



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

NOVÉ MOŽNOSTI V HOJENÍ RAN

NEW POSSIBILITIES IN WOUND HEALING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Laura Nováková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1512/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Laura Nováková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Nové možnosti v hojení ran

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Příprava různých kožních krytů ran
- 3) Charakterizace připravených krytů
- 4) Testování interakce připravených krytů s humánními buňkami
- 5) Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Laura Nováková
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práca je zameraná na štúdium vlákenných kožných krytov pripravených metódou elektrospinningu z prírodných biopolymérov. Do krytov boli pridané 3 účinné zložky: ampicilín, ibuprofén a kolagenáza, ktoré majú za úlohu tlmiť bolesť, znížiť riziko infekcie a selektívne odstrániť nekrotické tkanivo v rane.

Teoretická časť popisuje terapeutické kryty aktuálne dostupné na trhu a najbežnejšie metódy výroby nanovláken.

Experimentálna časť vyhodnocuje optimalizáciu prípravy želatinových, alginátových a chitosanových vlákenných krytov, ktoré boli následne obohatené aktívnymi látkami a ich postupné uvoľňovanie do modelového prostredia sa stanovilo spektrofotometricky. Sledovali sa antimikrobiálne účinky voči kmeňom *E. coli*, *S. epidermidis* a antimykotická aktivita voči kvasinke *C. glabrata*. Na záver pomocou dvoch testov cytotoxicity na bunkovej línii ľudských keratinocytov HaCaT potvrdila bezpečnosť pripravených produktov, ktoré v budúcnosti môžu slúžiť ako bioaktívne kožné kryty.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

kožné rany, kožné kryty rán, nanovláknenné kryty, alginát, chitosan, želatina, analgetikum, antibiotikum, enzýmy, cytotoxicita, test viability, keratinocyty

ABSTRACT

The diploma thesis is focused on the study of fibrous wound dressings prepared by electrospinning method from natural biopolymers. Three active ingredients were added to the dressings: ampicillin, ibuprofen and collagenase, which are responsible for relieving pain, reducing the risk of infection and selectively removing necrotic tissue in the wound.

The theoretical part describes the therapeutic dressings currently available on the market and the most common methods of nanofiber production.

The experimental part evaluates the optimization of the preparation of gelatin, alginate and chitosan fibrous wound dressings, which were subsequently enriched with active substances and their gradual release into the model environment was determined spectrophotometrically. Antimicrobial effects against *E.coli* and *S. epidermidis* strains and antifungal activity against *C. glabrata* yeast were monitored.

Finally, two cytotoxicity tests on the human keratinocyte cell line HaCaT confirmed the safety of the prepared products, which can serve as bioactive skin dressings in the future.

KEYWORDS

skin wounds, skin wound dressings, nanofiber dressings, alginate, chitosan, gelatin, analgesic, antibiotic, enzymes, cytotoxicity, viability assay, keratinocytes

NOVÁKOVÁ, Laura. *Nové možnosti v hojení ran*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131444>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Matoušková.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som chcela poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce, Ing. Petre Matouškovej, Ph. D. za trpezlivosť a pomoc počas celej mojej bakalárskej aj diplomovej práce. Ďalej moje poďakovanie patrí aj Ing. Renáte Pavelkovej za cenné rady a inšpiráciu pri práci. Mojej rodine a priateľom vďačím za silnú dôveru a obrovskú podporu v priebehu celého štúdia na chemickej fakulte.

Obsah

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1 Anatomia kože (cutis).....	9
2.1.1 Pokožka (epidermis).....	9
2.1.2 Zamša (corium)	11
2.1.3 Podkožné väzivo (tela subcutanea)	11
2.1.4 Antimikrobiálne látky kože	11
2.1.5 Transport aktívnej látky cez kožu	11
2.2 Kožné rany a ich klasifikácia.....	12
2.2.1 Proces hojenia rany	13
3. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	15
3.1 Terapeutické kožné kryty	15
3.1.1 Hydrogély.....	16
3.1.2 Hydrokoloidy	17
3.2 Nanovlákná.....	17
3.2.1 Želatinové vlákna	18
3.2.2 Alginátové vlákna	19
3.2.3 Chitosanové vlákna	21
3.2.4 Veľkovýroba nanovláknien	23
3.2.5 Príprava krytov pomocou elektrospinningu	23
3.2.5.1 Viacvrstvový kryt.....	24
3.2.6 Príprava krytov pomocou forcespinningu	26
3.3 Nové prístupy v topickej liečbe rán.....	26
3.3.1 Enzýmy.....	26
3.3.1.1 Kolagenáza	27

3.3.2	Antibiotiká.....	27
3.3.2.1	<i>Ampicilín</i>	27
3.3.3	Analgetiká	28
3.3.3.1	<i>Ibuprofén</i>	28
3.4	Testovanie bezpečnosti	29
3.4.1	Predklinické štúdie	29
3.4.2	Klinické štúdie.....	29
3.5	Práca s bunkovými kultúrami	30
3.5.1	Charakteristika bunkových kultúr	30
3.5.1.1	<i>Keratinocyty</i>	31
3.5.2	Základné vybavenie.....	31
3.5.3	Testy preukazujúce viabilitu buniek	31
3.5.4	Test hojenia rán	33
4.	CIEĽ PRÁCE	34
5.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	35
5.1	Používané prístroje a chemikálie	35
5.1.1	Chemikálie použité na prípravu krytov	35
5.1.2	Chemikálie použité pri kultivácii humánných buniek a MTT testoch	35
5.1.3	Používané mikroorganizmy	35
5.1.4	Používané humánne bunky	36
5.1.5	Vybrané aktívne zložky krytov	36
5.2	Optimalizácia prípravy rôznych nanovláknenných krytov	36
5.2.1	Optimalizácia prípravy chitosanových krytov	36
5.2.2	Optimalizácia prípravy alginátových krytov	36
5.2.3	Optimalizácia prípravy želatinových krytov	37
5.2.4	Želatinové vlákna	37
5.3	Optimalizácia viacrstvových želatinových krytov	37

5.3.1	Želatinovo-alginátové kryty	38
5.3.2	Želatinovo-chitosanové kryty	38
5.4	Charakterizácia kožných krytov	39
5.4.1	Dilučný test	39
5.4.1.1	Príprava živného média	39
5.4.1.2	Kultivácia mikroorganizmov.....	39
5.4.2	Spektrofotometrické stanovenie	40
5.4.3	Morfologické zmeny krytu v modelovom prostredí	40
5.5	Kultivácia kožných buniek	40
5.5.1	Výmena média.....	41
5.5.2	Pasážovanie	41
5.5.3	Počítanie buniek	42
5.5.4	MTT test.....	43
5.5.5	LDH test	44
5.5.6	Scratch test	44
6.	DISKUSIA VÝSLEDKOV	46
6.1	Charakterizácia pripravených krytov rán	46
6.1.1	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity pomocou zákalu	46
6.1.2	Stanovenie postupného uvoľňovania terapeutík	49
6.1.3	Testovanie cytotoxicity aktívnych látok	52
6.1.4	Test hojenia rán	56
7.	ZÁVER.....	58
8.	ZDROJE	59
9.	ZOZNAM SKRATIEK	72

1. ÚVOD

Príchod nanotechnológií rozpútal obrovské vyhliadky pre rozvoj nových produktov a aplikácií pre široký okruh priemyselných odvetví ako aj pre farmáciu, medicínu či kozmetiku. Dnešná technológia umožňuje prípravu nano alebo mikrovláknenných materiálov, ktoré napodobňujú vlákennú štruktúru extracelulárnej matrix. Výskyt nehojajúcich rán má dnes stúpajúcu tendenciu a preto významnú úlohu zohráva využívanie inovatívnych prístupov, ako je napríklad inkorporácia aktívnych látok do krytov rán. Pri nehojajúcich ranách sa stretávame s tým, že tkanivo na povrchu kožnej lézie je kontaminované a je potrebné odstrániť baktérie a staré bunky zo spodiny rany, ktoré zabraňujú hojeniu na okrajoch defektu a sú zdrojom zápalu. Tu je priestor pre použitie moderných krytov a obväzových materiálov, ktoré obsahujú širokospektrálne antibakteriálne látky, enzýmy alebo iné terapeutiká, pričom aktívne látky sú uvoľňované postupne do rany. Nanovláknenné kryty by mali zabrániť prieniku baktérií vďaka malej veľkosti pórov a zároveň ich veľký merný povrch by mal podporiť proces vlhkého hojenia. Zámerom diplomovej práce je pripraviť kožné kryty, ktorými podporíme proces hojenia tak, aby prebiehalo v čo najkratšom možnom čase a s čo najlepšimi kvalitatívnymi výsledkami.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Anatómia kože (cutis)

