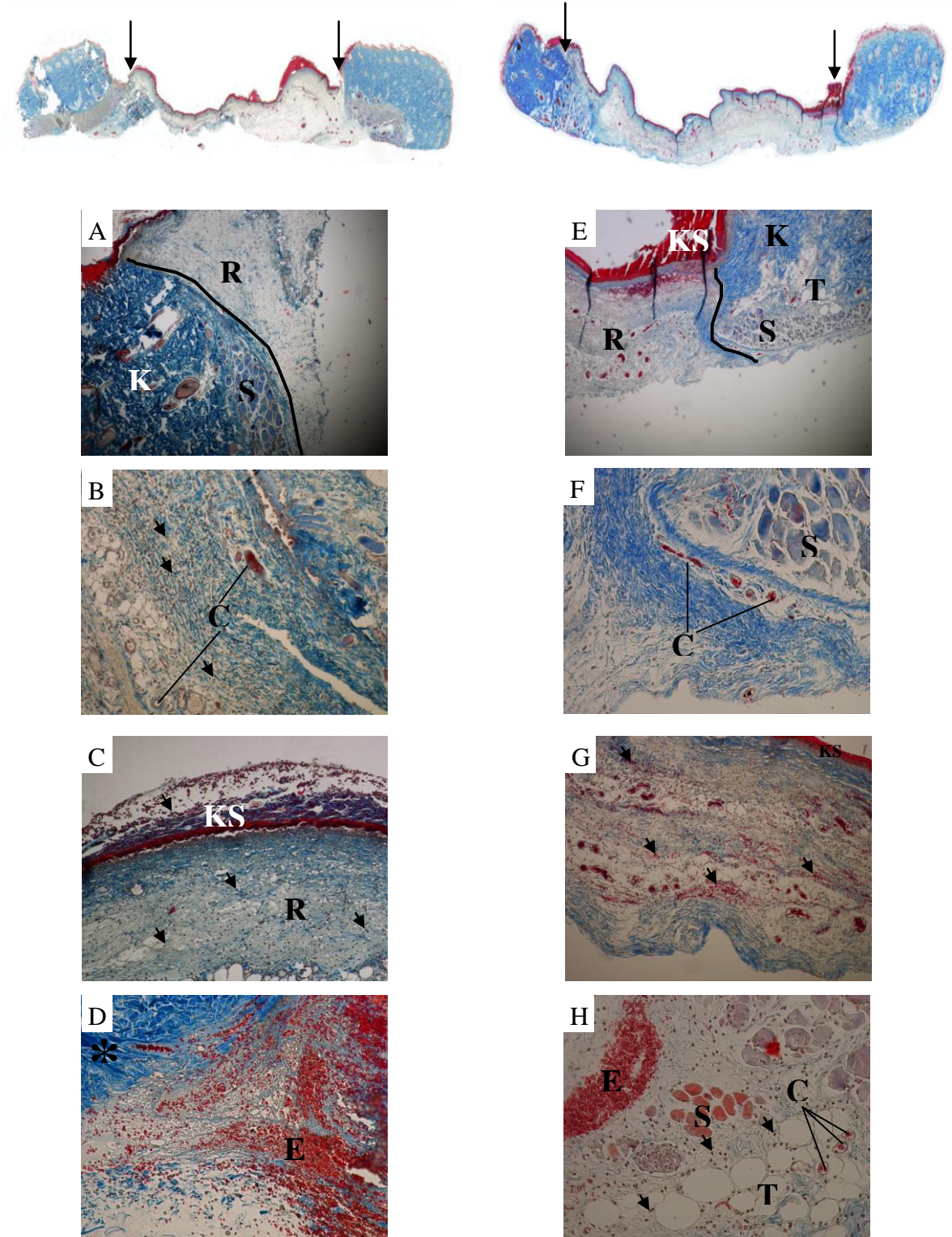
Interval d1 – rána je překryta fibrinovou sraženinou, okraje rány jsou lehce zanícené. Rozměry rány se zvyšují.

Interval d3 – rány kontrolních potkanů se postupně stávají menšími. V porovnání s předchozími intervaly se rány všech skupin jeví tmavší, což je způsobeno probíhající zánětlivou fází a vznikem strupu, rány obsahují stopy nově zakrvácených ložisek.

Interval d5 – u kontrolních potkanů je rána velká asi 1,5 cm a cca 2,5 cm u potkanů diabetických. Ke zmenšování plochy rány dochází díky postupující epitelizaci. Rána se stává více prokrvenou díky nově vznikajícím cévám.

Interval d10 – rozměr rány kontrolní samice je pod 1cm, kontrolního samce cca 1,5 cm, diabetické samice více jak 2 cm a navíc je rána silně zahnisána. Dále lze vidět, že u diabetického samce došlo ke strhnutí strupu, rána je jasně červená. Kontroly vykazují zmenšování plochy ran, u diabetických potkanů plocha zůstává stejná navíc s prolongovanou zánětlivou fází.

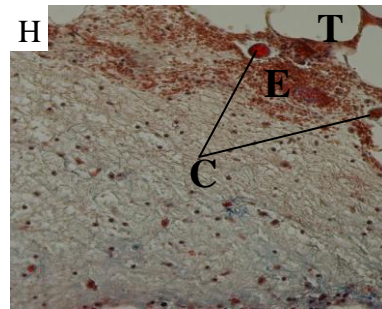
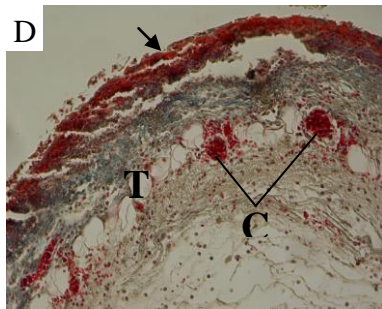
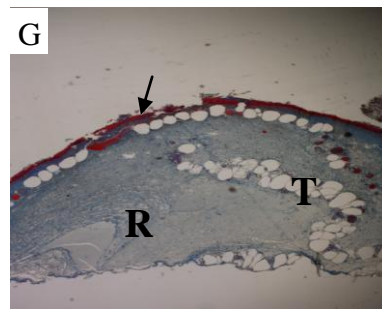
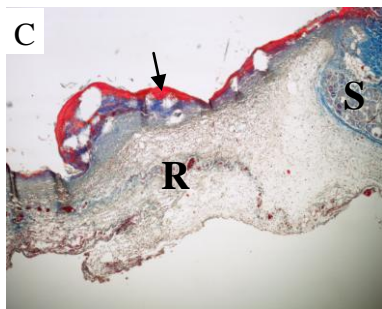
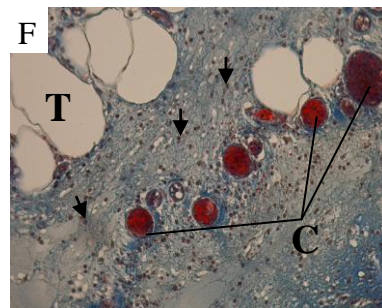
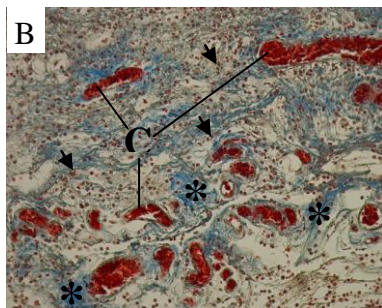
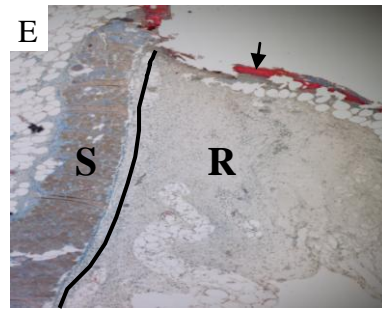
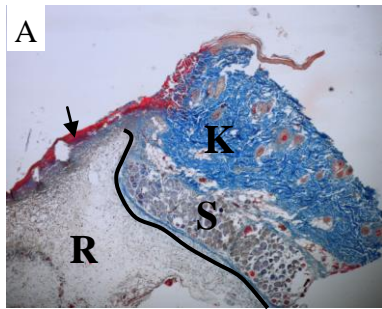
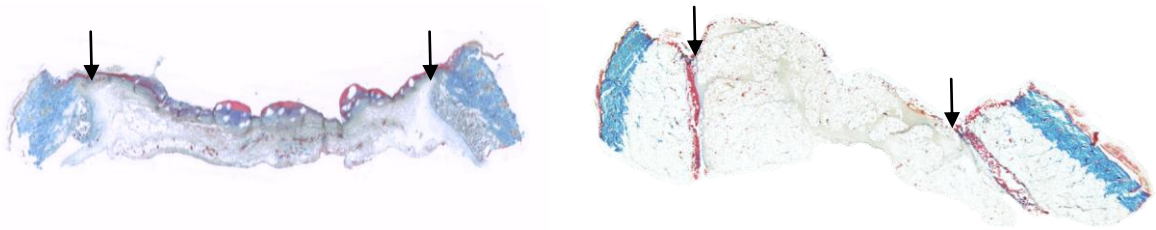
Jizva – u kontrolní samice je po 29 dnech rána kompletně překryta epitelem o šířce přibližně 0,6 cm, u diabetické samice je rána překryta epitelem po 27 dnech, je však méně kontrahována, vykazuje šířku cca 1,8 cm. Kontrolní samec se hojí jizvou po 38 dnech, šířka rány nepřekračuje 1,5 cm. Rána diabetického samce se hojí po 31 dnech, i zde můžeme vidět sníženou kontrakci rány.



Obr. 19: Interval d1 – časná zánětlivá fáze – srovnání kontrolního a diabetického samce:

Kontrolní samec (A – D), okraje rány vyznačeny šípkami: A (zvětšení 40x) – rána (R), okraj rány (černá linie), stočený sval (S), zdravá kůže (K); B (zvětšení 100x) – cévy (C), PMN (šipka); C (zvětšení 100x) – krevní sraženina (KS), rána (R), PMN (šipka); D (zvětšení 100x) – erytrocyty (E), kolagenní vlákna (*)

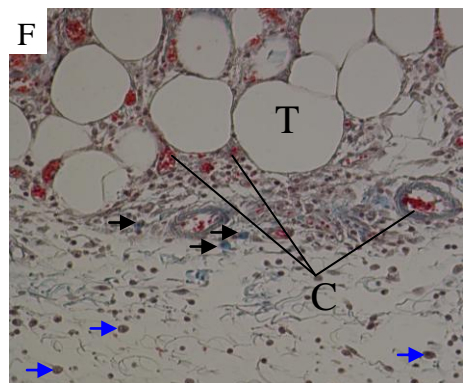
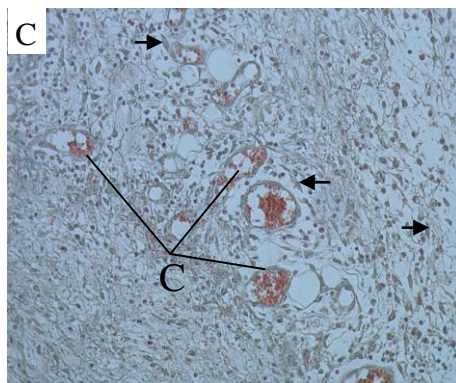
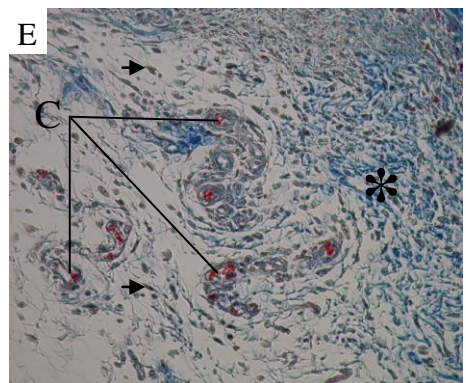
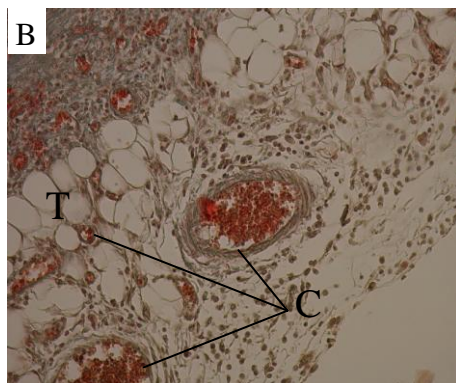
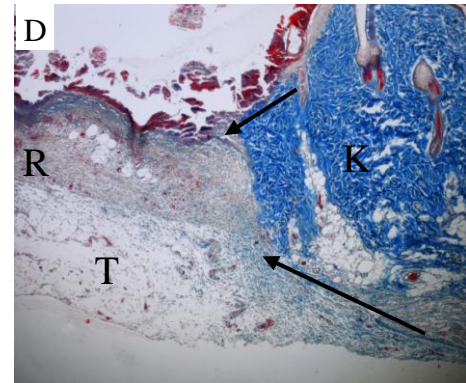
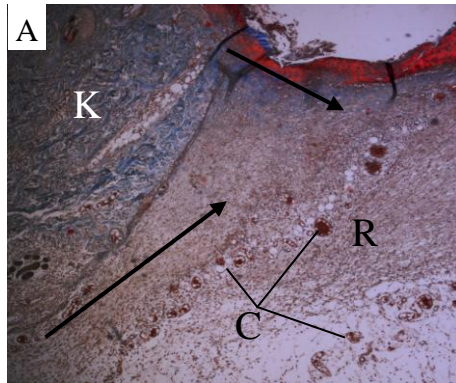
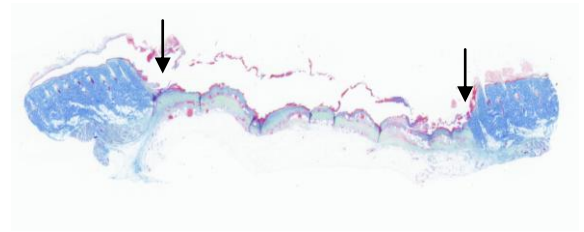
Diabetický samec (E – H), okraje rány vyznačeny šípkami: E (zvětšení 40x) – rána (R), okraj rány (černá linie), stočený sval (S), zdravá kůže (K), tuk (T), krevní sraženina (KS); F (zvětšení 200x) – sval (S), cévy (C); G (zvětšení 100x) – krevní sraženina (KS), erytrocyty (černá šipka); H (zvětšení 200x) – erytrocyty (E), sval (S), tuk (T), cévy (C), PMN (šipka)



