

Porovnání vlivu Traumacelu Biodressu, vlhké terapie a klasické terapie na produkci matrixových metaloproteináz a TNF- α (pilotní studie)

Jana Franková, Veronika Pivodová, Jitka Ulrichová
Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc
Ústav translační medicíny LF UP Olomouc

Souhrn

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou skupinou endopeptidáz, které jsou zodpovědné za degradaci mezibuněčné hmoty během fyziologického a patologického hojení ran. Jejich zvýšená produkce byla zjištěna při různých onemocněních, např. při chronických bérkových vředech. Předpokládá se, že zvýšení jejich hladiny během poranění, zánětu a uzdravovacího procesu může být způsobeno zánětlivými mediátory (např. TNF- α , IL-1), které jsou spojovány s jejich zvýšenou expresí. Cílem naší studie bylo porovnat tři typy terapií (klasická, vlhká terapie a Traumacel Biodress) na proces hojení ran při léčbě chronických bérkových ulcerací.

Klíčová slova: chronické rány, matrixové metaloproteinázy (MMP), TNF- α , hydrogenvápenatá sůl oxidované celulózy, Traumacel Biodress

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMP) are the family of endopeptidases that are responsible for the degradation of the extracellular matrix during the normal wound and pathologic wound repair. Their overexpression has been implicated in many disease states e.g. chronic leg ulcers. The implication of increased MMP expression during injury, inflammation, and repair suggests that inflammatory mediators may be associated with their up-regulation. In our study three types of therapies (classic, damp therapy and Traumacel Biodress/Traumastem Biodress) on wound healing process of chronic leg ulcers were compared.

Key words: Chronic wounds, matrix metalloproteinases (MMP), TNF- α , hydrogencalcium salt of oxidised cellulose, Traumacel Biodress

Úvod

Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou skupinou enzymů schopných štěpit většinu komponent mezibuněčné hmoty. Jsou regulovány na úrovni transkripce, translace nebo přítomností přirozených inhibitorů. MMP se účastní tkáňové remodelace, hojení ran, angiogeneze a nádorového bujení. Vysoká hladina jejich exprese nebo aktivace je spojována s hojením ran. Stejně jako prozánětlivé cytokiny, tak i vysoká hladina MMP se nachází při zánětlivých onemocněních jakými jsou například chronické rány. Různé typy buněk (neutrofilní granulocyty, makrofágy, endoteliální buňky, keratinocyty nebo fibroblasty) mohou produkovat MMP během hojení ran, ale i bezprostředně po zranění. Bylo prokázáno, že MMP umožňují průnik a pohyb těchto buněk přes mezibuněčnou hmotu (Daniels et al. 2003). Významnými zástupci MMP rodiny jsou MMP-2 (gelatináza A) a MMP-9 (gelatináza B), obě obsahují fibronektinovou doménu pro navázání kolagenu (Yu et al. 1998). Společně se nazývají kolagenázy IV a jsou schopné štěpit kolagen typu I, V, VII a XI a laminin. Díky této schopnosti se účastní remodelace bazální membrány a jejich aktivita reguluje buněčnou migraci a proliferaci během nádorového bujení i při hojení ran (Birkedal-Hansen et al. 1993).

Produkce MMP je zvyšována přítomností pro-zánětlivých cytokinů např. IL-1 α , EGF, PDGF a TNF- α . TNF- α je důležitým mediátorem, který se účastní zánětlivé fáze hojení ran a je spojován se zánětlivými onemocněními jako, jsou např. chronické rány. Zatímco syntéza tohoto cytokinu je nezbytná pro hojení ran, nadbytečné množství způsobuje vznik špatně se hojících ran jako jsou bérkové vředy a chronická zánětlivá onemocnění. Bylo prokázáno, že TNF- α stimuluje produkci MMP-2 v orgánových kulturách lidských kožních vzorků (Han et al. 2000).