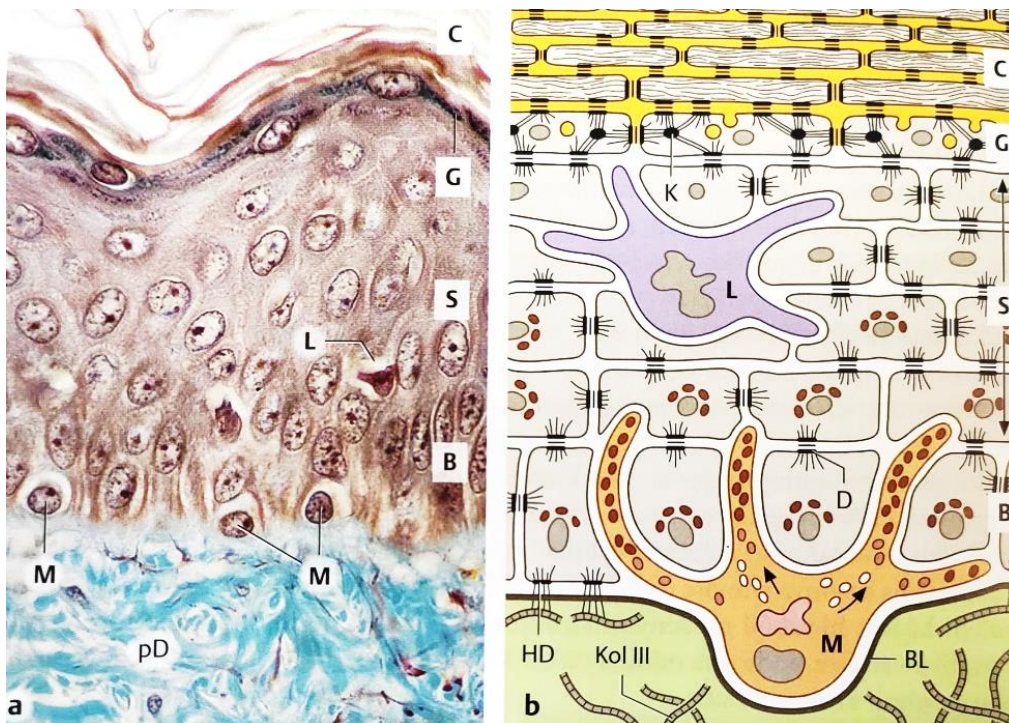
Koža je zložitý, samoobnovujúci sa orgán, ktorý je našou primárnou obrannou bariérou proti hrozbám, ktoré môže organizmus stretnúť. Koža funguje ako biofyzikálne rozhranie medzi vnútorným a vonkajším prostredím ľudského tela. U dospelých ľudí predstavuje až 16% celkovej telesnej hmotnosti a pokrýva plochu asi 1,6 m² [1], [2]. Poskytuje štrukturálnu integritu a pružnosť, umožňuje selektívnu absorpciu, ukladanie antioxidantov, riadi termoreguláciu prostredníctvom prívodu krvi do kože a potenía a tiež môže stimulovať regeneráciu pokožky pri poranení. Čím je človek mladší, tým ju má viac zvlnenú a tým dochádza k lepšej výžive kože. Vzhľadom na túto skutočnosť a úlohu pokožky ako hlavnú líniu obrany proti vonkajšiemu prostrediu je zrejmé, že akákoľvek významná zmena mechanických vlastností, ktorá by mohla narušiť štrukturálnu integritu a bariérovú funkciu, má potenciál spôsobiť vážne zdravotné problémy [2]. Dôležitosť kože ako bariéry ilustruje úmrtnosť spojená s popáleninami na veľkej ploche, kde zvýšená transepidermálna strata vody (TEWL) vrcholí dehydratáciou, zlyhaním obličiek a šokom. Koža sa skladá z troch vrstiev: epidermis, dermis a hypodermis, ktoré sa všetky výrazne líšia svojou anatómiou a funkciou [3].

2.1.1 Pokožka (epidermis)

Pokožka je definovaná ako vrstvený dlaždicový epitel, ktorý primárne obsahuje keratinocyty v progresívnych štádiách diferenciácie. Obsahuje 5 až 12 vrstiev buniek na sebe. Hrúbka epidermy sa pohybuje od 0,05 mm na očných viečkach do 0,8 mm na chodidlách a dlaniach [4]. Keratinocyty tvoria asi 95% populácie epidermálnych buniek. Keratinocyty produkujú proteín keratín a sú hlavnými stavebnými bunkami epidermy. Ďalšími bunkami sú melanocyty, langerhansove bunky a merkelove bunky [2], [4], [5].

Melanocyty sú zodpovedné za pigmentáciu kože. V špecializovaných organelách sa syntetizuje tmavo hnedý pigment melanín (melanozómy). Jeden melanocyt zásobuje priemerne 36 keratinocytov. Melanín okrem iného absorbuje UV žiarenie a chráni tým mitoticky aktívne bunky bazálnej vrstvy pred škodlivým účinkom slnečného žiarenia na jej genóm. Langerhansove bunky sú dendritické bunky epidermy a niektorých slizníc (napr. vagína, konečník). Sú to antigén prezentujúce bunky (z angl. antigen presenting cell) imunitného systému v koži. Sú rovnomerne rozložené medzi keratinocytmi (približne 500 buniek/mm²) [6]. Epiderma je avaskulárna (neobsahuje žiadne krvné cievy), a teda je úplne závislá na dodávaní živín a likvidácii odpadu cez bazálnu membránu. V medzibunkových štrbinách *stratum corneum*

sa nachádzajú polárne lipidy, ceramidy (Obrázok 1, žltá oblasť). Podkladom difúznej bariéry je predovšetkým spojenie pomocou lipidov [4], [5].



Obrázok 1: Vrstvy epidermis [6]

Obrázok 1 ilustruje epidermu tváre (zväčšenie 645x) a vľavo je jej zjednodušená schéma. Epiderma vytvára niekoľko vrstiev, ktoré predstavujú rôzne štádiá keratinizácie, čiže diferenciácie buniek. V najvrchnejšej vrstve *stratum corneum* (C) sa nachádzajú úplne zrohovené bezjadrové keratinocyty, ďalej sú to vrstvy *stratum granulosum* (G), *stratum spinosum* (S) a *stratum basale* (B). Táto vrstva je napríklad zodpovedná za vznik keratinocytov. Na obrázku tiež vidíme langerhansovu bunku (L), melanocyt (M), dezmozóm (D). Šípky v M, ukazujú smer transportu dozrievajúcich melanozómov. Tieto bunky sa potom vylučujú z kože procesom nazývaný deskvamácia, ktorý trvá približne 28 dní [5].

Zatiaľ čo iné suchozemské zvieratá, ako napríklad hmyz, sa prispôbili pomocou kutikuly, u cicavcov sa vyvinula jedinečná a pružná vrstva nazývaná *stratum corneum*. Produkty *stratum corneum*, vrátane voľných mastných kyselín, polárnych lipidov a glykosfingolipidov, sa hromadia v medzibunkových priestoroch a rohovej vrstve, vykazujú antimikrobiálne vlastnosti a fungujú ako prvá línia obrany. [1], [2], [4].

2.1.2 Zamša (corium)

Zamša je súvislá väzivová vrstva uložená pod pokožkou. Jej hrúbka je 15 až 40 krát väčšia ako hrúbka pokožky. Má významnú úlohu pri hojení rán. Je tvorená hlavne z vlákien kolagénu a elastínu, ktoré zabezpečujú pružnosť a hydratáciu pokožky [7]. Molekula kolagénu je zložená z troch prepletených reťazcov zakomponovaných do vody, preto sa kladie veľký dôraz na pitný režim. Obsah vody je teda určujúci pre turgor kože [6]. Nachádza sa tu aj malá časť hyaluronanu. Primárnym typom buniek v zamši je fibroblast, ktorý produkuje extracelulárne štrukturálne proteíny, glykozaminoglykány, kolagénové a elastínové vlákna. Rovnako sa tu nachádzajú krvné cievy, lymfatické uzliny, potné žľazy a nervy [2], [5]. Zo zamše vyrastajú vlasy, chlpy a nechty [8].

2.1.3 Podkožné väzivo (tela subcutanea)

Je to najhlbšia vrstva kože a obsahuje tukové bunky, ktoré môžu vytvoriť tukové vankúšiky. Obsahuje potné žľazy, vlasové cibulky, tepny, žily, lymfatické cievy a nervové vlákna, ktoré sú v jej vrchnej časti [9].

2.1.4 Antimikrobiálne látky kože

Povrch kože, ktorý je neustále vystavený vplyvom látok produkovaných mikróbmami, je chránený rôznymi antibakteriálnymi látkami. Tieto látky produkujú keratinocyty a potné žľazy. Ide napríklad o psoriazín, dermicidín či lyzozým. Tieto antimikrobiálne peptidy sú neoddeliteľnou súčasťou vrodeneho imunitného systému. Dermicidín (DCD) je napríklad konštitutívne exprimovaný v potných žľazách človeka, psoriazín (S100A7) zas v ľudskom jazyku [10], [11]. Okrem toho môžu keratinocyty produkovať po poranení kože celú radu cytokínov spôsobujúcich zápal, ktorý priláka bunky imunitného systému [5]. Cytokíny sú malé proteínové signálne molekuly a indukujú pohyb, diferenciáciu a apoptózu [11].