Obr. 20: Interval d1 – časná zánětlivá fáze – srovnání kontrolní a diabetické samice:

Kontrolní samice (A – D), okraje rány vyznačeny šipkami: A (zvětšení 40x) – rána (R), okraj rány (černá linie), stočený sval (S), zdravá kůže (K), krevní sraženina (šipka); B (zvětšení 100x) – zánětlivá infiltrace PMN (šipka), cévy s erytrocyty (C), kolagenní vlákna (*); C (zvětšení 40x) – krevní sraženina (šipka), rána (R), sval (S); D (zvětšení 100x) – krevní sraženina (šipka), tuk (T), cévy s erytrocyty (C)

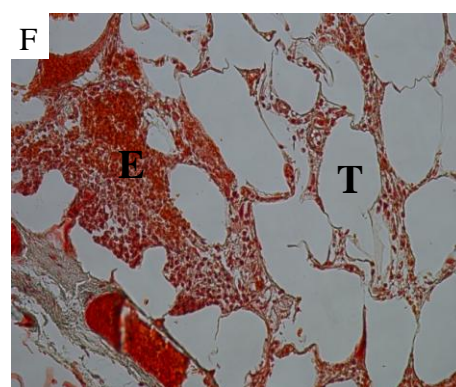
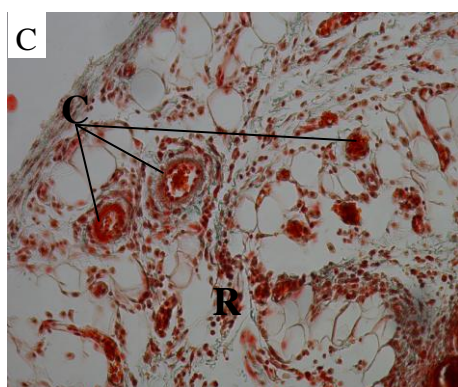
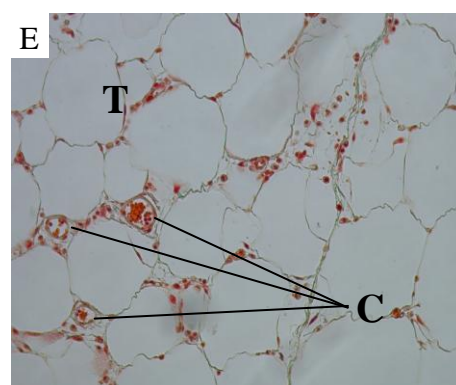
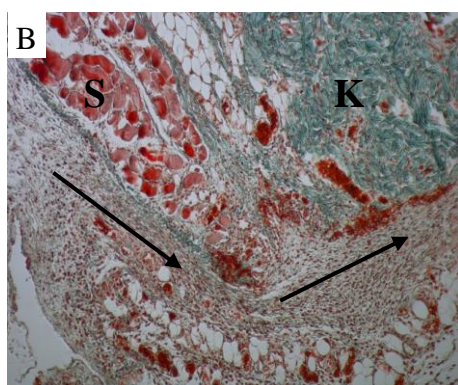
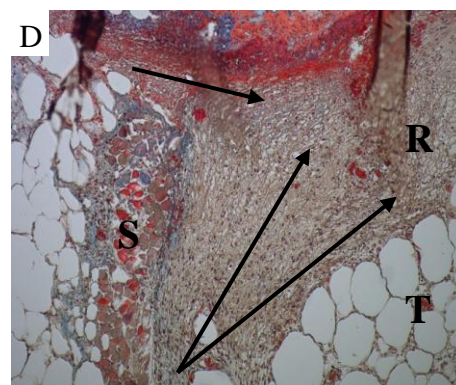
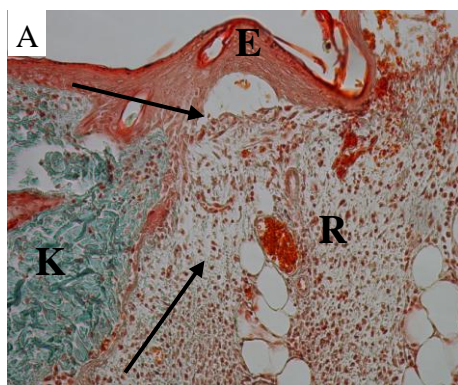
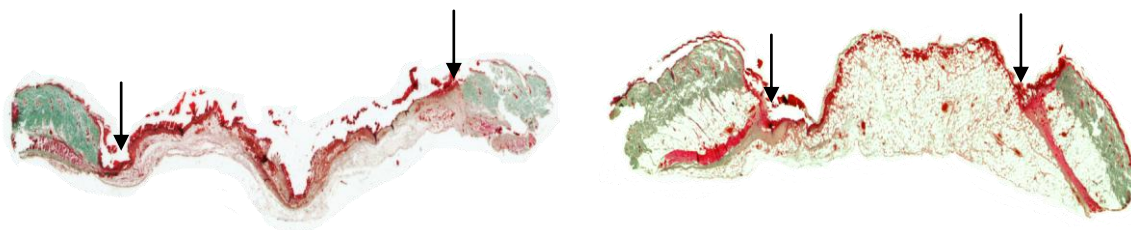
Diabetická samice (E – H), okraje rány vyznačeny šipkami: E (zvětšení 100x) – rána (R), okraj rány (černá linie), krevní sraženina (šipka), stočený sval (S); F (zvětšení 200x) – zánětlivá infiltrace PMN (šipka), tuk (T), cévy s erytrocyty (C); G (zvětšení 40x) – krevní sraženina (šipka), rána (R), tuk (T); H (zvětšení 100x) – erytrocyty (E), tuk (T), cévy (C)



Obr. 21: Interval d3 – pozdní zánětlivá fáze – srovnání kontrolního a diabetického samce:

Kontrolní samec (A – C), okraje rány vyznačeny šípkami: A (zvětšení 100x) – šípkami naznačen směr migrujících buněk, zdravá kůže (K), rána (R), cévy (C); B (zvětšení 200x) – cévy (C), tuk (T); C (zvětšení 100x) – cévy (C), fibroblasty (černá šípka)

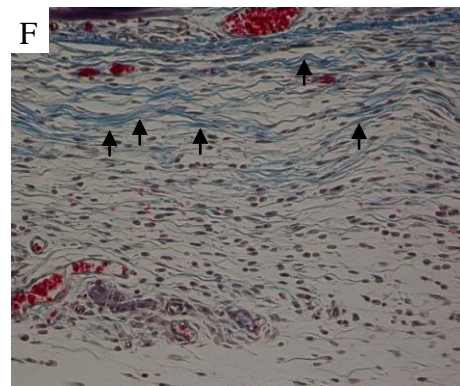
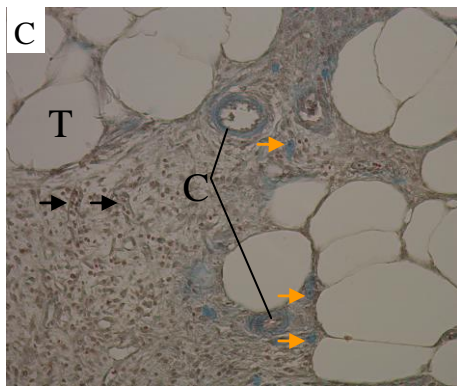
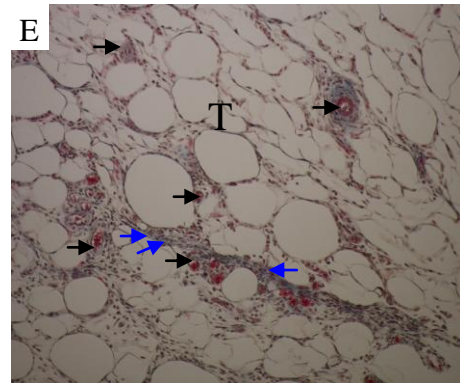
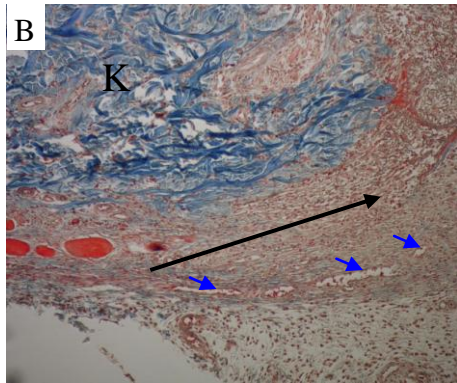
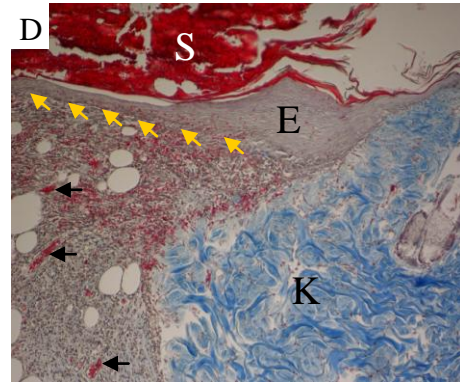
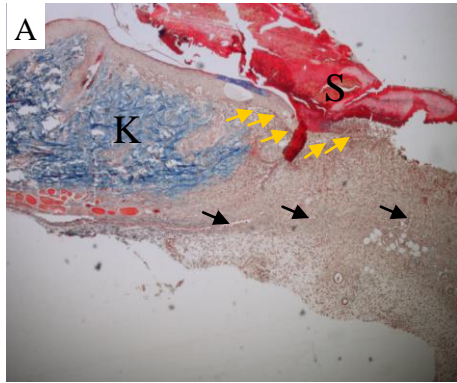
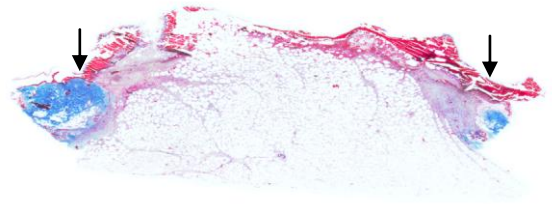
Diabetický samec (D – F), okraje rány vyznačeny šípkami: D (zvětšení 40x) – šípkami naznačen směr migrujících buněk, rána (R), tuk (T), zdravá kůže (K); E (zvětšení 100x) – cévy v granulační tkáni (C), kolagenní vlákna (*), fibroblasty (šípka); F (zvětšení 200x) – cévy (C), tuk (T), mastocyt (černá šípka), makrofág (modrá šípka)



Obr. 22: Interval d3 – pozdní zánětlivá fáze – srovnání kontrolní a diabetické samice:

Kontrolní samice (A – C), okraje rány vyznačeny šipkami: A (zvětšení 200x) – šipkami naznačen směr migrujících buněk, jazyk epidermis (E), zdravá kůže (K), rána (R); B (zvětšení 100x) – šipkami naznačen směr migrujících buněk, sval (S), zdravá kůže (K); C (zvětšení 200x) – cévy v granulační tkáni (C), rána (R)