Materiál a metody

Pacienti, trpící chronickými bérčovými ulceracemi, byli léčeni bioaktivní metodou (Traumacel Biodress), klasickou a vlhkou terapií (podrobnější informace o způsobu léčby, počtech pacientů apod. jsou uvedeny v rámci farmakoekonomické studie prováděné firmou Bioster, a.s. a FN Bulovka, dermatovenerologická klinika, schválené příslušnou etickou komisí). Parametry MMP-2, MMP-9 a TNF- α byly sledovány u 35 pacientů, z nichž 20 bylo léčených Traumacelem Biodress, 6 pacientů klasickou metodou a 9 pacientů vlhkou terapií.

Traumacel Biodress

Rána byla ošetřena dle standardního ošetřovatelského postupu a byl aplikován Traumacel Biodress (Bioster, a.s., Česká republika), který je složením 100% hydrogenvápenatá sůl oxidované celulózy.

Klasická metoda hojení ran

Rána byla ošetřena dle standardního ošetřovatelského postupu. Byla provedena hygiena rány, aplikována léčivá mast a rána byla přikryta sterilní konfetou.

Vlhké krytí v léčbě chronických ran

Rána byla ošetřena dle standardního ošetřovatelského postupu. Byla provedena hygiena rány a přiloženo vlhké krytí.

Odběr a příprava vzorků

Vzorky gázy byly odebrány každých 14 dnů při převazu a zamrazeny na -80°C do RIPA pufru s proteázovými inhibitory. Před vlastním měřením byly vyextrahovány do RIPA pufru s proteázovými inhibitory a poté byl vzorek naředěn dle protokolu pro stanovení jednotlivých parametrů.

Stanovení MMP a TNF- α

Stanovení MMP-2, MMP-9 a TNF- α v supernatantu bylo provedeno metodou sendvičové ELISA dle protokolu pro celkové MMP-2 (pro-, aktivní- a TIMP vázané MMP-2), celkové MMP-9 (pro-, aktivní a TIMP vázané MMP-9) a TNF- α v supernatantu (R&D, Biomedica, Česká republika). Stanovení celkové MMP-2,

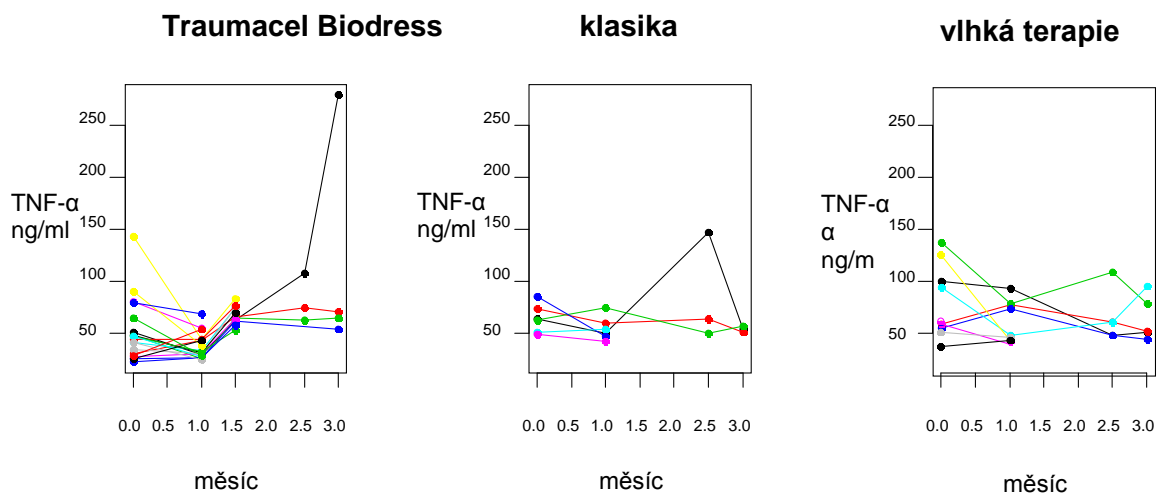
celkové MMP-9 a celkového TNF- α je kvantitativní imunoanalýza měřící tyto parametry v supernatantu, kde monoklonální specifická protilátka je navázána na mikrotitrační destičce. Standard, kontrola a vzorky jsou pipetovány do příslušných jamek a celkové MMP-2, MMP-9 a TNF- α jsou navázány na imobilizovanou protilátku. Po vymytí nenavázaných látek je přidána enzymaticky značená polyklonální protilátka specifická pro celkové MMP-2, MMP-9 a TNF- α do každé jamky. Následuje promytí pro odstranění nenavázané protilátky a poté přidání substrátového roztoku. Barevná změna odpovídá množství celkové MMP-2, celkové MMP-9 a celkového TNF- α ve vzorku. Po zastavení reakce je intenzita barevného zbarvení měřena při 450 nm s referenční vlnovou délkou 570 nm, za použití readeru.