2.1.5 Transport aktívnej látky cez kožu

Výhody transdermálneho podávania sú najmä v tom, že narozdiel perorálnemu podávaniu obchádza gastrointestinálny trakt, čo následne vedie k zvýšeniu biologickej dostupnosti a tiež zníženiu potrebnej dávky čo následne znižuje nežiaduce účinky. Náplast' alebo kryt je jednoduchý v jeho aplikácii a oproti injekčnému podaniu je značnou výhodou neinvazívnosť [12].

Prienik chemických látok prebieha buď adsorpciou a teda sa látka viaže v najvrchnejšej rohovej vrstve a je aj s odlupujúcimi bunkami odstránená a teda sa nedostáva do hlbších štruktúr kože ani do systémovej cirkulácie. Druhou možnosťou je absorpcia, kedy sa látka

dostáva do hlbších štruktúr pokožky a to vďaka kontaktu medzibunkového tkanivového moku a ciev. Absorpcia sa ďalej rozdeľuje na:

- Penetráciu – vstup látky do stratum corneum
- Resorpciu – vstup látky do kožných lymfatických alebo krvných ciev
- Permeáciu – prestup látky do ďalšej, štruktúrne odlišnej vrstvy kože [13]

2.2 Kožné rany a ich klasifikácia

Ranu definujeme ako narušenie anatomickej integrity kože [14]. Podľa etiológie delíme rany na mechanické (resp. traumatické), termické, chemické a radiačné. Ak sú okraje rany priložené k sebe napríklad chirurgickou sutúrou a hoja sa prerastaním okrajov jedná sa o hojenie *per primam*. Pri komplikovanej reparácii tkaniva (výskyt tekutiny alebo hnisu v rane) sa tkanivový defekt hojí množením granulačného tkaniva až pokiaľ nie je úplne zacelený, hovoríme vtedy o hojení *per secundam*. Podľa priebehu hojenia delíme rany na akútne a chronické. Termín chronickej rany v minulosti zdôrazňoval iba časovú prognózu, čiže rana nepreukazovala adekvátne známky hojenia po dobu 6 až 8 týždňov. Dnes Európska asociácia spoločností hojenia rán (EWMA) zaviedla termín *non-healing wound*, čiže nehojaca sa rana [15], [16] kde sú hlavné príčiny vzniku rán cievna nedostatočnosť, diabetes mellitus a lokálny tlak na tkanivá.

Všeobecne je možné nehojace (chronické) rany rozdeliť do troch typov:

- Dekubity: Dekubity alebo aj preležaniny sa zvyčajne vyskytujú u jedincov, ktorí sú pripútaní na lôžko alebo majú obmedzenú pohyblivosť. Podľa druhu a intenzity je stupeň poškodenia klasifikovaný od začervenania (erytém), povrchovej rany až po rozsiahlu deštrukciu tkanív, ktorá môže siahať až ku kosti [11].
- Arteriálne a venózne vredy: Arteriálne vredy (*ulcus cruris arteriosum*) sú lokalizované na plochách vystavovaných menším traumám ako je predná hrana tíbie alebo distálne články prstov. Nekróza v celej hrúbke kože postihuje podkožné tkanivo, ligament ale aj kosti. Veľmi častou lokalizáciou venózneho vredu (*ulcus cruris venosum*) je distálne predkolenie. Spodina rany je obvykle tvorená hypergranuláciami s fibrínovým povlakom. Venózne vredy sú v porovnaní s arteriálnymi viac plytké, menej bolestivé [12], [16].
- Diabetické vredy: Do tejto skupiny patria vredy dolných končatín u pacientov s cukrovkou. Dôležitým patofyziologickým parametrom je diabetická porucha hojenia

rán. V dôsledku toho patogény ranu kolonizujú a infikujú. Typickým patogénom je *Staphylococcus aureus*, ktorý ak sa nelieči môže spôsobiť osteomyelitídu [17].

2.2.1 Proces hojenia rany

Hojenie rán je jedným z najkomplexnejších procesov v ľudskom tele. Objavili sa tiež objavy vzácnych podskupín kmeňových buniek v koži, ktoré sú v nepoškodenom stave unipotentné, ale po poranení pokožky sa stávajú multipotentnými [18]. Fázy hojenia delíme na exsudatívnu (zápalovú), proliferáciu a diferenciaciu fázu. Prvá fáza za fyziologických podmienok trvá asi 3 dni a jej cieľom je vytvoriť akútnu zápalovú odpoveď. Dilatáciou ciev a zvýšením permeability kapilár dochádza k zosilneniu exsudácií krvnej plazmy do interstícia. Týmto sa podporí migrácia leukocytov, neutrofilných granulocytov a makrofágov do oblasti rany. Prostredníctvom tvorby hyaluronanových a kolagénových depozit v matrici sa vytvorí granulačné tkanivo a nasleduje epitelizácia tkaniva. Konečná fáza je ukončená tvorbou jazvy a remodeláciou matrixu [11], [20].

Zápal môžu vyvolať mechanické faktory (odreniny, porezanie), fyzikálne faktory (popálenie), chemické faktory (poleptanie), biologické faktory (baktérie, vírusy) alebo nutričné faktory (hypoxia). Úlohou zápalu je likvidácia, zriedenie škodliviny z daného tkaniva, prípadne aspoň jeho ohraničenie. Odpoveď organizmu je buď lokálna alebo systémová. Chemotaktické faktory (chemotaxíny) sú látky, ktoré do miesta, kde sa rozvíjal zápal lákajú neutrofile, makrofágy alebo T-lymfocyty. Tieto imunitné bunky majú dostatočný „arsenál“, ktorými sú schopné usmrtiť baktérie a iné mikroorganizmy, ktoré infikovali poranené tkanivo. Neutrofile, ktoré „vystrelili“ svoje antimikróbné strely podľaňnú naprogramovanej bunkovej smrti (apoptóze) [19], [20]. Neaktívne neutrofile sú v cirkulácii približne 6-7 hodín. Hnis obsahuje živé alebo odumreté neutrofile a usmrtené baktérie [21].

Práve dostatočné množstvo makrofágov zohráva rozhodujúci význam pre ďalší postup hojenia. V priebehu druhej fázy prevažuje proliferácia buniek a to s cieľom vytvoriť nové cievy a vyplniť defekt granulačným tkanivom. Zrazenina a okolité tkanivo uvoľňujú prozápalové cytokíny a rastové faktory, ako je transformačný rastový faktor (TGF) $-\beta$, rastový faktor odvodený z krvných doštičiek (PDGF), fibroblastový rastový faktor (FGF) a epidermálny rastový faktor (EGF). [17], [22], [23]. Jednotlivé fázy hojenia sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke:

Tabuľka 1: Jednotlivé fázy hojenia rán [24]

Fáza:	Bunkový dej:
1. Hemostáza	vazokonstrikcia agregácia krvných doštičiek, degranulácia a tvorba fibrínu (trombus)
2. Zápal	infiltrácia neutrofilov a diferenciácia na makrofágy infiltrácia lymfocytov
3. Proliferácia	reepitelizácia angiogenéza syntéza kolagénu tvorba extracelulárnej matrix (ECM)
4. Prestavba	prestavba kolagénu vytváranie nových krvných ciev

3. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 Terapeutické kožné kryty

Starostlivosť o rany predstavuje pre zdravotnícke služby enormné bremeno, pokiaľ ide o náklady na obvazy, ošetrovateľskú starostlivosť a chirurgické zákroky. Rana predstavuje pre mikroorganizmy potenciálne „ideálne“ prostredie, v ktorom môže rásť a deliť sa, pretože má ideálnu teplotu a vlhkosť [16]. Dnes je už štandardom u nehojacích rán vlhká atraumatická liečba. Ak dôjde ku vyschnutiu rany, vytvorí sa eschara z fibrínu a odumretých neutrofilov, vtedy si musia keratinocyty „preraziť“ cestu pomocou proteáz a enzýmov [10]. Vlhká terapia podporuje čistenie rany, pôsobí analgeticky, nelepí sa na ranu a minimalizuje zápach. Ideálny kryt by mal byť biokompatibilný, mal by tiež zadržiavať vlhkosť, prepúšťať plyny no zároveň tvoriť bariéru proti mikroorganizmom. Nanovláknitý materiál má nakoľko jemnú štruktúru, že ním neprejdú baktérie ani vírusy, molekuly kyslíka však veľmi dobre prepúšťa, čo je jeho veľká výhoda oproti klasickým obvazovým materiálom [25].

Ďalej by mal absorbovať prebytočný exsudát a rozpustiť nekrotické tkanivo a fibrín. Dôležité je tiež aby podporoval tvorbu granulačného tkaniva na urýchlenie delenia, proces reepitelizácie a migrácie keratinocytov [26], [27]. Mnohé kryty sú vytvorené tak, že ochraňujú spodinu rany tým, že udržiavajú vlhké prostredie na povrchu a zároveň ich kontaktná vrstva je obsiahnutá látkami, ktoré pri výmene krytu znížia traumatizáciu a poškodenie novovznikajúceho epitelu na minimum [10], [27].