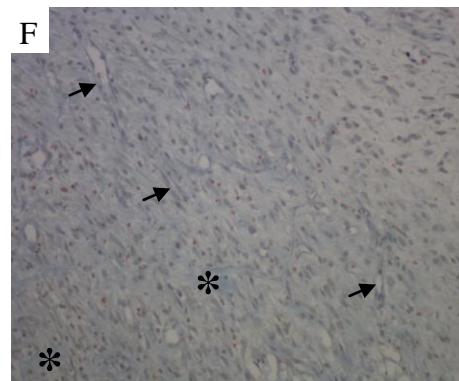
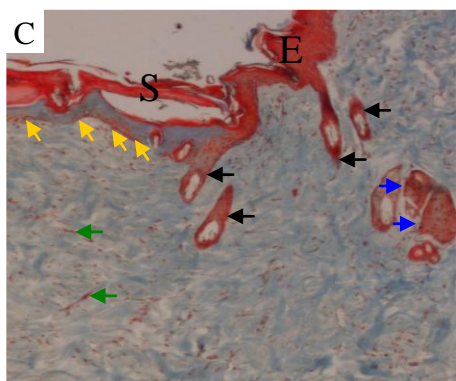
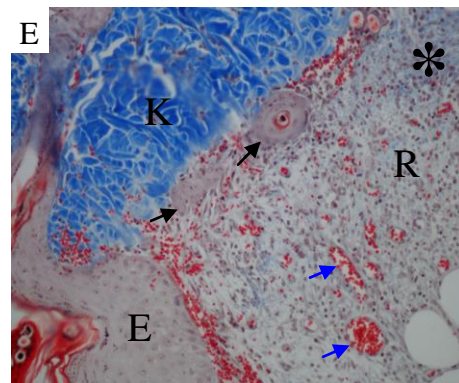
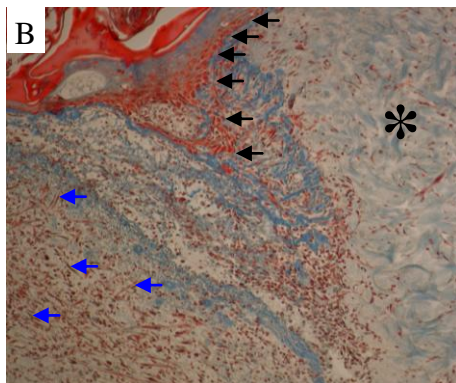
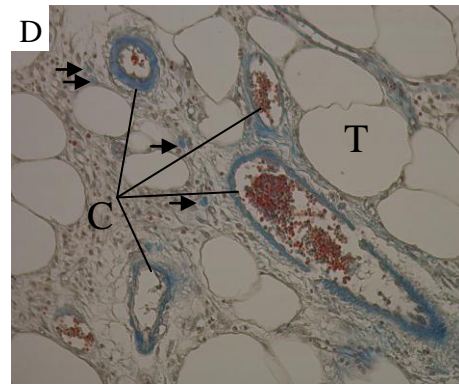
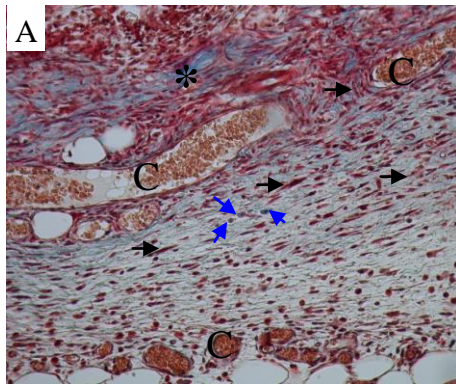
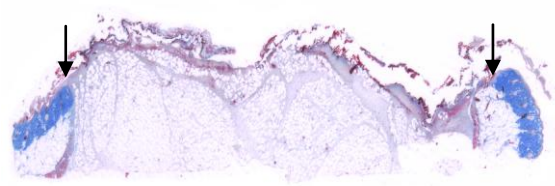
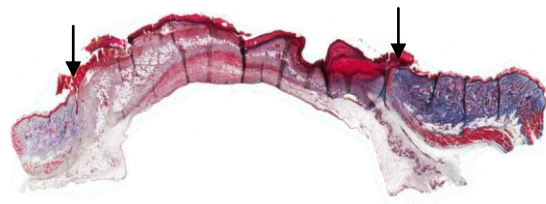
Diabetická samice (D – F), okraje rány vyznačeny šipkami: D (zvětšení 200x) – šipkami naznačen směr migrujících buněk, sval (S), rána (R), tuk (T); E (zvětšení 400x) – cévy v tukové tkáni (C), tuk (T); F (zvětšení 400x) – tuk (T), erythrocyty (E)



Obr. 23: Interval d5 – proliferační fáze – srovnání kontrolního a diabetického samce:

Kontrolní samec (A – C), okraje rány vyznačeny šipkami: A (zvětšení 40x) – zdravá kůže (K), strup (S), jazyk epidermis (žlutá šipka), céva v granulační tkáni (černá šipka); B (zvětšení 100x) – šipkou naznačen směr migrujících buněk, céva v granulační tkáni (modrá šipka), zdravá kůže (K); C (zvětšení 100x) – tuk (T), cévy (C), nově vznikající cévy (černá šipka), mastocyt (žlutá šipka)

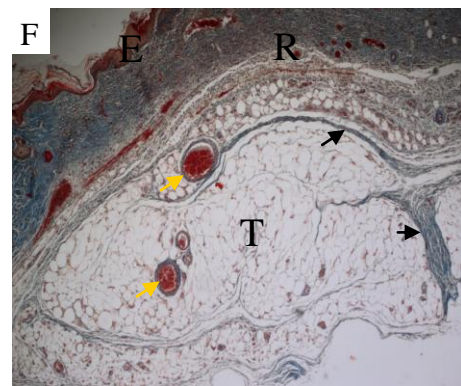
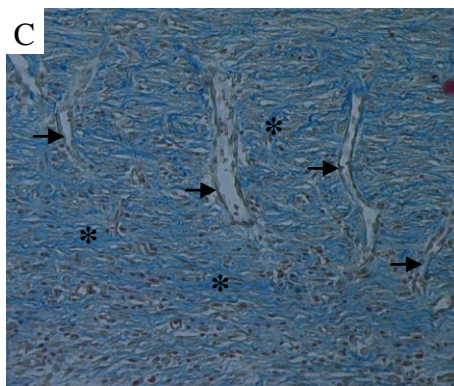
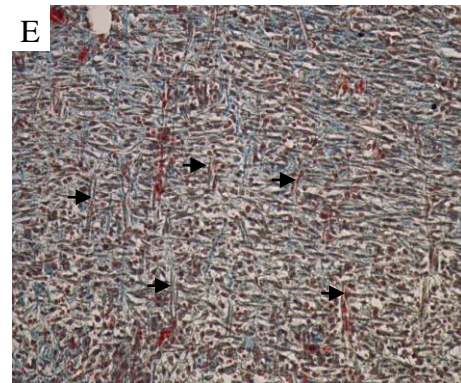
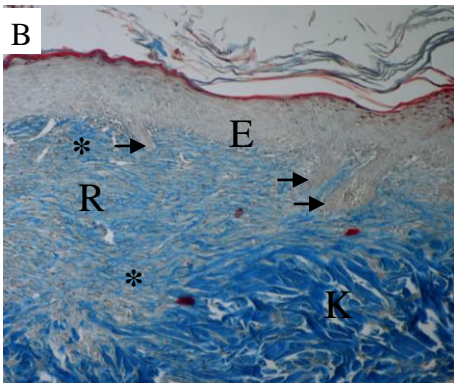
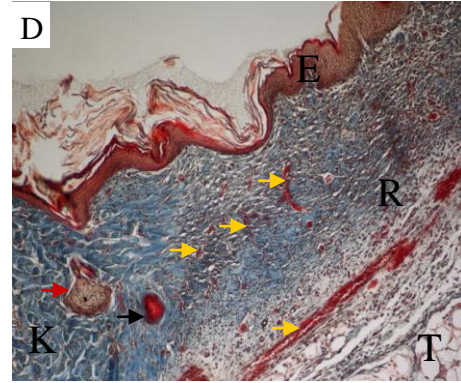
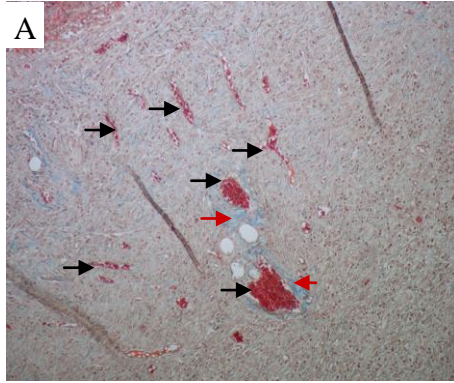
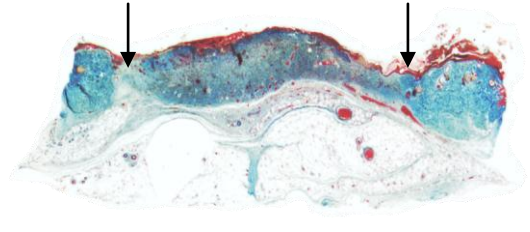
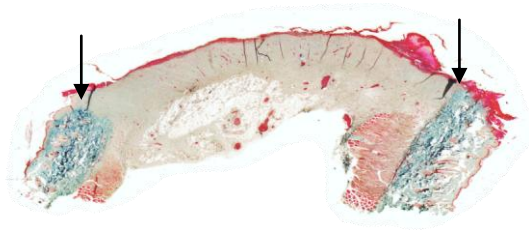
Diabetický samec (D – F), okraje rány vyznačeny šipkami: D (zvětšení 100x) – strup (S), epidermis (E), jazyk epidermis (žluté šipky), nově vznikající cévy (černá šipka), zdravá kůže (K); E (zvětšení 100x) – tuk (T), cévy v tuku (černá šipka), kolagenní vlákna (modrá šipka); F (zvětšení 200x) – kolagenní vlákna (šipka)



Obr. 24: Interval d5 – proliferační fáze – srovnání kontrolní a diabetické samice:

Kontrolní samice (A – C), okraje rány vyznačeny šipkami: A (zvětšení 200x) – fibroblasty (černá šipka), mastocyty (modrá šipka), kolagenní vlákna (*), cévy (C); B (zvětšení 100x) – fibroblasty (modrá šipka), epidermální buňky (nově vznikající epidermis) (černá šipka), nevyzrálá kolagenní vlákna (*); C (zvětšení 100x) – strup (S), epidermis (E), epidermální buňky (žlutá šipka), nově vznikající chlup (černá šipka), nově vznikající mazová žláza (modrá šipka), fibroblasty (zelená šipka)

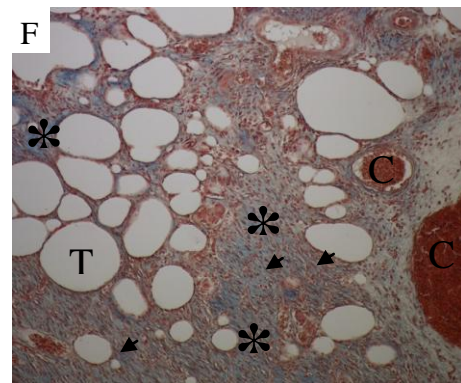
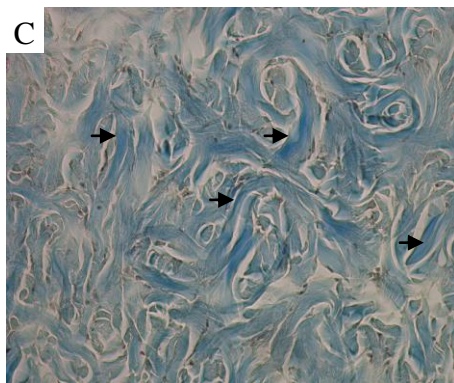
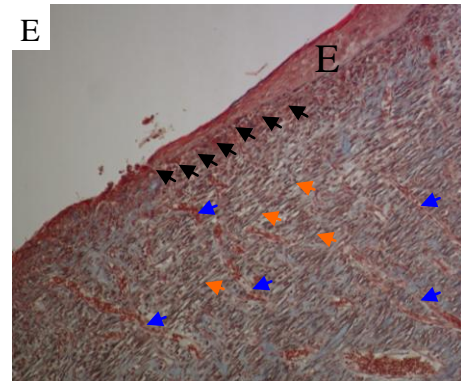
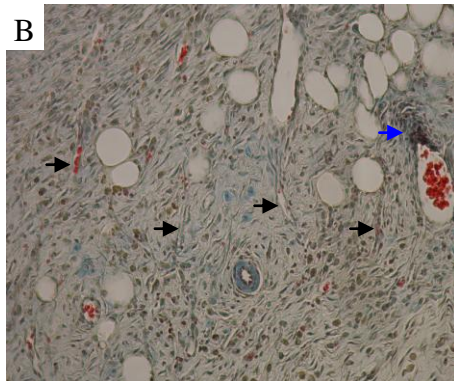
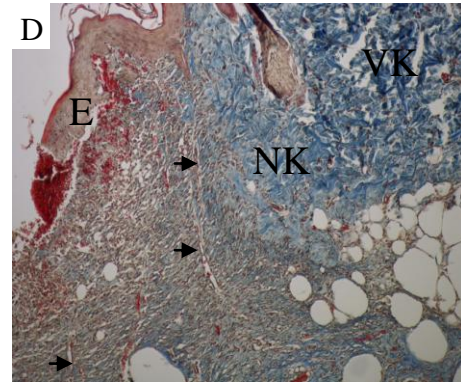
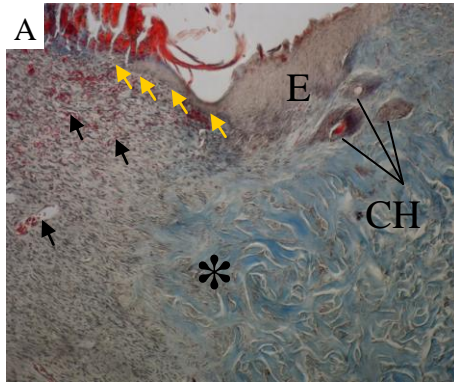
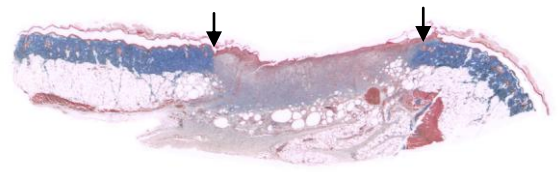
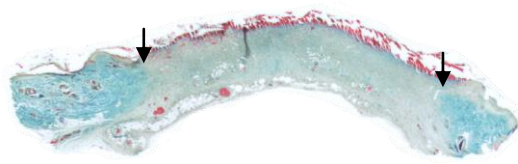
Diabetická samice (D – F), okraje rány vyznačeny šipkami: D (zvětšení 400x) – tuk (T), cévy (C), mastocyt (černá šipka); E (zvětšení 200x) – zdravá kůže s vyzrálým kolagenem (K), epidermis (E), rána (R), nově vznikající chlupy (černá šipka), nově vznikající cévy (modrá šipka), nevyzrálé kolagenní vlákna (*); F (zvětšení 200x) – nevyzrálá kolagenní vlákna (*), nově vznikající cévy (černá šipka)