Statistické zpracování výsledků

Statistické zpracování dat bylo provedeno metodou ANOVA (hladina významnosti $p = 0,05$).

Výsledky

Hladina prozánětlivého cytokínu TNF- α se signifikantně snížila po 1 měsíci léčby pro pacienty léčené pomocí Traumacelu Biodress ($p = 0,031$). U ostatních dvou skupin pacientů hladina TNF- α zůstala nezměněna (graf 1).



Graf 1: Množství TNF- α v gáze (ng/ml) u jednotlivých pacientů v průběhu léčby.

Závěr

Statisticky významný pokles parametru TNF- α po 1 měsíci léčby byl zaznamenán jen ve skupině léčené pomocí Traumacelu Biodress. TNF- α je pro-zánětlivý cytokín, který se účastní první fáze hojení ran. Ve větším množství je přítomen i při chronických onemocněních, kde stimuluje produkci MMP a tím znesnadňuje uzavření rány. Signifikantní snížení TNF- α znamená snížení zánětlivé odpovědi a potlačení produkce MMP a tím spojené rychlejší uzavření rány. Hodnoty MMP-2 a MMP-9 se pro všechny tři skupiny statisticky významně nelišily. Nejednoznačnost výsledků může být dána velmi malým počtem pacientů, proto bude studie vzhledem k zajímavým výsledkům pokračovat na větším počtu pacientů a sledovaných markerů.

Zkratky

MMP – matrixové metaloproteinázy

EGF – epidermální růstový faktor

PDGF - růstový faktor odvozený od destiček

TNF- α – tumor nekrotizující faktor alfa

TIMPs – tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz

Literatura

Daniels J. T., Cambrey A. D., Occleston N. L. et al. Matrix Metalloproteinase Inhibition Modulates Fibroblasts-Mediated Matrix Concentration and Collagen Production In Vitro. *Invest Ophthalmol and Vis Sci* 44,3: 1104-1110, 2003.

Yu, A., Murphy, A. N., Stevenson, W. G. 72-KDa gelatinase (gelatinase A): structure, activation, regulation, and substrate specificity. In: Parks, W. C. (ed.) *Matrix Metalloproteinases*. New York: Academic Press, 85–113, 1998.

Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K. et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4, 2: 197–250, 1993.

Han, Y. P., Tuan, T. L., Wu, H. et al. TNF- α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF- κ B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 114, Pt1: 131–139, 2001.

Poděkování

Studie vznikla za podpory společnosti Bioster, a.s a projektu MŠMT 6198959216 a infrastruktury projektu CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

Autoři nemají žádný komerční zájem na výsledcích studie.

Autoři děkují paní Mgr. Janě Vrbkové z Katedry matematické analýzy, PřF UP Olomouc za statistické zpracování dat.

Kontakt:

Mgr. Jana Franková, Ph.D.

Univerzita Palackého Olomouc

Lékařská fakulta

Ústav lékařské chemie a biochemie

Hněvotínská 3

775 15 Olomouc

Email: frankova0@seznam.cz