Kryty rán môžeme rozdeliť na primárne a sekundárne. Primárne krytie slúži na tesnenie a je delí sa na adherentné, neadherentné a na terapeutické krytie. Sekundárne krytie fixuje primárne a absorbuje prebytočný exsudát z rany [28].

Najefektívnejšie kožné kryty v praxi sú najmä polymérové filmy, peny, hydrogély, algináty, hydrokoloidy, kryty s kyselinou hyalurónovou alebo s aktívnym uhlím a striebrom. Kožné kryty na báze polymerného filmu a peny sú rozšírené hlavne kvôli ich schopnosti napodobniť fyziologické prostredie ECM. Použitie krytov pri hojení rán je obmedzené ich špecifickými vlastnosťami. Napríklad filmy a hydrokoloidy majú zlú priepustnosť pre mikroorganizmy a vodu. Algináty sa používajú vo väčšine prípadov iba pre prvý stupeň hojenia rán. Vyššie uvedené kryty sa väčšinou používajú na rôzne stupne traumy alebo všeobecne na chirurgické rany [29]. Nové techniky liečby rán zahŕňajú rastové faktory, perspektívne kmeňové bunky a génovú terapiu. Medzi bioaktívne krytia dostupné u nás patria inhibítory patologicky zvýšenej aktivity matrixmetaloproteináz ako napríklad Promogran, DermaX alebo Traumacel Biodress.

Ďalšou technikou v liečbe chronických ulcerácií je aplikácia kožnej substitúcie, ktorá bola vyrobená metódou tkanivového inžinierstva a obsahuje živé bunky ako fibroblasty a keratinocyty. Novým biologickým krytom dostupným na našom trhu je Xe-Derma. Jedná sa o sterilný biokompatibilný kryt vyrobený z prasačích xenotransplantátov odstránením epidermis a ostatných buniek [30]. Príklad liečivého účinku krytu Xe-Derma v porovnaní s antibakteriálnym krémom Flammazine u pacienta spáleného parou acetónu (hlboké dermálne popálenie) ilustruje Obrázok 2. Na 9 deň sa oblasť pod krytom Xe-Derma uzdravila, zatiaľ čo oblasť pod Flamazinom sa nezhojila až do 18. dňa [31].



Obrázok 2: Porovnanie krytu Xe-Derma s antibakteriálnym krémom Flammazine [31]

3.1.1 Hydrogély

Hydrogélkové krytia (napr. Hydrosorb, Suprasorb) sú prírodné alebo syntetické zosieťované polyméry s obsahom vody nad 90 %. Trojrozmerné polymérne gély majú hydrofilnú pórovitú štruktúru, ktorá umožňuje vysoký stupeň absorpcie vody [27], [32]. Sú teda schopné rehydratovať suché tkanivo a zároveň na druhej strane absorbovať sekrét exsudujúcich rán [32]. Hydrogélkové krytia sú typom pokročilého materiálu, spĺňajúci vlastnosti ideálneho moderného obväzu na rany. Nové trendy smerujú viac k prírodným polymérnym materiálom, ktoré sú obnoviteľné, lacné, ľahko spracovateľné a okrem fyzikálnych vlastností sú aj biologicky účinné, predovšetkým v zmysle hojenia rany alebo antibakteriálnych vlastností. Ak sa do hydrogélového krytia pridajú aj biologicky účinné látky, je možné obsiahnuť celú oblasť aplikácie hojenie rán od akútnych až po chronické rany [33]. Na Obrázok 3 vidíme aplikáciu hydrogélového krytia, ktoré poskytuje ciele antibakteriálnu ochranu v mieste vpichu.



Obrázok 3: Aplikácia hydrogélového krytia Tegaderm i.v. [34]

3.1.2 Hydrokoloidy

Hydrokoloidné krytia (napr. Granuflex, Comfeel Plus, Hydrocoll) patria historicky medzi najstaršie druhy obväzov, ktoré vytvárajú vlhké prostredie. Vonkajšiu vrstvu tvorí pre vodu nepriepustná penová polyuretánová hmota. Vnútorňá vrstva je zase absorpčná a obsahuje polymérový komplex želatíny, pektínu a karboxymetylcelulózy. Hydrokoloidné krytie reaguje so sekrétom rany a vytvára tak gélovú hmotu, ktorá zaisťuje priaznivé prostredie pre hojenie rany s vlhkosťou okolo 90 %. Podľa intenzity sekrécie, môže byť kryt ponechaný na rane až týždeň. Krytie z hydrovláken (napr. Aquacel, Aquacel Ag) je novšou formou hydrokoloidného krytia. Hydrovlákna sú vyrobené zo 100 % hydrokoloidu. Vzhľadom k tomu, že ich absorpčná kapacita je značne vysoká (vyššia ako u alginátov), môžu byť na rane ponechané dlhšie než iné absorpčné krytia [32].

3.2 Nanovlákná

Česká republika je svetovým lídrom vo výskume, vývoji a priemyselnej výrobe nanovláken. V roku 2004 vyvinul tím profesora O. Jirsáka na Technickej univerzite v Liberci prvý stroj na priemyselnú výrobu nanovláken na svete, ktorý je založený na jedinečnej patentovanej technológii Nanospider™ (Obrázok 4) a bol vyvinutý v spolupráci so spoločnosťou Elmarco, ktorá je ich jediným výrobcom a tieto stroje neustále vyvíja a zdokonaľuje [35].



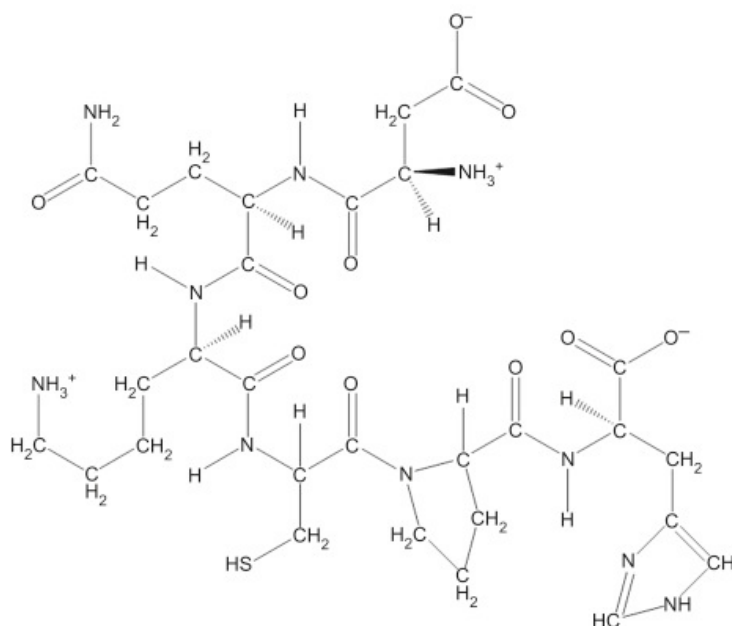
Obrázok 4: Výroba nanovláknien technológiou Nanospider [36]

Medzi najpoužívanejšie metódy výroby nanovláknien patrí:

- *fúkanie taveniny*
- *elektrospinning*
- *hydrotermálne metóda*
- *forcespinning*
- *fázová separácia*
- *dĺženie vlákna*

3.2.1 Želatinové vlákna

Želatína je podľa českého liekopisu opisovaná ako čistená bielkovina získaná z živočíšneho kolagénu a to buď čiastočnou kyslou alebo alkalickou hydrolýzou [37]. Používa sa v potravinárskom a farmaceutickom priemysle ako stabilizátor (jogurt), zahusťovadlo (džem), vďaka svojim povrchovo aktívnym vlastnostiam ako penidlo, emulgátor alebo aj zmáčadlo. Želatína patrila k prvým vhodným komerčným surovinám, ktoré slúžili ako konzervačná látka pre mäsové výrobky. Svoje využitie má najmä pri obalení kapsúl liekov a výživových doplnkov alebo tiež aj ako pomocná látka pri výrobe vakcín proti osýpkam, besnote, záškrtu a tetanu. Vzhľadom k jej biokompatibilite a biologickej odbúrateľnosti sa želatína často využíva pre nosiče liečiv alebo taktiež ako substrát bunkovej kultúry v rôznych formách a to aj vo forme elektrostaticky zvláknovaných nanovláknien. Potrebným krokom je zosieťovanie želatínových molekúl, aby sa zabránilo jej rozpusteniu vo vodných roztokoch [38], [39]