Obr. 25: Interval d10 – proliferační fáze – srovnání kontrolního a diabetického samce:

Kontrolní samec (A – C), okraje rány vyznačeny šipkami: A (zvětšení 100x) – nově vznikající cévy (černá šipka), kolagenní vlákna (červená šipka); B (zvětšení 100x) – epidermis (E), rána (R), zdravá kůže (K), nově vznikající chlupy (černá šipka), kolagenní vlákna (*); C (zvětšení 200x) – kolagenní vlákna (*), nově vznikající cévy (černá šipka)

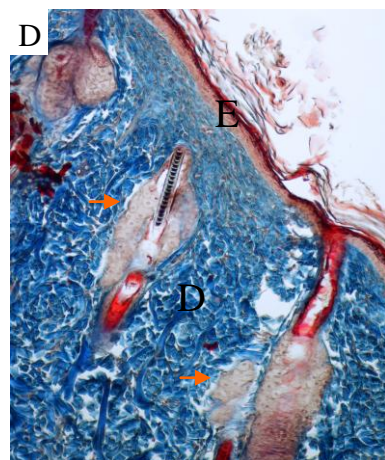
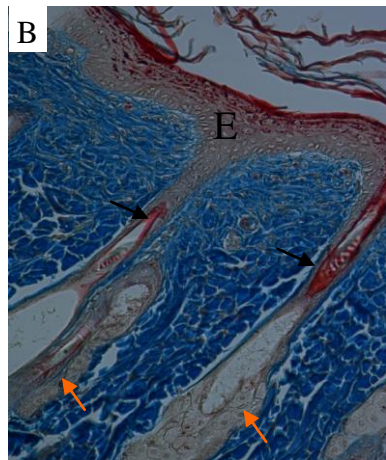
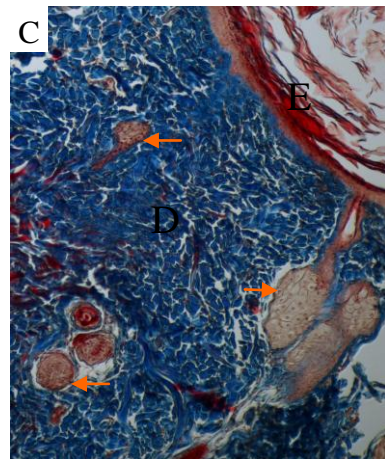
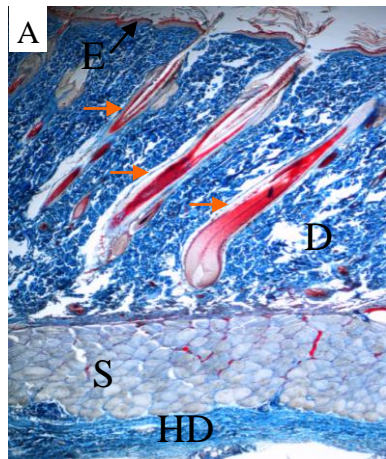
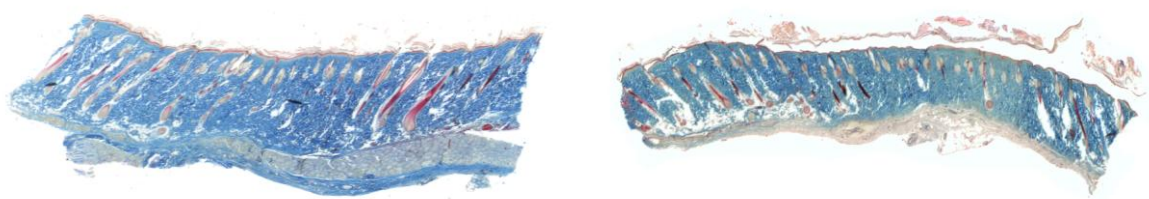
Diabetický samec (D – F), okraje rány vyznačeny šipkami: D (zvětšení 100x) – epidermis (E), rána (R), tuk (T), zdravá kůže (K), nově vznikající chlup (černá šipka), nově vznikající mazová žláza (červená šipka); E (zvětšení 100x) – nově vznikající cévy (šipka); F (zvětšení 100x) – epidermis (E), rána (R), tuk (T), cévy v tuku (žlutá šipka), kolagenní vlákna v tuku (černá šipka)



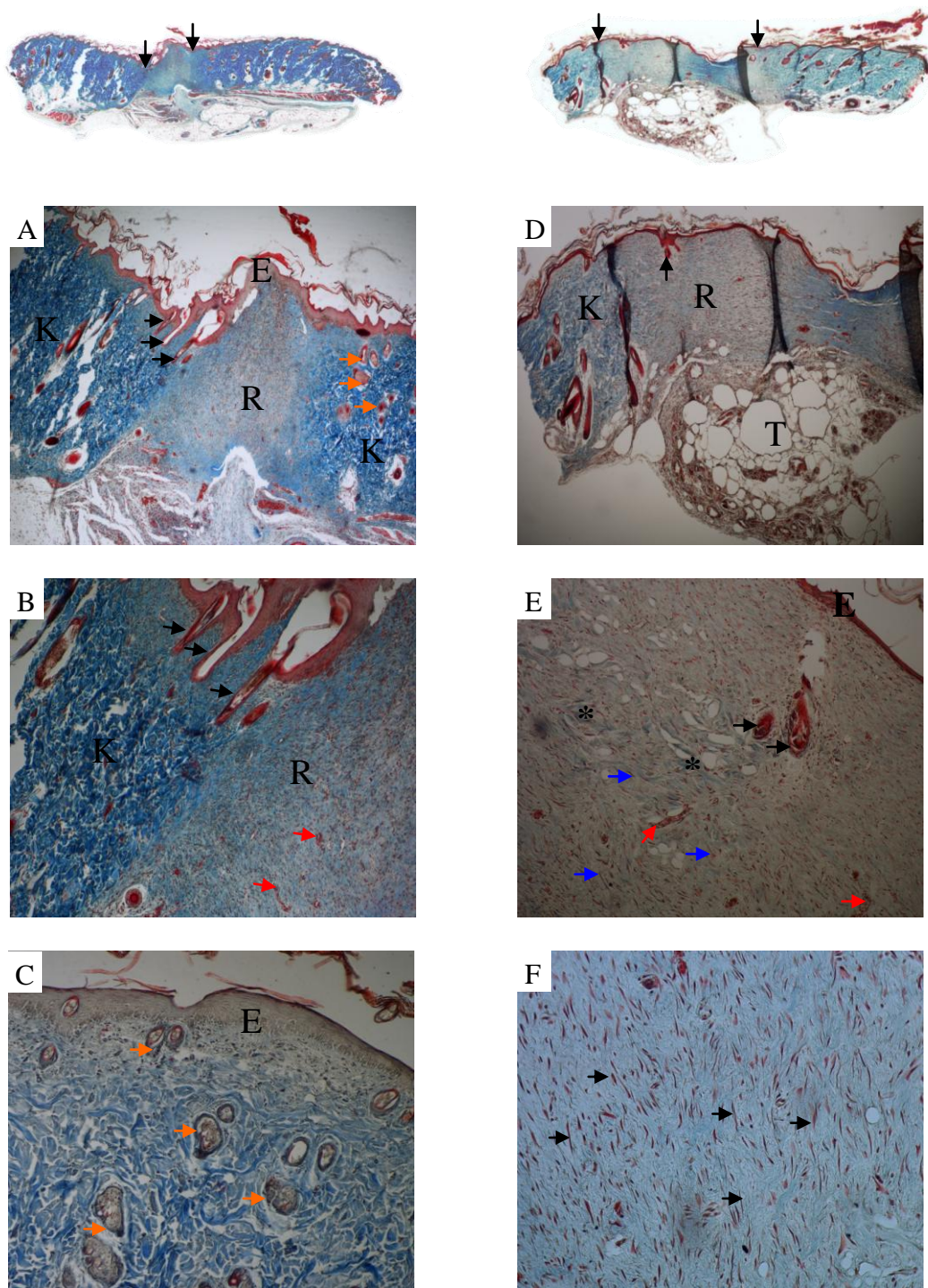
Obr. 26: Interval d10 – proliferační fáze – srovnání kontrolní a diabetické samice:

Kontrolní samice (A – C), okraje rány vyznačeny šipkami: A (zvětšení 100x) – epidermis (E), chlupy (CH), jazyk epidermis (žlutá šipka), nově vznikající cévy (černá šipka), vyzrálý kolagen (*); B (zvětšení 100x) – nově vznikající cévy (černá šipka), nově vznikající chlup (modrá šipka); C (zvětšení 400x) – kolagenní vlákna (černá šipka)

Diabetická samice (D – F), okraje rány vyznačeny šipkami: D (zvětšení 100x) – epidermis (E), vyzrálý kolagen (VK), nevyzrálý kolagen (NK), nově vznikající cévy (černá šipka); E (zvětšení 100x) – epidermis (E), nově vznikající epidermis (černá šipka), nově vznikající cévy (modrá šipka), fibroblasty (oranžová šipka); F (zvětšení 400x) – cévy (C), tuk (T), kolagenní vlákna (*), fibroblasty (černá šipka)



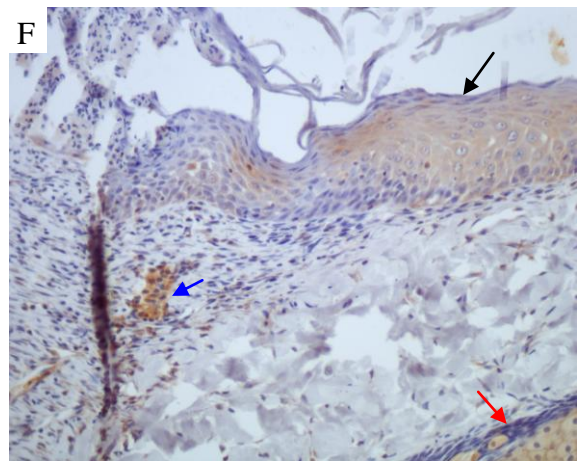
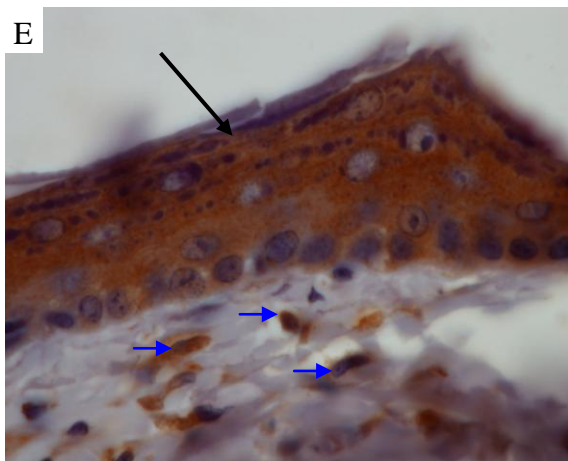
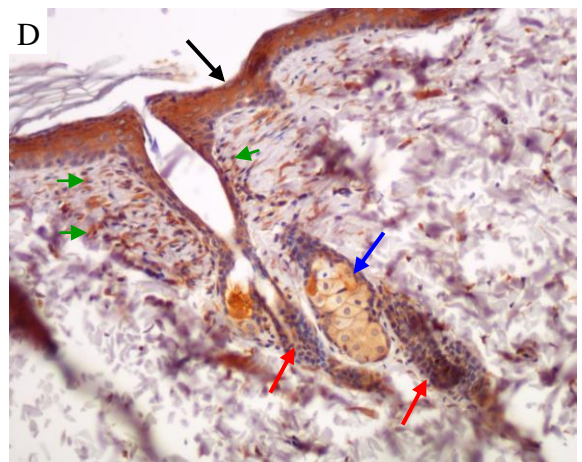
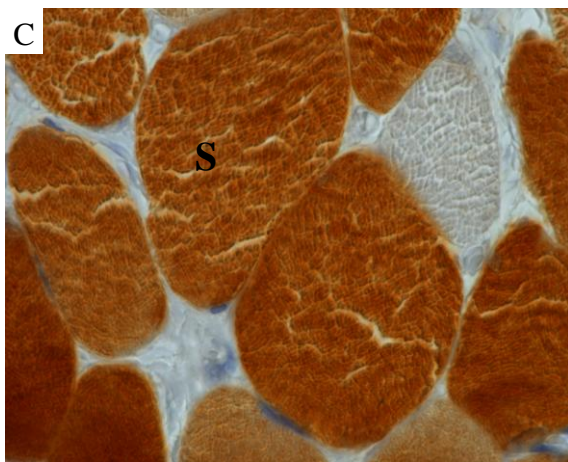
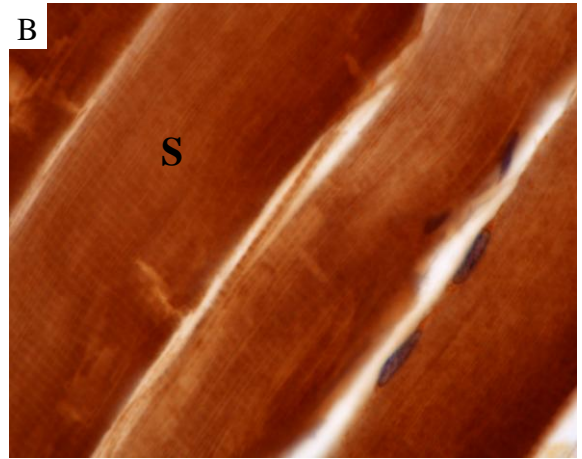
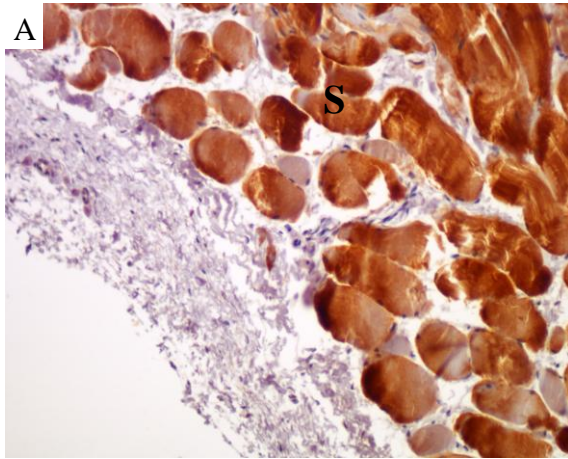
Obr. 27: Jizva – zahojená tkáň – srovnání kontrolního a diabetického samce:
Kontrolní samec (A – B): A (zvětšení 200x) – epidermis (E), dermis (D), sval (S), hypodermis (HD), chlup (oranžová šipka); B (zvětšení 400x) – epidermis (E), chlup (černá šipka), mazová žláza (oranžová šipka)
Diabetický samec (C – D): C (zvětšení 200x) – epidermis (E), dermis (D), mazové žlázy (oranžová šipka); D (zvětšení 200x) – epidermis (E), dermis (D), chlup s mazovou žlázou (oranžová šipka)



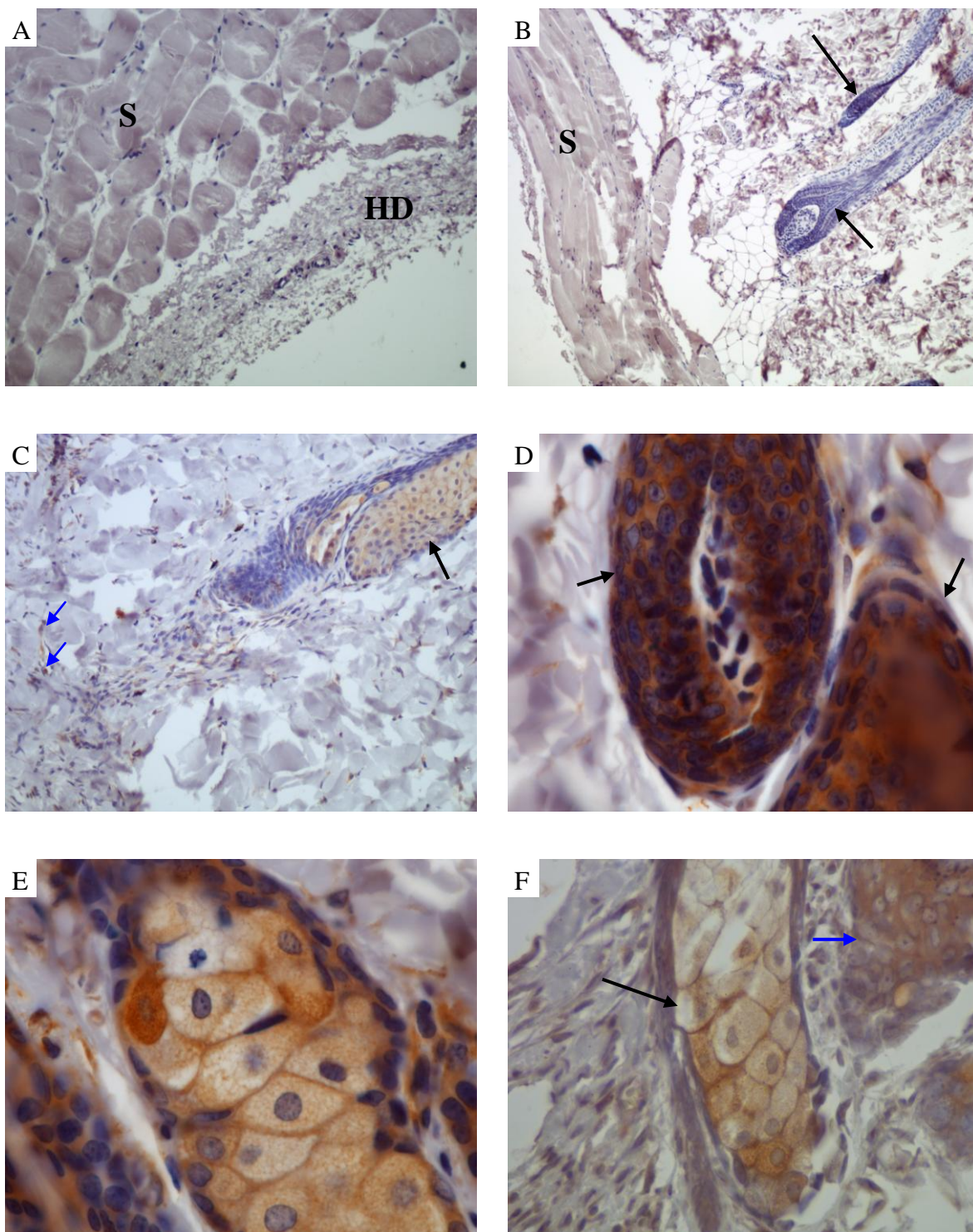
Obr. 28: Jizva – zahojená tkáň – srovnání kontrolní a diabetické samice:

Kontrolní samice (A – C), okraje rány vyznačeny šipkami: A (zvětšení 40x) – zdravá kůže (K), ECM (M), epidermis (E), nově vznikající chlupy (černá šipka), mazové žlázy s chlupem (oranžová šipka); B (zvětšení 100x) – zdravá kůže (K), ECM (M), nově vznikající chlupy (černá šipka), nově vznikající cévy (červená šipka); C (zvětšení 200x) – epidermis (E), mazové žlázy s chlupem (oranžová šipka)

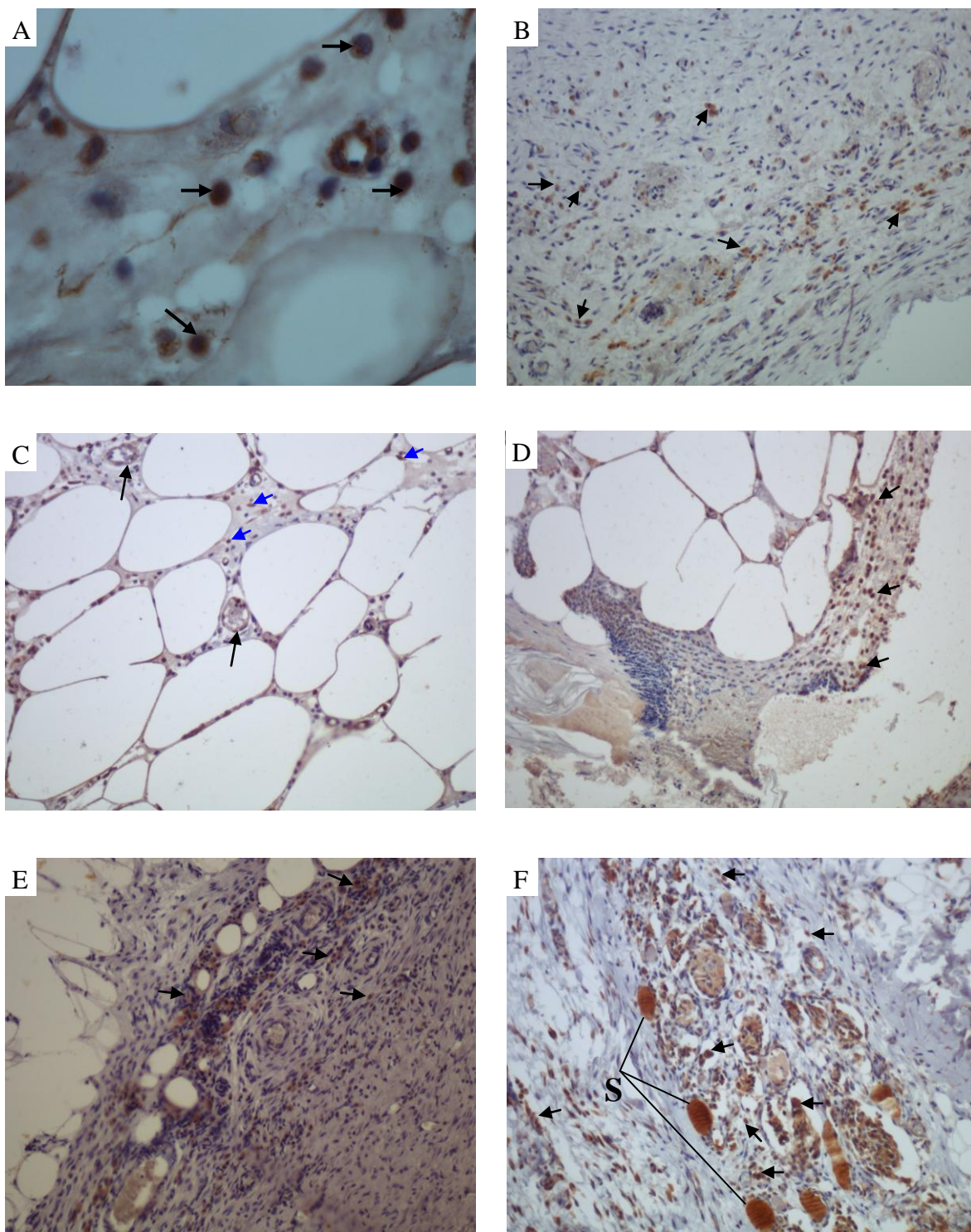
Diabetická samice (D – F), okraje rány vyznačeny šipkami: D (zvětšení 40x) – zdravá kůže (K), ECM (M), tuk (T); E (zvětšení 100x) – epidermis (E), kolagenní vlákna (*), nově vznikající chlup (černá šipka), fibroblasty (modrá šipka), nově vznikající cévy (červená šipka); F (zvětšení 100x) – fibroblasty (černá šipka)



Obr. 29: Imunohistochemické barvení PPARα: A (zvětšení 400x, kontrolní samice 056, kůže) – pozitivní PPARα sval, příčný řez (S); B (zvětšení 1000x, kontrolní samice 056, kůže) – pozitivní PPARα sval, podélný řez (S); C (zvětšení 1000x, kontrolní samice 056, kůže) – pozitivní PPARα sval, příčný řez (S); D (zvětšení 200x, kontrolní samice 056, kůže) – pozitivní PPARα epidermis (černá šipka), pozitivní PPARα mazová žláзка (modrá šipka), pozitivní PPARα chlup (červená šipka), pozitivní PPARα epidermální buňky (zelená šipka); E (zvětšení 1000x, kontrolní samice 056, kůže) – pozitivní PPARα epidermis (černá šipka), pozitivní PPARα epidermální buňky (modrá šipka); F (zvětšení 600x, kontrolní samice 03, interval d10) – pozitivní PPARα epidermis (černá šipka), pozitivní PPARα nově vznikající chlup (modrá šipka), pozitivní PPARα mazová žláзка (červená šipka)