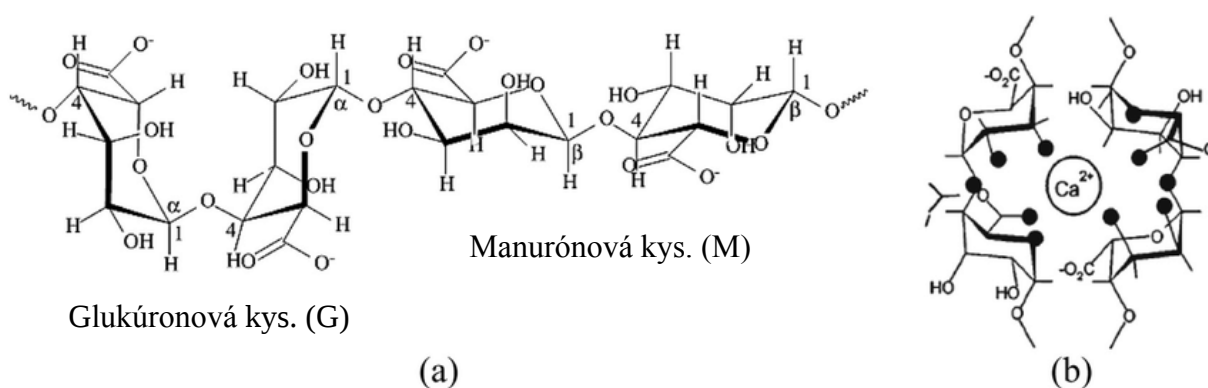


Obrázok 5: Štruktúra želatinového polypeptidu [40]

Submikrometrické a nanometrové želatinové vlákňité matrice simulujúce štruktúru ECM ľudských tkanív a orgánov a našli široké využitie v oblasti tkanivového inžinierstva (regenerácia kostí, inžinierstvo nervového tkaniva, srdcového tkaniva, distribúcia liečiv). Pre účely hojenia rán, je želatína využívaná vo forme špongie s epidermálnym rastovým faktorom (EGF). Tento proces popisuje štúdia polymérneho dvojvrstvého obväzu obsahujúceho mikrosféru nabitú EGF. Výsledok ich experimentu viedol k výsledku, že želatinové špongie mali podstatný vplyv na zmenšenie plochy rany, ako aj na odstránenie histologických znakov poškodenia tkaniva na ranách králičej kože [41].

3.2.2 Alginátové vlákna

Alginát patrí medzi lineárne polysacharidy a jeho štruktúra je tvorená z β -D-manurónovej kyseliny (M) a α -L-glukurónovej kyseliny (G), ktoré tvoria bloky opakujúcich sa zvyškov. Zloženie a postupnosť zvyškov G a M závisí od typu prírodných zdrojov použitých na extrakciu polysacharidu. Pokiaľ sú vápnikové katióny súčasťou disperzie alginátu sodného možno získať gél. Prednostne sa viažu na poly-glukurónové jednotky rovinným dvoj-dimenziálnym spôsobom, vytvára sa tak štruktúra zvaná „egg-box“ [42].



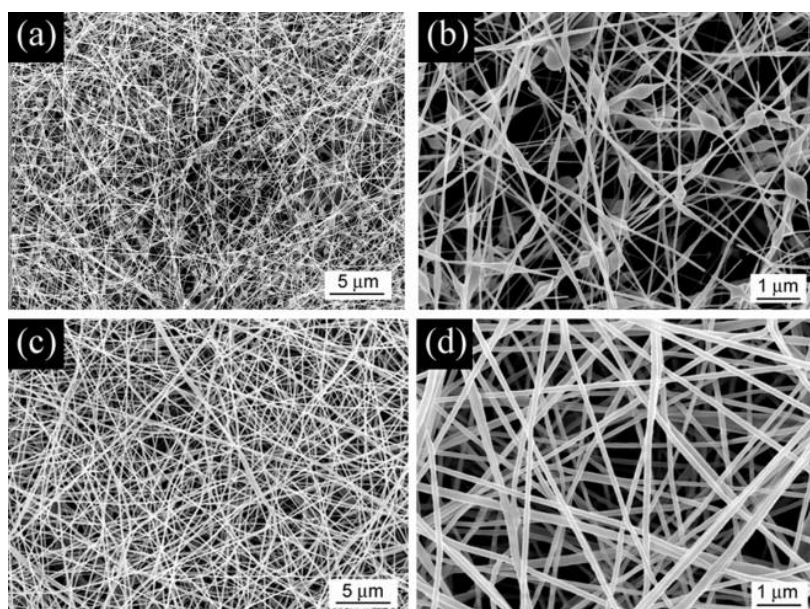
Obrázok 6: a) štruktúra alginátu b) model „egg-box“ predstavujúceho interakciu medzi kationmi vápnika a atómami kyslíka kyseliny glukurónovej [42]

Tento polymér vo vode tvorí nerozpustné vlákno a pri kontakte s ranou dochádza k výmene vápnikových iónov s iónmi sodíka, vlákno z alginátu vápenatého sa pomaly mení na vlákno alginátu sodného, pritom absorbuje veľké množstvo exsudátov. Táto premena na gélovitú formu pomáha udržiavať vlhké rozhranie na povrchu rany [43]. Súčasný štúdie navyše preukázali, že hydrogély alginátu vápenatého môžu zvyšovať zrážanie krvi uvoľňovaním iónov vápnika a teda pôsobia ako hemostatikum [44].

Hlavný faktor, ktorý obmedzuje elektrostatické zvlákňovanie vodného roztoku alginátu sodného je vysoké povrchové napätie. Na riešenie tohto problému sa pridáva k roztoku nenabitý syntetický polymér (napr. PEO a PVA), ktorý ovplyvní vodíkové väzby vytvorené medzi alginátom a týmito polymérmi. Tiež znižujú odpudivú silu medzi polyaniónovými molekulami a uľahčujú zapletenie reťazca. Polyetylénoxid je vo vode rozpustný, biologicky odbúrateľný biopolymér, ktorý vďaka svojej nízkej toxicite našiel využitie v mnohých biomedicínskych aplikáciách [45]. Táto látka schválená úradom pre kontrolu potravín a liečiv. Hladké a homogénne vlákna s distribúciou úzkych priemerov vlákien sa napríklad získali pri 5% koncentrácii s pomerom alginátu sodného a PEO 1:1 [46].

Ďalší polymér, ktorý by mohol byť pridávaný k roztoku je PEG, ktorý má rovnakú štruktúru ako PEO, ale rozdielnu molekulovú hmotnosť. PEG dosahuje molekulovou hmotnosťou iba do 20 000 g/mol. Potvrdilo sa, že dĺžka reťazca nosného polyméru zohráva dôležitú úlohu pri elektrostatickom zvlákňovaní biopolyméru a zatiaľ čo PEO vykazuje dobré výsledky, PEG nie je efektívnym nosným polymérom pre alginát vo viacerých štúdiách. Množstvo alginátu v zmesi môže byť zvýšené pridaním malého množstva látky Triton X-100, ktorý spôsobí, že povrchové napätie polymérnej zmesi poklesne na 29 mN/m, čo pravdepodobne prispieva

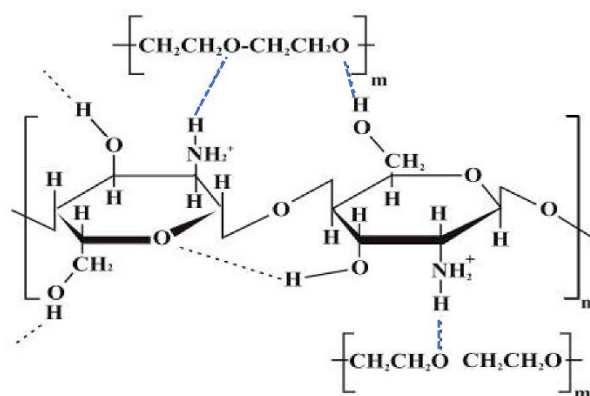
k morfológickému prechodu z guľôčkových vlákien na rovnomerné vlákna. Využitie nanovláken na báze alginátu v biomedicíne je podmienené necytotoxicitou materiálov, preto bol Triton X-100 nahradený látkou Pluronic F127 schválenou úradom pre kontrolu liečiv [45], [46], [47].



Obrázok 7: a), b) Snímky SEM nanovláken zložených z alginátu a PEO (pomer 6:4) bez povrchovo aktívnej látky, c), d) s povrchovou aktívnou látkou Pluronic F127 (2 hmotn. %) [47]

3.2.3 Chitosanové vlákna

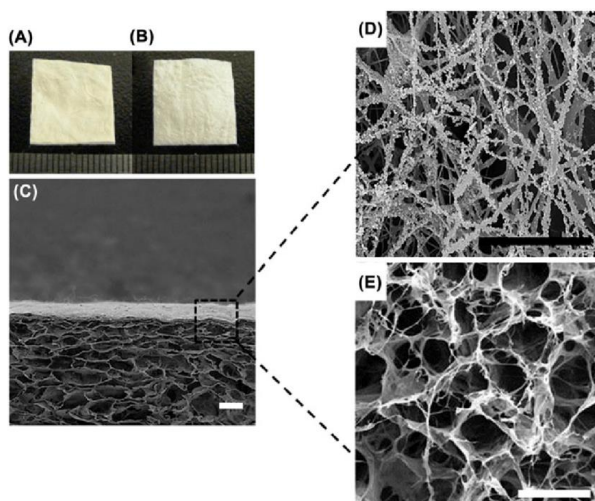
Nový spôsob boja proti bakteriálnej infekcii predstavuje chitosan, ktorý je biologicky odbúrateľný, podporuje hojenie rán a má potvrdené antibakteriálne účinky, čo ho robí vhodným kandidátom ako východiskový materiál pre kožné kryty [48]. Chitosan je lineárny polysacharid zložený z glukozamínových a N-acetylglukozamínových jednotiek spojených β -1,4 glykozidovými väzbami [49]. Pravdepodobne najdiskutovanejší mechanizmus sa týka zmeny bunkovej permeability a lýzy bunkovej membrány. Tento efekt je pravdepodobne spôsobený elektrostatickými interakciami medzi pozitívne nabitou molekulou chitosanu, ktorá má voľné kationové aminoskupiny (môžu byť protonizované) a negatívne nabitou bunkovou bakteriálnou membránou. Táto interakcia narúša normálne funkcie membrány a nakoniec vedie k smrti buniek spôsobením úniku intracelulárnych komponentov a inhibíciou transportu živín do buniek [50].