Obr. 30: Imunohistochemické barvení PPARα: A (zvětšení 400x, kontrolní samice 056, kůže) – negativní kontrola, sval (S), hypodermis (HD); B (zvětšení 200x, kontrolní samice 056, kůže) – negativní kontrola, sval (S), chlup (černá šipka); C (zvětšení 400x, kontrolní samice 03, interval d10) – pozitivní PPARα mazová žláзка (černá šipka), pozitivní PPARα epidermální buňky (modrá šipka); D (zvětšení 1000x, kontrolní samice 056, kůže) – pozitivní chlup (černá šipka); E (zvětšení 1000x, kontrolní samice 056, kůže) – pozitivní PPARα mazová žláзка; F (zvětšení 600x, diabetický samec 81, interval d10) – pozitivní PPARα mazová žláзка (černá šipka), pozitivní PPARα chlup (modrá šipka)



Obr. 31: Imunohistochemické barvení PPARα: A (zvětšení 1000x, kontrolní samec 108, interval d1) – pozitivní PPARα lymfocyty (černá šipka); B (zvětšení 200x, diabetická samice 0113, jizva) – pozitivní PPARα buňky (černá šipka); C (zvětšení 400x, diabetická samice 0115, interval d1) – pozitivní PPARα céva – endotelové buňky (černá šipka), pozitivní PPARα buňky (modrá šipka); D (zvětšení 400x, diabetická samice 0115, interval d1) – pozitivní PPARα migrující buňky (černá šipka); E (zvětšení 400x, kontrolní samice 01, jizva) – pozitivní PPARα buňky; F (zvětšení 400x, kontrolní samec, interval d10) – pozitivní PPARα buňky, sval (S)

11 DISKUSE

Práce měla za úkol zhodnotit proces hojení u zdravých a diabetických potkanů ZDF. ZDF potkani představují vhodný a stěžejní model pro studium nemoci diabetes mellitus typu 2. Genetickou podstatou obezity a inzulínové rezistence ZDF potkanů je mutace v genu pro leptinový receptor. Diabetes mellitus jako systémové onemocnění ovlivňuje organismus na mnoho úrovních, jednou z nich je i hojení ran. Vlivem cévních změn, zvýšené náchylnosti k infekcím a neméně také neuropatiím přecházejí akutní rány do stádia chronicity. V důsledku prolongované zánětlivé fáze se rány stávají obtížně hojící a představují zásadní problém v léčbě kožních defektů diabetických pacientů.

Proces hojení kožních ran u obou sledovaných skupin potkanů ZDF jsme studovali na histologických řezech. Na hřbetu jsme potkanům vytvořili kruhovou excizní ránu o průměru cca 2 cm. Tkáň hojící se rány jsme odebrali první, třetí, pátý a desátý den po poranění a v den úplného překrytí rány epitelem (jizva). Tuto jsme následně zafixovali ve formalínu a zalili do parafinu. Ke zvýraznění kolagenního vaziva jsme řezy obarvili modrým a/nebo zeleným Massonovým trichromem. Imunohistochemickým barvením PPAR α protilátkou jsme získali obraz jejich exprese v neporušené kůži, v ráně první a desátý den po poranění a v jizvě. Rovněž jsme popsali morfologii zdravé kůže.

V každé studované skupině a každém intervalu (kontrolní samec, diabetický samec, kontrolní samice, diabetická samice) jsme studovali rány z 3 – 5 potkanů. Na základě uvedených výsledků jsme zjistili morfologické rozdíly intaktní kůže kontrolních a diabetických potkanů. Rozdíly jsme zaznamenali také v rámci pohlaví. Menší rozdíly nacházíme také mezi kůží potkaní a lidskou. U obou druhů se kůže skládá z epidermis, dermis a subcutis. Dermis je díky množství krevních cév (obr. 15/D, E, F) velmi dobře zásobená krví. Kromě krevních cév zde nacházíme mazové žlázy (obr. 15/B, K), chlupy/vlasy (obr. 15/A, B, K), nervy, tukovou tkáň (obr. 15/C, F) a také množství tkáně pojivové (obr. 15/A, B, I, J). Lidská kůže disponuje navíc potními žlázami, které jsou u potkanů vyvinuty pouze na tlapkách, ušních boltecích a ocase. Zjevným rozdílem je přítomnost podkožní svaloviny v potkaní kůži (obr. 14/A, B, C, D; 15/F, G, H, CH), která u lidí zcela chybí. Porovnáním kůže kontrolní a diabetické samice lze vidět zřetelný rozdíl v tloušťce dermis (obr. 14/A, B). Diabetické samice se vyznačují přítomností silné vrstvy tukové tkáně, která je u zdravých samic minimální nebo zcela chybí. Tloušťka dermis je odlišná také u zdravých samic a zdravých samců (obr. 14/A, C). Větší rozměry vykazuje

dermis samců. Zřejmé rozdíly jsou také v tloušťce tukové vrstvy diabetických samic a samců (obr. 14/B, D). Samice disponují větším podílem tukové tkáně.

První den po vytvoření rány se rozměr rány u diabetických potkanů ještě zvýší. V nově vytvořené granulační tkáni vidíme oproti kontrolám více adipocytů (obr. 19/H; 20/F,G). U diabetických potkanů jsme zaznamenali v ráně větší podíl erytrocytů a zároveň sníženou denzitu PMN (obr. 19/F, G; 20/F) oproti kontrolním zvířatům (obr. 19/B, C; 20/B). Stejných výsledků v časné fázi zánětu zaznamenala také studie *Komesu et al.*, kde sledovali hojení excizní rány na potkanech s diabetem vyvolaným alloxanem [62]. Rány diabetiků v časné fázi zánětu obsahují menší množství zánětlivých buněk PMN, taktéž je v několika člancích popsána jejich snížená funkce [27,28,29]. Na fotografiích samčích i samičích ran je dobře vidět další typický jev – vytočení okraje rány směrem k povrchu. To způsobí, že sval i podkožní vazivo jsou vytlačeni téměř (obr. 19/A; 20/A) nebo úplně na povrch rány (obr. 20/E). Adipocyty s výrazně větším podílem u diabetiků, se do rány dostávají zřejmě z podkožního vaziva. *Sabol et al.*, se věnovali hojení ran u diabetických Sprague-Dawley potkanů. Rány byly analyzovány po 2, 6 a 14 dnech. Dva dny po poranění se na okrajích ran kontrolních zvířat vyskytovalo množství zánětlivých buněk PMN a začala se vytvářet demarkační linie, která oddělovala zdravou tkáň od poraněné. U diabetiků byla demarkační linie rovněž vytvořena, ale neobsahovala žádné nebo snížené množství PMN [63]. Ačkoli byly tyto nálezy získány druhý den po poranění, korelují s našimi výsledky zaznamenanými v intervalu d1 (obr. 19/B, F; 20/A, E). Obdobné výsledky hojení ran u zdravých Sprague-Dawley potkanů, ovšem v jiných časových intervalech, jsou obsaženy také v práci *Vidinský et al.*, kdy byly rány zkoumány v sedmi časových intervalech: 24, 48, 72, 96, 120, 144 a 168 hodin po poranění (1., 2., 3., 4., 5., 6. a 7. den po poranění) [67].

Třetí den po poranění upoutá pozornost velké množství tukové tkáně v granulační tkáni diabetické rány (obr. 21/D, F; 22/D, E, F). PMN se z rány kontrol pomalu vytrácejí a jsou nahrazeny makrofágy, které svými působky do rány přitahují fibroblasty. Nově vznikající cévy utvářejí jakousi linii směřující k povrchu rány (obr. 21/A, C). V blízkosti cév můžeme dosti často vidět adipocyty (obr. 21/A, B, C). U okrajů rány, se nachází množství migrujících buněk směřujících k povrchu rány, zejména migrují zespod svalu (obr. 21/A, D; 22/B, D). V ranách zdravých potkanů je již zřetelný „jazyk“ epidermis – keratinocyty migrují z okrajů zdravé tkáně nad granulační tkáni (obr. 22/A). U diabetiků k postupu epidermis nedochází (obr. 21/D; 22/D). Kromě keratinocytů se v ráně objevují endoteliální

buňky a fibroblasty. Zejména na okrajích ran se začínají objevovat první vlákna nevyzrálého kolagenu (obr. 21/E).

U všech skupin jsme v oblasti kolem cév hojně zaznamenali množství mastocytů (obr. 21/F; 23/C; 24/A; 24/D), které hrají důležitou roli v obraně organismu proti alergiím i mikroorganismům. Jak kontroly, tak i diabetici vykazovali přítomnost mastocytů první, třetí, pátý a desátý den po poranění. V diabetických ranách bylo jejich množství oproti kontrolám zvýšené. Toto může korelovat s našimi výsledky zpomaleného hojení ran u ZDF potkanů a také s výsledky některých studií zabývajících se rolí mastocytů v bílé tukové tkáni [68,69,70]. *Nishikori et al.*, studovali během 49 dnů vliv mastocytů na hojení ran u diabetických myši s injekčně aplikovaným streptozocinem. Zjistili, že proces uzavření rány u diabetiků, se značně neliší od kontrol. Nicméně patrné rozdíly zaznamenali v proliferační fázi 7 a 14 den, kdy probíhající neovaskularizace diabetických myši byla v porovnání s kontrolami slabší. Odchyly zjistili také během remodelační fáze 21 den a následující dny, kdy u kontrol docházelo k postupné cévní regresi, kdežto u diabetiků byla neovaskularizace stále přítomna a navíc s relativně dosti vysokým počtem cév v granulační tkáni [68].

V práci *Liu et al.*, autoři předkládají důkazy, že mastocyty přispívají k obesitě vyvolané stravou i k diabetes. Potvrdili, že bílá tuková tkáň obézních lidí a myši obsahuje o mnoho více mastocytů oproti bílé tukové tkáni jejich štíhlých protějšků. Geneticky podmíněná deficeience mastocytů a farmakologická stabilizace mastocytů u myši redukovala jejich tělesnou hmotnost a taktéž množství zánětlivých faktorů [69].

U zdravých jedinců pátý den hojení postupuje jazyk epidermis po povrchu stále více ke středu rány (obr. 23/A; 24/B). Z epidermálních buněk nově vznikající epidermis se tvoří nové chlupy (obr. 24/B, C) a mazové žlázy (obr. 24/C). Nejpočetnějšími buňkami reprezentující interval d5 u kontrol jsou fibroblasty syntetizující nová kolagenní vlákna (obr. 24/A, B). V diabetických ranách je stále mnoho tuku, v jeho okolí vznikají ostrůvkovitě nové cévy a kolagenní vlákna (obr. 23/E; 24/D). I u diabetických potkanů začíná být výrazná posouvající se epidermis nad granulační tkáni, tvoří se nové cévy (obr. 23/D; 24/E, F). Na okraji rány diabetických potkanů se tvoří první chlupy (obr. 24/E). Ve studii *Gal et al.*, testované na Sprague-Dawley potkanech s injekčně podávaným streptozocinem, popisují 6. den po poranění sníženou proliferaci fibroblastů a endoteliálních buněk [66]. Stejných výsledků jsme zaznamenali u diabetických samic, avšak ne u diabetických samců.

Desátý den po poranění diabetické rány na první pohled zaujmou přítomností velkého množství fibroblastů (obr. 25/E; 26/E, F), mezi kterými v o dost menší míře probíhají kolagenní vlákna. Kontrolní samci vykazují větší podíl kolagenních vláken (obr. 25/B, C) oproti kontrolním samicím (obr. 26/A, B) i diabetickým potkanům (obr. 25/D, E, F; 26/D, E, F). Intenzivní novotvorbu cév lze vidět jak u kontrolních tak diabetických zvířat (obr. 25/A, C, D, E; 26/A, B, D, E, F). V ranách diabetických potkanů je stále přítomný tuk (obr. 25/D, F; 26/F). Ve studii *Velandar et al.*, která byla provedena na prasatech s diabetem indukovaným streptozocinem, byla kůže analyzována 8., 12., 16. a 18. den po poranění. Bylo zjištěno, že u diabetických prasat dochází k signifikantnímu zpomalení a zpoždění reepitelizace a kontrahování rány [65].

Tkáň zhojená jizvou je plně překryta epidermis a obsahuje spoustu chlupů (obr. 27/A, B, C, D). Diabetičtí a kontrolní samci se hojí lépe v porovnání se samicemi. U samic je jizva také po celé délce kůže, ale kolagenní vlákna uložená v dermis jeví známky menší organizovanosti a vyzrálosti (28/A, B, D, E). Nejméně kolagenních vláken nalézáme v jizvě diabetických samic a navíc je zde velké množství fibroblastů (obr. 28/E, F). *Thomson et al.*, se zabývali studiem chronických diabetických paviánů. Subkutánně v místě stehů jim byly vloženy bubnové implantáty obsahující polystyren. Po 2 a 4 týdnech jim kůže v tomto místě byla vyříznuta a změřena pevnost a tloušťka epidermis. Bubnové implantáty byly odstraněny pro analýzu granulační tkáně a zánětlivých buněk. U diabetiků byla vyříznutá kůže méně elastická a ve srovnání s kontrolami došlo k přestavbě její epidermis pomaleji. Granulační tkáň diabetických paviánů obsahovala zvýšené množství cév vykazujících širší lumen. Množství makrofágů bylo redukováno na rozdíl od perzistujících neutrofilů [64].