Obrázok 8: Interakcie vodíkových väzieb medzi molekulou chitosanu a PEO [51]

Na výrobu nanovláknien sa najčastejšie používa rôzny hmotnostný pomer zmiešaných roztokov chitosanu v kyseline octovej a PEO v destilovanej vode. Výsledky ukazujú, že pridanie PEO je nevyhnutný na umožnenie zvlákňiteľnosti roztoku chitosanu. Zvyšovanie množstva PEO v roztokoch malo za následok nižšiu viskozitu, zmenu reologických vlastností, lepšiu zvlákňiteľnosť roztoku a väčší priemer vláknien [52].

Na Obrázok 9 si môžeme všimnúť podobnosť v pórovitej štruktúre ECM a chitosanu, ktorá napomáha k lepšej adhézii buniek. Vrchná vrstva z chitosanu slúži ako bariéra pred penetráciu baktérií ako napr. *S. aureus* ako aj *E. coli*. Spodnú vrstvu tvorí extracelulárna matrix získaná z ľudského tukového tkaniva. Chitosanové vlákna sa získali elektrostatickým zvlákňovaním s kyselinou TFA. Na zabudovanie častíc TiO_2 na chitosanový kryt sa nanočastice sonikáciou dispergovali v destilovanej vode.

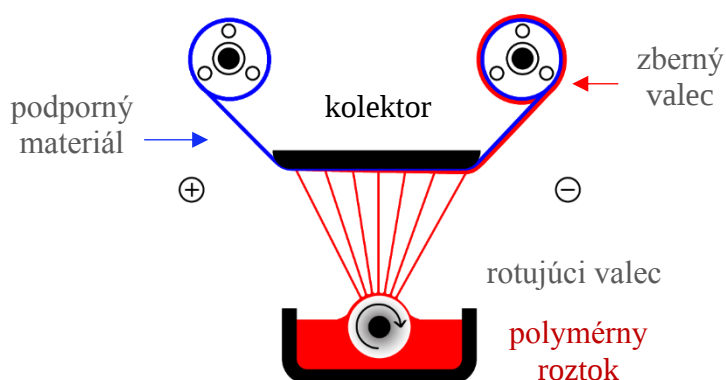


Obrázok 9: pohľad zhora na vrstvu chitosanu zabudovanú do TiO_2 , b) pohľad zdola na vrstvu ECM, c) d), e) bočný pohľad na dvojvrstvu pri mierke $200\ \mu\text{m}$. a $5\ \mu\text{m}$ [50]

3.2.4 Veľkovýroba nanovlákien

Výroba nanovlákien spoločnosťou Nafigate je založená na princípe technológie Nanospider [35]. Technológia umožňuje zvlákňovať nielen z kvapky polyméru prechádzajúceho tryskou do elektrického poľa, ale z celej tenkej vrstvy roztoku polyméru. Jednou z výhod tejto metódy je, že sa používa malé množstvo stále čerstvého roztoku, čo je predpokladom pre udržanie konštantných parametrov výstupného materiálu pri dlhodobej výrobe [53].

Princíp výroby je založený na tom, že sa polymérny roztok prenesie do vaničky, v ktorej sa otáča kovový valček pripojený na zdroj vysokého napätia (Obrázok 10). Na valčeku tak vzniká tenký film z polymérneho roztoku, z ktorého sa vďaka elektrostatickým silám vyťahujú desiatky až stovky vlákien. Medzitým sa vlákno stenčuje a rozpúšťadlo sa odparí. Nanovlákná sa ukladajú na podkladový materiál z rôznych druhov netkaných textílií alebo aj tkaniny [54], [55].

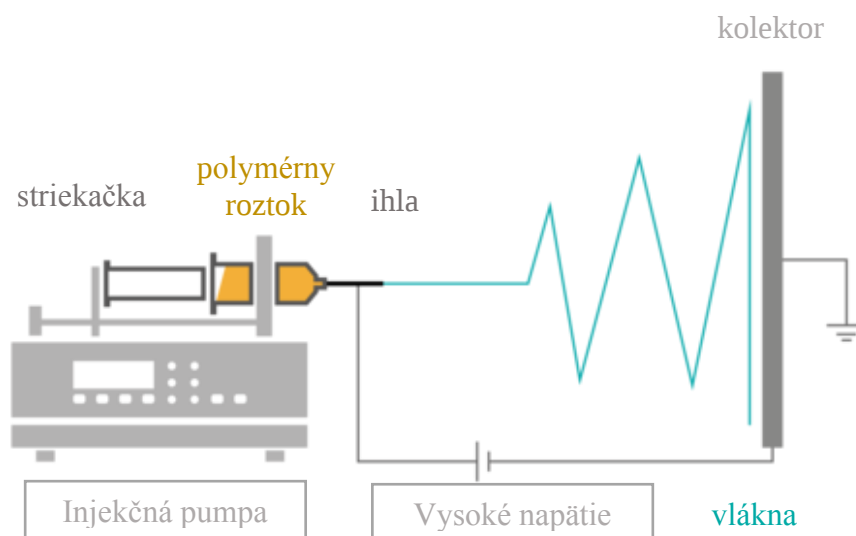


Obrázok 10: Schéma nastavenia elektrostatičného zvlákňovania Nanospider [54]

3.2.5 Príprava krytov pomocou elektrospinningu

Elektrostatičné zvlákňovanie je jednoduchá a nákladovo efektívna stratégia na výrobu nanovlákien [43]. Je to metóda na generovanie vlákien formovaním prúdu z nabitého polyméru alebo nepolymérneho systému pod elektrickým poľom (Obrázok 11) [55]. Elektrostatičné zvlákňovanie je teda jedinečný prístup využívajúci elektrostatičné sily na výrobu ultratenkých vlákien [56]. Priemer elektrostatičky zvlákňovaných vlákien sa pohybuje v rozsahu od 100 nm do 500 nm. Aparatúra používaná pre metódu elektrospinningu pozostáva z elektrického zdroja s kladnou alebo zápornou polaritou, injekčnej pumpy s kapilármi alebo hadičkami na prenášanie roztoku zo striekačky alebo pipety do zvlákňovacej trysky, a vodivého kolektora

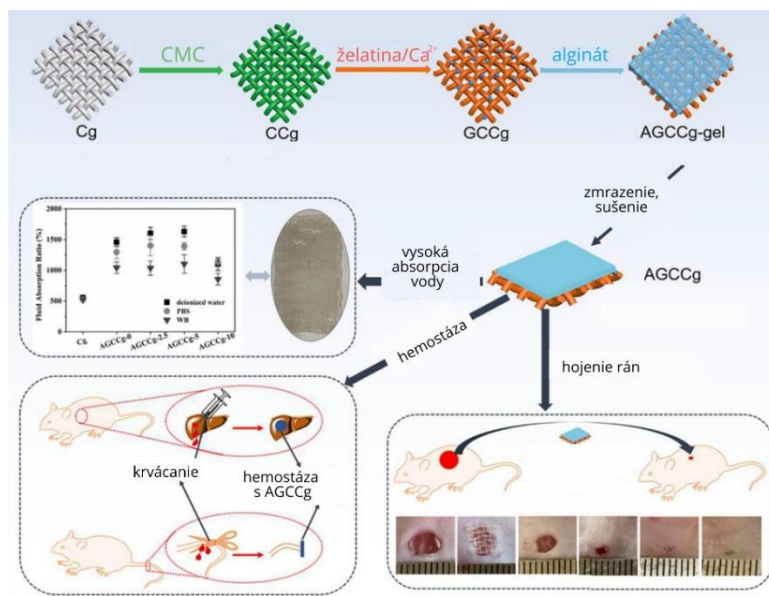
(hliník). Po zapnutí zdroja vysokého napätia roztok polyméru, ktorý sa zvlákňuje je pretlačený cez injekčnú pumpu a vytvorí kvapku polyméru na konci kapiláry. Následne dochádza ku predlžovaniu kvapky na špičke ihly do tvaru tayloroveho kužeľa. Rozpúšťadlo je potom okamžite odparené a nanovlákná sa objavia na kovovom kolektore. Pre konečnú funkciu nanovláknových produktov sú rozhodujúce vlastnosti materiálu a parametre procesu, napríklad pomer liečiva k polyméru, viskozita roztoku alebo vodivosť [43], [56], [57], [58].



Obrázok 11: Schéma zapojenia aparatury elektrospinningu [59]

3.2.5.1 Viacvrstvý kryt

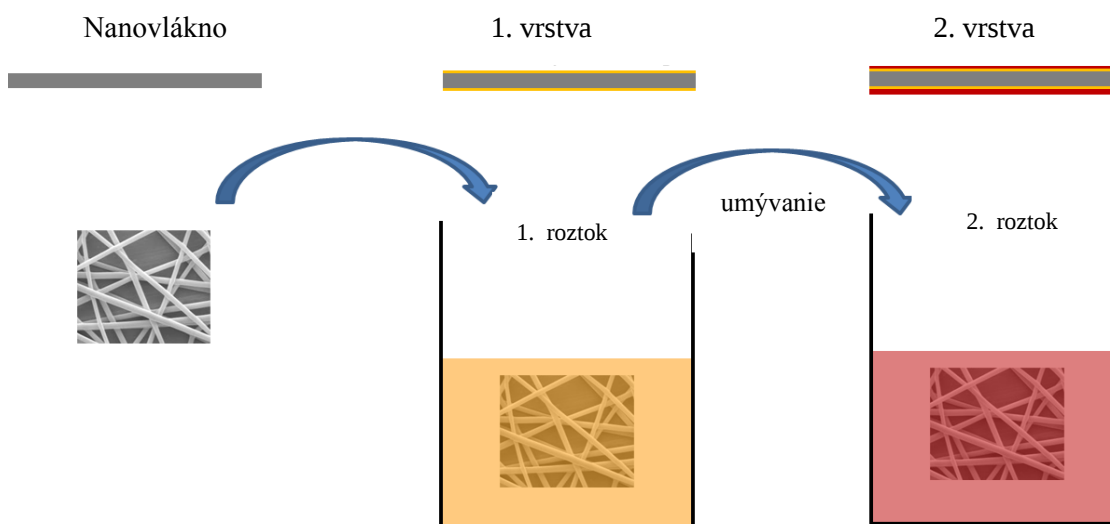
Väčšina elektrostaticky zvlákňovaných krytov z nanovláknien sú pripravené ako jednovrstvové štruktúry. Tento návrh je však menej priaznivý pre efektívne hojenie rán hlavne kvôli jeho zníženým mechanickým vlastnostiam. Na riešenie tohto problému a na simuláciu štruktúry organizovanej vrstvy pokožky bol navrhnutý viacvrstvý kryt označovaný v literatúre ako layer-by-layer (LbL). Tento dizajn umožňuje trvalé uvoľňovanie terapeutického činidla a viac sa podobá prirodzenej kožnej ECM [60]. Obrázok 12 ilustruje hemostatický materiál, ktorý je schopný rýchlo zastaviť krvácanie z rany. Je vytvorený z karboxymetylchitosanu (CMC), želatíny a alginátu na povrchu bavlnenej gázy jednoduchým procesom vrstva po vrstve (LbL).



Obrázok 12: Schematický diagram procesu prípravy kompozitného obväzu [61]

Metóda vrstvy po vrstve je založená na adhézii pozitívne a negatívne nabitých makromolekúl na povrch základného materiálu. Na vytvorenie vrstiev sa použije zavedenie protichodne nabitých molekúl.

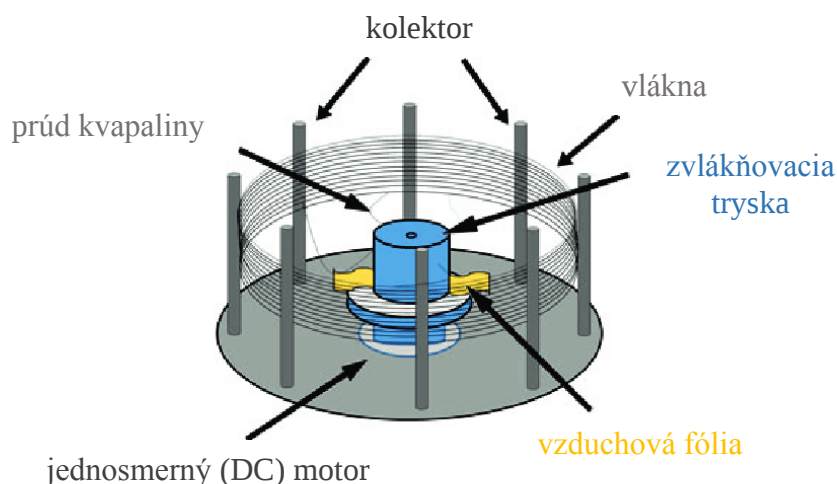
Výhodou tejto metódy je, že pridané vrstvy funkčných molekúl je možné zvoliť buď na vylepšenie jednej vlastnosti, alebo na zavedenie viacerých vlastností.



Obrázok 13: Funkcionalizácia elektrostaticky zvláknovaných vlákien úpravou vrstvy po vrstve [62]

3.2.6 Príprava krytov pomocou forcespinningu

Forcespinning je technológia, ktorá využíva odstredivú silu na výrobu nanovlákien z rôznych materiálov. Výhodou tejto techniky je, že výsledná rýchlosť výroby za jednotku času je asi stokrát vyššia, než pri procese elektrostatického zvlákňovania [63]. Základ tejto techniky tvorí valec s veľkým polomerom a zároveň malou výškou, ktorý je naplnený roztokom požadovaného materiálu, ktorý chceme zvlákňovať. V strede valca je umiestnená tyč, ktorá sa otáča (rotor). Odstredivá sila poháňa roztok do trysky a následne sa tak vlákno zachytí na kolektorových tyčiach [64].



Obrázok 14: Metóda odstredivého zvlákňovania [65]

3.3 Nové prístupy v topickej liečbe rán

Vďaka vedeckému a klinickému výskumu sú kožné kryty čoraz viac funkcionalizované a zamerané na cielenú liečbu pomocou postupne uvoľňujúcich enzýmov, analgetík, antibiotík či rastových faktorov [66]. Enzymatický debridement stále patrí medzi najdôležitejšie terapeutické prístupy k znižovaniu bakteriálnej záťaže. Enzým pôsobí na hlboké popáleniny ako aj chronické rany vysoko selektívne a rozpúšťa tak len devitalizované tkanivo [67], [11].

3.3.1 Enzýmy

Enzymatický debridement je lokálna liečba, pri ktorej sa používajú prirodzene sa vyskytujúce proteolytické enzýmy alebo proteinázy, ktoré sa aplikujú priamo na povrch rany. Enzymatická liečba nie je vhodná, ak je prítomná postupujúca nekróza. Patria sem kolagenázy, fibrinolýziny a proteolytické enzýmy ako sú trypsín, bromelain, papain,

či kombinácia streptokináza–streptodornáza a subtilizín. Bromelaín sa nanáša ako krém (35 % bromelaínu v lipidovej báze) a zvyčajne na relatívne krátke obdobia (4 hod.). Malá klinická štúdia ukázala, že bromelaín je debridement, ktorý nepoškodzuje okolité zdravé tkanivo a nemá žiadne významné nepriaznivé účinky. Prípravky s obsahom papaín–močoviny sa klinicky používajú už celé desaťročia a najmä pri dekubitoch. Dostupná literatúra ukazuje, že tieto debridementné systémy sú pri správnom použití účinné. Papaín je nešpecifická cysteínproteáza pochádzajúca z ovocia *Carica papaya* a je schopná štiepiť rôzne nekrotické tkanivové substráty [68].

3.3.1.1 Kolagenáza

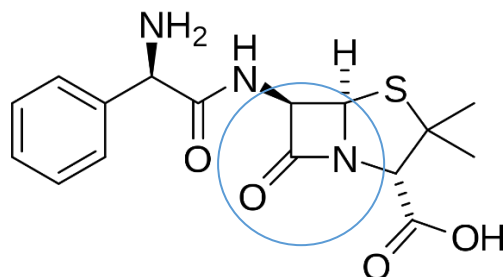
Enzým kolagenáza je účinnou a selektívnou metódou na odstránenie nekrotického tkaniva bez poškodenia granulačného tkaniva z dekubitov, vredov predkolenia a popálenín. Kolagenáza selektívne štiepi kolagén, ktorý spája devitalizované tkanivo s vitálnou spodinou rany [11], [68]. Mikrobiálna kolagenáza sa už používa ako masť aktívnej zložky (Iruzol Mono masť), kde je bezpečnou a účinnou voľbou na odstránenie kožných vredov a popálenín. Pre prípravu pokročilých bioaktívnych krytov na rany sa pomocou technológie Nanospider bez ihly pripravujú chitosanové nanovlákná ako nosiče pre mikrobiálnu kolagenázu [69].

3.3.2 Antibiotiká

Antibiotické kryty môžu účinne pôsobiť na cieľové miesta bez poškodenia hostiteľských tkanív a ideálne by mali vykazovať širokospektrálnu aktivitu. Izolované baktérie pacientov s vredom na diabetickej nohe vykazujú často rezistenciu na rôzne skupiny liekov. Najvyššiu rezistenciu voči baktériám u pacientov s diabetickým vredom je zaznamenaná na penicilíny, po ktorých nasledujú cefalosporíny. Topické kryty sú schopné vyhnúť sa nepriaznivým účinkom orálne a intravenózne podávaných antibiotík ako je nauzea, hnačky či bolesti hlavy [70].