Imunohistochemickou analýzou zaměřenou na PPAR α jsme prokázali jejich expresi ve svalu (obr. 29/A, B, C; 31/F), epidermis (obr. 29/D, E, F), vlasových folikulech (obr. 29/D, F; 30/C, D, F) a mazové žláze (obr. 29/D, F; 30/E, F). Také mnoho přítomných buněk vykazovalo pozitivitu (obr. 29/D; 30/C; 31/A, B, C, D, E, F). Expresi PPAR α jsme hodnotili na řezech zdravé kůže, první a desátý den po poranění a na ráně zhojené jizvou.

Westergaard et al., zkoumali expresi PPARs v izolovaných buňkách lidské epidermis (bazální a suprabazální buňky) využitím RT-PCR a Northern blot a dále také provedli imunohistochemickou analýzu v normální lidské epidermis. Expresi PPAR α v izolovaných buňkách epidermis byla pod detekčním limitem, ale se zvýšenou expresí v buňkách

suprabazálních. Imunohistochemickou analýzou normální lidské epidermis bylo zjištěno jen velmi málo PPAR α pozitivních buněk. Dále bylo zjištěno, že exprese PPAR α je v nediferencovaných lidských keratinocytech nízká, zatímco signifikantně stoupá během diferenciací [35]. PPAR α jsou ve zdravé kůži vysoce exprimované v keratinocytech vlasových folikulů. Zvýšená exprese PPAR α je pozorována v keratinocytech na okrajích ran [39,72]. PPAR α jsou také exprimovány v kožních imunitních buňkách, zejména v makrofázích a T-lymfocytech a také v mazových žlázách a kultivovaných sebocytech [38]. Stejných výsledků jsme docílili i my, kdy v epidermis neporušené kůže byla PPAR α exprese zvýšená (obr. 29/D, E), na rozdíl od snížené exprese PPAR α v keratinocytech na okrajích ran (obr. 29/F). V neporušené kůži byly PPAR α exprimovány ve svalu (obr. 29/A, B, C), keratinocytech epidermis (obr. 29/D, E) a vlasových folikulů (obr. 29/D; 30/D) a také v mazových žlázách (obr. 29/D; 30/E).

PPAR α se podílí na kontrole časně zánětlivé fáze. Aktivátory PPAR α potlačují chronické imunologické abnormality snížením počtu eozinofilů a mastocytů [39]. *Icre et al.*, ve studii udávají, že exprese PPAR α je přechodně zvýšená v době reparačních procesů, což koreluje se zánětlivou fází, a proto také PPAR α null-myši vykazují pouze přechodné zpoždění hojení [71]. Výsledky naší práce nemůžeme objektivně srovnat s výsledky publikovanými jinými autory, protože jsme se nezabývali expresí PPAR α v prvních čtyřech dnech hojení, které jsou pro PPAR α stěžejní. První den po poranění v našem případě nedošlo k signifikantním rozdílům mezi jednotlivými skupinami. V každé ze skupin se vyskytovalo množství PPAR α pozitivních buněk – lymfocytů (obr. 31/A, C, D). Desátý den po poranění jsme v ráně kontrolních potkanů zaznamenali silně pozitivní PPAR α makrofágy (obr. 31/F) a keratinocyty na okrajích ran. Pozitivita těchto buněk u diabetických zvířat byla slabší. Jizva diabetických potkanů vykazovala slabší expresi PPAR α v epidermis oproti kontrolám. Nejvíce pozitivních imunitních buněk jsme zjistili v jizvě diabetické a kontrolní samice (obr. 31/B, F). V jizvě kontrolního samce jsme již neviděli žádné PPAR α pozitivní buňky, ale pouze keratinocyty, vyskytující se těsně pod epidermis. Nicméně jiné studie udávají, že PPAR α null-myši se vyznačují zpomalením hojení během prvních 4 dnů po poranění, avšak v pozdějších fázích nebyly zaznamenány žádné rozdíly mezi kontrolami a PPAR α null-myši [39,71].

12 ZÁVĚR

V této práci jsme na histologické úrovni podrobně popsali nálezy v hojící se kožní excizní ráně u diabetických potkanů ZDF. Naším cílem bylo zjistit, zda existují rozdíly mezi pohlavími a mezi zdravými a diabetickými jedinci v různých časových intervalech. Histologickým zpracováním a následným hodnocením intaktní kůže potkanů jsme potvrdili velkou podobnost s kůží lidskou. Nicméně jsme zjistili dvě odlišnosti: lidská kůže obsahuje navíc potní žlázy, které se u potkanů vyskytují pouze na tlapkách, ušních boltcích a ocase a její součástí není podkožní sval, kterým potkani disponují. Dále jsme potvrdili, že rány diabetických potkanů se hojí obtížněji oproti ranám kontrolních zvířat. Taktéž jsme zjistili rozdíly mezi pohlavími. V našem případě se rány samic, na rozdíl od rán svých mužských protějšků, hojily pomaleji. Zjistili jsme, že u zdravých potkanů došlo k rychlejšímu nástupu i odeznění zánětlivé fáze, k rychlejšímu formování granulační tkáně i extracelulární matrix. U diabetických potkanů byl nástup neutrofilů do místa poranění opožděn a navíc jsme u nich zaznamenali sníženou proliferaci a migraci fibroblastů a keratinocytů.

Práce je první svého druhu, která sleduje změny v expresi jaderných receptorů alfa v průběhu hojení kožních ran u modelu diabetes mellitus 2. typu. Výsledky sice neukazují žádné výrazné rozdíly v expresi PPAR α v ranách diabetických a kontrolních zvířat, ale přispívají ke komplexnímu pohledu na hojení ran u diabetiků.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. 1. vyd. Praha: Galén, c2006, 80 s. Základy (Galén). ISBN 978-80-7262-263-4.
2. VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, 184 s. ISBN 80-701-3202-7.
3. JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O KELLEY. *Základy histologie*. 1. vyd. v ČR. Jinočany: H, 1997, vi, 502 s. ISBN 80-857-8737-7.
4. KONRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H, 2000, 291 s. ISBN 80-860-2280-3.
5. JOHNSTONE, Carolyn C, Alistair FARLEY a Charles HENDRY. The physiological basics of wound healing. *Nursing Standard*. 2005, vol. 19, issue 43, s. 59-65. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/springerreference_33866.
6. ČECH, Svatopluk a Drahomír HORKÝ. *Přehled obecné histologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 140 s. ISBN 80-210-3854-3.
7. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2012-12-20, vol. 36, Supplement_1, S67-S74. DOI: 10.2337/dc13-S067. Dostupné z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc13-S067>.
8. NOUZA, Martin a Karel NOUZA. Diabetes mellitus II. typu. *Sanquis*. 2004, roč. 2004, č. 35, s. 36-36. Dostupné z: <http://www.sanquis.cz/index2.php?linkID=art488>
9. RYBKA, Jaroslav. *Diabetologie pro sestry*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 283 s. ISBN 80-247-1612-7.
10. ŠMAHELOVÁ, A. Postgraduální medicína: Komplikace diabetu dříve a nyní. *Zdravotnictví a medicína* [online]. 1.11.2006 [cit. 2014-08-28]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/komplikace-diabetu-drive-a-nyni-274771>.
11. FEJFAROVÁ, V. a A. JIRKOVSKÁ. Makrovaskulární komplikace diabetu. *Interní medicína pro praxi*. Konice: Solen, 2009, 11(9), s. 390-394.
12. PÍTHOVÁ, P. Akutní komplikace diabetes mellitus. *Interní medicína pro praxi*. 2006, č. 12, s. 523-525.

13. PÍTHOVÁ, P. a L. JAREŠOVÁ. Kožní změny u diabetes mellitus z pohledu diabetologa. *Dermatologie pro praxi*. 2007, 1(4), s. 168-171.
14. PÍTHOVÁ, P. Syndrom diabetické nohy – závažná komplikace diabetes mellitus. *Česká dermatovenerologie*. 2012, roč. 2, č. 3, s. 161-167.
15. FLANAGAN, M. The physiology of wound healing. *Journal of wound care*. 2000, č. 6, s. 299-300.
16. GROFOVÁ, Z. Biologie rány. *Česká geriatrická revue: odborný časopis České gerontologické a geriatrické společnosti*. Brno: Medica Publishing and Consulting, 2006, 4(3), s. 157-162.
17. MOHAN, Harsh. *Patológia*. 1., slov. vyd. Editor Ľudovít Danihel, Lukáš Plank. Bratislava: Balneotherma, 2011, 966 s. ISBN 978-809-7015-664.
18. TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. přepr. a dopl. Praha: Grada Publishing, 2003, 771 s. ISBN 80-247-0512-5.
19. MAČÁK, Jiří a Jana MAČÁKOVÁ. *Patologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004, 347 s., 24 s. barev. příl. ISBN 80-247-0785-3.
20. VOKURKA, Martin. *Patofyziologie pro nelékařské směry*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 217 s. ISBN 978-80-246-0896-92007.
21. POSPÍŠILOVÁ, A. Nové pohledy na hojení a léčbu ran. *Practicus*. 2011, č. 5.
22. POKORNÁ, Andrea a Romana MRÁZOVÁ. *Kompendium hojení ran pro sestry*. 1. vyd. Praha: Grada, 2012, 191 s., 8 s. obr. příl. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4733-715.
23. ŠTORK, J. *Dermatovenerologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2008, xv, 502, [2] s. ISBN 978-807-2623-716.
24. JOOST, Hans-Georg, Hadi AL-HASANI a Annette SCHURMANN. *Animal models in diabetes research*. New York: Humana Press, 2012, xi, 325 p. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 933. ISBN 978-1-62703-068-7.
25. KING, Aileen JF. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*. 2012, vol. 166, issue 3, s. 877-894. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>.
26. SRINIVASAN, K. a P. RAMARAO. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *The Indian Journal of Medical Research*. 2007, vol. 125, issue 3, s. 451-472.

27. EKMEKTZOGLOU, KA a GC ZOGRAFOS. A concomitant review of the effects of diabetes mellitus and hypothyroidism in wound healing. *World J Gastroenterol*. 2006, roč. 12, č. 17, s. 2721-2729.
28. MCLENNAN, S. Molecular aspects of wound healing in diabetes. *Primary Intention*. 2006, roč. 14, č. 1.
29. FALANGA, Vincent. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet* [online]. 2005, vol. 366, issue 9498, s. 1736-1743 [cit. 2015-03-09]. DOI: 10.1016/s0140-6736(05)67700-8.
30. BURNS, John L, John S MANCOLL a Linda G PHILLIPS. Impairments to wound healing. *Clinics in Plastic Surgery*. 2003, vol. 30, issue 1, s. 47-56. DOI: 10.1002/9781118704509.
31. VOWDEN P. Hard-to-heal wouns Made Easy. *Wounds International* 2011; 2(4): Available from <http://www.woundsinternational.com>.
32. J. SINGER, M.D., ADAM, RICHARD A.F. CLARK , M.D. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*. 1999, roč. 341, č. 10, s. 738-746.
33. VELNAR, T., T. BAILEY a V. SMRKOLJ. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*. 2009-10-01, vol. 37, issue 5, s. 1528-1542. DOI: 10.1177/147323000903700531. Dostupné z: <http://imr.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/147323000903700531>.
34. LORENZ, H. Peter a Michael T. LONGAKER. Wounds: Biology, Pathology, and Management. *Essential Practice of Surgery*. New York: Springer-Verlag, 2003, s. 77. DOI: 10.1007/0-387-22744-X_7. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/0-387-22744-X_7.
35. WESTERGAARD, M. a ET AL. Modulation of Keratinocyte Gene Expression and Differentiation by PPAR-Selective Ligands and Tetradecylthioacetic Acid. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2001, č. 5.
36. MICHALIK, L., J. N. FEIGE, L. GELMAN, T. PEDRAZZINI, H. KELLER, B. DESVERGNE a W. WAHLI. Selective Expression of a Dominant-Negative Form of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Keratinocytes Leads to Impaired Epidermal Healing. *Molecular Endocrinology* [online]. 2005, vol. 19, issue 9, s. 2335-2348 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1210/me.2005-0068.

37. SVAČINA, Š. Metabolické jaderné receptory PPAR a kůže. *Vnitřní lékařství*. 2006, roč. 52, č. 5.
38. DUBRAC, Sandrine a Matthias SCHMUTH. PPAR-alpha in cutaneous inflammation. *Dermato-Endocrinology*. 2014-10-27, vol. 3, issue 1, s. 23-26. DOI: 10.4161/derm.3.1.14615. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/derm.3.1.14615>.
39. MICHALIK, L. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *The Journal of Cell Biology*. 2001, vol. 154, issue 4, s. 799-814. DOI: 10.1083/jcb.200011148. Dostupné z: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200011148>.
40. KANZLER, MATTHEW H., DAVID C. GORSULOWSKY a NEIL A. SWANSON. Basic Mechanisms in the Healing Cutaneous Wound. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology* [online]. 1986, vol. 12, issue 11, s. 1156-1164 [cit. 2015-03-03]. DOI: 10.1111/j.1524-4725.1986.tb02099.x.
41. SOŠKA, V. Jaderné receptory PPAR α . *Vnitř Léč*. 2006, roč. 52, č. 6. Dostupné z: www.vnitrnilekarstvi.cz.
42. MICHALIK, L. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *Journal of Clinical Investigation*. 2006-03-01, vol. 116, issue 3, s. 598-606. DOI: 10.1172/JCI27958. Dostupné z: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI27958>.
43. BRAISSANT, Olivier a Walter WAHLI. Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α , - β , and - γ during Rat Embryonic Development 1. *Endocrinology*. 1998, vol. 139, issue 6, s. 2748-2754. DOI: 10.1210/endo.139.6.6049. Dostupné z: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo.139.6.6049>.
44. SHAW, T. J. a P. MARTIN. Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science*[online]. 2009, vol. 122, issue 18, s. 3209-3213 [cit. 2015-03-31]. DOI: 10.1242/jcs.031187.
45. Integumentary System: Skin. *Atlas of Laboratory Mouse Histology* [online]. 2004 [cit. 2015-04-01]. Dostupné z: <http://ctrngenpath.net/static/atlas/mousehistology/Windows/introduction.html>.
46. HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.

47. MATOS, Leandro, TRUFELLI, PINHAL a Maria Graciela Luongo de MATOS. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarker Insights*. 2010, č. 5, s. 9-20. DOI: 10.4137/bmi.s2185.
48. TORLAKOVIC, Emina E., Glenn FRANCIS, John GARRATT, Blake GILKS, Elizabeth HYJEK, Merdol IBRAHIM, Rodney MILLER, Søren NIELSEN, Eugen B. PETCU, Paul E. SWANSON, Clive R. TAYLOR a Mogens VYBERG. Standardization of Negative Controls in Diagnostic Immunohistochemistry. *Applied Immunohistochemistry*. 2014, vol. 22, issue 4, s. 241-252. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000069. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>.
49. BOENISCH, T. Heat-induced Antigen Retrieval: What Are We Retrieving?. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2006-05-01, vol. 54, issue 9, s. 961-964. DOI: 10.1369/jhc.6P6945.2006. Dostupné z: <http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1369/jhc.6P6945.2006>.
50. SOMPURAM, Seshi R., Kodela VANI, Elizabeth MESSANA a Steven A. BOGEN. A Molecular Mechanism of Formalin Fixation and Antigen Retrieval. *American Journal of Clinical Pathology*. 2004-2-1, vol. 121, issue 2, s. 190-199. DOI: 10.1309/BRN7CTX1E84NWWPL. Dostupné z: <http://ajcp.ascpjournals.org/cgi/doi/10.1309/BRN7CTX1E84NWWPL>.
51. Blocking Endogenous Targets for IHC. *Thermo Fisher Scientific* [online]. 2015 [cit. 2015-04-02]. Dostupné z: <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/methods-block-endogenous-detection.html>.
52. BUCHWALOW, Igor, Vera SAMOILOVA, Werner BOECKER a Markus TIEMANN. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Scientific Reports*. 2011-7-1, vol. 1, č. 28, s. -. DOI: 10.1038/srep00028. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/srep00028>.
53. MALLEFET, Pascal a Anthony C DWECK. Mechanisms involved in wound healing. *The Biomedical Scientist*. July 2008, s. 609-615.
54. BROUGHTON, George, Jeffrey E. JANIS a Christopher E. ATTINGER. Wound Healing: An Overview. *Plastic and Reconstructive Surgery* [online]. 2006, vol. 117, SUPPLEMENT, 1e-S-32e-S [cit. 2015-04-26]. DOI: 10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9.

55. Integumentary system anatomy and physiology (skin Anatomy and Function). *Web Health Solution* [online]. 2012 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://www.webhealthsolution.com/skin/integumentary-system-anatomy>.
56. Histology of the Skin. *H is for Huey Ting* [online]. - [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://hisforhueyting.blogspot.cz/2009/07/histology-of-skin.html>.
57. Epidermal Layers Histology. *Pix Good* [online]. - [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://pixgood.com/epidermal-layers-histology.html>.
58. Biology Forums Gallery: Wound Healing by Primary Intention. *Biology Forum* [online]. 2010 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=11432>.
59. Biology Forums Gallery: Wound Healing by Secondary Intention. *Biology Forum* [online]. 2010 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=11431>.
60. Wound Healing: In Depth. *Pilonidal Support Alliance* [online]. 2001 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: http://www.pilonidal.org/aftercare/wound_healing_indepth.php.
61. Antibody Structure. *BioAtla* [online]. 2014 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://bioatla.com/educational-appendix/antibody-structure/>.
62. KOMESU, Marilena Chinali, Marcelo Benetti TANGA, Kemli Raquel BUTTROS a Cristiano NAKAO. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology*. 2004, vol. 11, issue 2, s. 63-67. DOI: 10.1016/j.pathophys.2004.02.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928468004000847>.
63. SABOL, F. Skin Wound Healing in Obese and Lean Male Adolescent Rats Submitted to Pre-Weaning Litter Size Manipulation. *Folia Biologica*. 2013, vol. 60, s. 21-27.
64. THOMSON, S. E., S. V. MCLENNAN, A. HENNESSY, P. BOUGHTON, J. BONNER, H. ZOELLNER, D. K. YUE a S. M. TWIGG. A novel primate model of delayed wound healing in diabetes: dysregulation of connective tissue growth factor. *Diabetologia*. 2010, vol. 53, issue 3, s. 572-583. DOI: 10.1007/s00125-009-1610-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-009-1610-6>.
65. VELANDER, Patrik, Christoph THEOPOLD, Tobias HIRSCH, Oliver BLEIZIFFER, Baraa ZUHAILI, Magdalena FOSSUM, Daniela HOELLER, Raphael GHEERARDYN, Michael CHEN, Scott VISOVATTI, Henry

- SVENSSON, Feng YAO a Elof ERIKSSON. Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound Repair and Regeneration*. 2008, vol. 16, issue 2, s. 288-293. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2008.00367.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1524-475X.2008.00367.x>.
66. GAL, P. Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments. *Veterinární medicína*. 2008, č. 12.
67. VIDINSKÝ, B. GÁL, P. TOPORCER, T. LONGAUER, F. et al. Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats. *Acta Veterinaria Brno*, 2006, 75 (2), s. 197 – 202.
68. NISHIKORI, Yoriko, Naotaka SHIOTA a Hideki OKUNISHI. The role of mast cells in cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Archives of Dermatological Research* [online]. 2014, vol. 306, issue 9, s. 823-835 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1007/s00403-014-1496-0.
69. LIU, Jian, Adeline DIVOUX, Jiusong SUN, Jie ZHANG, Karine CLÉMENT, Jonathan N GLICKMAN, Galina K SUKHOVA, Paul J WOLTERS, Juan DU, Cem Z GORGUN, Alessandro DORIA, Peter LIBBY, Richard S BLUMBERG, Barbara B KAHN, Gökhan S HOTAMISLIGIL a Guo-Ping SHI. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nature Medicine*. 2009-7-26, vol. 15, issue 8, s. 940-945. DOI: 10.1038/nm.1994. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.1994>.
70. SHI, Michael A. a Guo-Ping SHI. Different Roles of Mast Cells in Obesity and Diabetes: Lessons from Experimental Animals and Humans. *Frontiers in Immunology*. 2012, vol. 3, č. 7, s. -. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00007. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00007/abstract>.
71. ICRE, Guillaume, Walter WAHLI a Liliane MICHALIK. Functions of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α and β in Skin Homeostasis, Epithelial Repair, and Morphogenesis. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2006, vol. 11, issue 1, s. 30-35. DOI: 10.1038/sj.jidsymp.5650007. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.jidsymp.5650007>.

72. MICHALIK, L a W WAHLI. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007, vol. 1771, issue 8, s. 991-998. DOI: 10.1016/j.bbalip.2007.02.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198107000339>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

AGE	Produkty pokročilé glykace (advanced glycation end products).
ALP	Alkalická fosfatáza.
b-FGF	Bazický fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor).
BSA	Bovinní sérový albumin.
CMP	Cévní mozková příhoda.
DAB	Diaminobenzidin.
DAMPs	Poškozením asociované molekulární vzory (damage-associated molecular pattern molecules).
DM	Diabetes mellitus.
DM1	Diabetes mellitus 1. typu.
DM2	Diabetes mellitus 2. typu.
ECM	Extracelulární matrix.
EGF	Epiteliální růstový faktor (epithelial growth factor).
HRP	Křenová peroxidáza (horse-radish peroxidase).
ICAM	Mezibuněčná adhezivní molekula (intercellular adhesive molekule).
IHC	Imunohistochemie.
ICHDK	Ischemická choroba dolních končetin.
ICHS	Ischemická choroba srdeční.
IL-1	Interleukin 1.
IL-1 β	Interleukin 1beta.
IL-2	Interleukin 2.
IL-6	Interleukin 6.
LADA	Latentní autoimunitní diabetes dospělých (latent autoimmune diabetes of adults).

MMP	Matrix metaloproteinázy.
MMP9	Matrix metaloproteináza 9 (matrix metalloproteinase 9).
NF κ B	Transkripční faktor kapa-b.
P38	Mitogenem aktivované proteinkinázy.
pCO ₂	Parciální tlak oxidu uhličitého.
PMN	Polymorfonukleáry.
PDGF	Růstový faktor destiček (platelet derived growth factor).
PPARs	Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (peroxisome proliferators activated receptors).
PPAR $\alpha/\beta/\gamma$	Receptory aktivované proliferátory peroxizomů alfa/beta/gama.
SAPK/JNK	c-Jun N-terminální kinázy/stresem aktivované proteinkinázy.
SDN	Syndrom diabetické nohy.
TGF- α	Transformující růstový faktor-alfa (transforming growth factor-alpha).
TGF- β	Transformující růstový faktor-beta (transforming growth factor-beta).
TIMPs	Tkáňové inhibitory metaloproteináz.
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor-alfa (tumor necrosis factor-alpha).
VCAM	Cévní adhezivní molekula (vascular cell adhesion molekule).
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor).
ZDF	Zucker diabetic fatty rat.
ZFR	Zucker fatty rat.

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Histologická struktura lidské kůže, červeným pruhem vyznačena vrstva epidermis, fialovým pruhem dermis a žlutým subcutis*
- Obr. 2: Porovnání kůže tenkého a tlustého typu*
- Obr. 3: Vrstvy epidermis*
- Obr. 4: Schematické znázornění hojení per primam*
- Obr. 5: Schematické znázornění hojení per secundam*
- Obr. 6: Schematické znázornění jednotlivých fází hojení ran*
- Obr. 7: Zdravá a diabetická samice*
- Obr. 8: Schematické znázornění imunoglobulinu G*
- Obr. 9: Schematické znázornění přímé metody IHC*
- Obr. 10: Schematické znázornění nepřímé metody IHC*
- Obr. 11: Parafínová zalévací linka*
- Obr. 12: Autotechnikon Leica*
- Obr. 13: Sáňkový mikrotom a vyhřívací ploténky*
- Obr. 14: Srovnání histologického řezu kůží kontrolních a diabetických potkanů*
- Obr. 15: Kůže a její součásti*
- Obr. 16: Průběh hojení – srovnání kontrolních a diabetických samců, okraj rány vyznačen šipkami*
- Obr. 17: Průběh hojení – srovnání kontrolních a diabetických samic, okraj rány vyznačen šipkami*
- Obr. 18: Přehled hojících se ran kontrolních a diabetických potkanů v jednotlivých časových intervalech*
- Obr. 19: Interval d1 – časná zánětlivá fáze – srovnání kontrolního a diabetického samce*
- Obr. 20: Interval d1 – časná zánětlivá fáze – srovnání kontrolní a diabetické samice*
- Obr. 21: Interval d3 – pozdní zánětlivá fáze – srovnání kontrolního a diabetického samce*
- Obr. 22: Interval d3 – pozdní zánětlivá fáze – srovnání kontrolní a diabetické samice*
- Obr. 23: Interval d5 – proliferační fáze – srovnání kontrolního a diabetického samce*
- Obr. 24: Interval d5 – proliferační fáze – srovnání kontrolní a diabetické samice*
- Obr. 25: Interval d10 – proliferační fáze – srovnání kontrolního a diabetického samce*
- Obr. 26: Interval d10 – proliferační fáze – srovnání kontrolní a diabetické samice*
- Obr. 27: Jizva – zahojená tkáň – srovnání kontrolního a diabetického samce*

Obr. 28: Jizva – zahojená tkáň – srovnání kontrolní a diabetické samice

Obr. 29: Imunohistochemické barvení PPAR α

Obr. 30: Imunohistochemické barvení PPAR α

Obr. 31: Imunohistochemické barvení PPAR α

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Časové schéma jednotlivých lázní v autotechnikonu

Tab. 2: Odparafínovací řada

Tab. 3: Vlastní postup barvení dle Massonova modrého trichromu

Tab. 4: Vlastní postup barvení dle Massonova zeleného trichromu

Tab. 5: Složení roztoků pro Massonův zelený trichrom

Tab. 6: Odvodňovací řada

Tab. 7: Odparafínovací řada

Tab. 8: Časové schéma jednotlivých kroků IHC barvení

Tab. 9: Odvodňovací řada

SEZNAM PŘÍLOH