3.3.2.1 Ampicilín

Ampicilin je polosyntetický derivát penicilínu, ktorý zaraďujeme medzi širokospektrálne beta-laktámové antibiotikum. Mechanizmus účinku je založený na tom, že inhibuje tretí a posledný stupeň syntézy bakteriálnych bunkových stien [71]. Ampicilín je stabilný proti hydrolýze rôznymi beta-laktamázami, a preto ho možno použiť pri širokej škále grampozitívnych a negatívnych baktérií [72]. Nedávna klinická štúdia sa zamerala na antibiotikum ampicilín zabudovaného do nanovláken pomocou elektrospinningu. Účinok sa hodnotili zónovou inhibíciou proti vybranému kmeňu *Streptococcus sanguinis* [73].



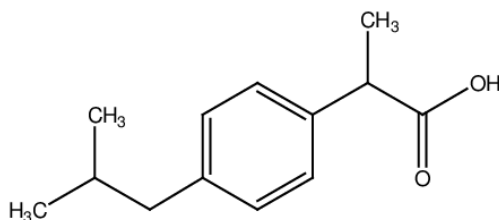
Obrázok 15: Štruktúra ampicilínu a beta-laktámový kruh [74]

3.3.3 Analgetiká

Pacienti s chronickými ranami veľmi často pociťujú bolesť a pre niektorých to býva hlavný problém narúšajúci kvalitu ich života. Dnes sa používajú rôzne lieky proti bolesti pre pacientov s chronickými ranami. Patria sem neopiooidné aj opiooidné analgetiká. Medzi neopiooidné analgetiká patria paracetamol, acetaminofén a neselektívne nesteroidné protizápalové lieky (NSAID). V klinickej štúdií 81 % pacientov v prieskume uviedlo, že pociťovali najväčšiu bolesť pri odstraňovaní obväzových krytov. Výber atraumatických krytov bol teda najbežnejšou stratégiou používanou na prevenciu bolesti. V ďalšej štúdií sa hodnotili celkovo 185 pacientov pomocou penových krytov ibuprofenu. Primárnym cieľom štúdie bola úľava od bolesti počas 7 dní, ktorá sa hodnotila denne pomocou 5 bodovej verbálnej hodnotiacej škály (bez úľavy, mierna úľava, stredná úľava, veľká úľava a úplná úľava) a vykázala významné zníženie vo všetkých škálach [66], [75].

3.3.3.1 Ibuprofén

Ibuprofén je derivát propiónovej kyseliny a zaraďujeme ho medzi nesteroidné protizápalové liečivo s analgetickým a aj antipyretickým účinkom. Mechanizmom jeho účinku je neselektívna inhibícia cyklooxygenázy, enzýmu podieľajúcom sa na syntéze prostaglandínu (mediátoru bolesti a horúčky) a inhibícia tromboxanu, enzýmu podieľajúcom sa na zrážaní krvi. Príznaky predávkovania sa vyskytujú u jedincov, ktorí skonzumovali viac ako 99 mg/kg liečiva. Hodnota LD₅₀ u ibuprofenu je stanovená je 740 mg/kg u myši [76].



Obrázok 16: Štruktúra ibuprofenu [77]

3.4 Testovanie bezpečnosti

Aby sa zabezpečila ochrana zdravia verejnosti a dodávka vysoko kvalitných, bezpečných a účinných liekov pre pacientov, musia byť všetky lieky pred uvedením na trh v EÚ schválené. Európsky systém regulácie liekov je založený na sieti približne 50 regulačných orgánov z 31 štátov EHP (28 členských štátov EÚ a Island, Lichtenštajnsko a Nórsko), Európskej komisie a agentúry EMA. Štúdie pri testovaní bezpečnosti sa delia na tri smery: skúmanie farmakodynamických účinkov a teda mechanizmus účinku liečiva, („čo robí liečivo s organizmom), potom skúmanie farmakokinetických účinkov a teda ako sa liečivo v tele po absorpcii distribuuje a eliminuje („čo robí organizmus s liečivom“). Potom sú to toxikologické vyšetrenia na zabezpečenie toho, aby látka nepredstavovala potenciálne riziko [78], [79].

3.4.1 Predklinické štúdie

Je to proces, vďaka ktorému sa vyselektuje molekula, ktorá je vhodná pre ďalší výskum. Pre získanie informácie o terapeutickom účinku sa využívajú animálne modely s daným humánnym ochorením, izolované orgány ako aj bunkové suspenzie, nádorové bunky, aby sme získali dostatočné množstvo informácií o bezpečnosti danej látky predtým ako sa použije v klinickej štúdií [80]. Pre vykonávanie humánnejšieho výskumu na zvieratách sa zaviedli pravidlá 3R (replacement, reduction, refinement), ktoré sú zakotvené vo vnútroštátnych a medzinárodných právnych predpisoch a predpisoch o používaní zvierat vo vedeckých postupoch. Uplatňuje sa zásada nahradenia zvierat, kedy je potrebné zdôvodniť, prečo sa nemôže použiť počítačový model pre sledovanie parametrov z hľadiska fyziológie človeka. Potom je to redukcia počtu zvierat, a teda objasnenie toho, že sa použil minimálny možný počet jedincov. Tiež je potrebné vysvetliť spôsob ako sa minimalizuje stres, utrpenie a bolesť jedincov počas vykonávania vedeckého experimentu [80], [81].

3.4.2 Klinické štúdie

Klinické skúšanie lieku (Clinical trial) prebieha na základe prísnych pravidiel, podľa tzv. protokolu. Pri skúšaní nového produktu alebo prístupu nie je zvyčajne známe, či bude užitočný, škodlivý alebo sa nelíši od dostupných alternatív. Pre potvrdenie účinnosti a bezpečnosti lieku ako aj pre poznanie jeho prínosu a rizík pri liečbe, či prevencii je nevyhnutné testovanie bezpečnosti klinickým výskumom, ktorého sa zúčastňujú zdraví dobrovoľníci ale aj chorí pacienti. Dobrovoľníka väčšinou osloví lekár a ponúkne mu účasť v takomto klinickom hodnotení. Centrá, ktoré vykonávajú bioekvivalenčné štúdie sú zamerané na zdravých dobrovoľníkov. Tieto štúdie sa používajú u generických prípravkov na preukázanie

zhodných vlastností s originálnym liekom. Štátny ústav pre kontrolu liečiv (ŠÚKL) pravidelne zverejňuje Národnú databázu údajov z klinických skúšaní a tieto údaje sú súčasťou databázy Európske únie ako EudraCT [82].

3.5 Práca s bunkovými kultúrami

Bunkovou kultúrou sa rozumie udržiavanie alebo rast jednotlivých eukaryotických buniek *in vitro*. Bunkové kultúry sú vynikajúcim modelovým systémom, ktorý sa využíva pri vývoji liekov a vo veľkej výrobe biologických zlúčenín (napr. vakcín, terapeutických proteínov). Podmienky kultivácie sa líšia podľa typu bunky, v kultivačnej nádobe sa vždy nachádza substrát alebo médium, ktoré dodáva základné živiny (aminokyseliny, sacharidy, vitamíny, minerály), rastové faktory, hormóny a plyny (O₂, CO₂) a reguluje fyziologické prostredie (pH, osmotický tlak, teplota). Bunky sa delia podľa toho, či sa ukotvujú k nejakému pevnému povrchu (adherentná alebo jednovrstvová kultúra), alebo sú rozptýlené v kultivačnom médiu (suspenná kultúra) [83].

Zdrojom buniek pre založenie kultúry je laboratórne zviera alebo človek [84]. Medzi zásadné výhody využitia bunkových kultúr patrí to, že priebeh celého experimentu je na jednom a dobre charakterizovanom bunkovom type, v krátkom časovom úseku je možné získať pomerne veľké množstvo homogénneho materiálu a poškodenie alebo zničenie kultúry neprináša etické problémy ako pri práci so zvieratmi. Hybridomové kultúry majú nezastupiteľné postavenie pri výrobe monoklonálnych protilátok. Na druhú stranu kultivované bunky rastú pri nefyziologických podmienkach, v umelom kultivačnom médiu a jeho zloženie nie je úplne totožné ako vnútorné prostredie živého organizmu. Medzi ďalšie limitujúce faktory zaraďujeme aj to, že tu chýba prítomnosť iných bunkových typov, s ktorými by *in vivo* komunikovali a vymieňali si medzi sebou informácie a najrôznejšie látky. Chýbajú ale aj súčasti ECM, ktorých prítomnosť či neprítomnosť môže mať na vlastnosti buniek vplyv. Pri experimentoch s kultivovanými bunkami musíme mať na pamäti, že pracujeme s modelom *in vitro*, ktorý môže a nemusí dobre odrážať pomery za podmienok *in vivo* [85].

3.5.1 Charakteristika bunkových kultúr

Podľa morfológie rozdeľujeme bunkové kultúry do troch kategórií. Bunková línia fibroblastoidného tvaru má bunky podlhovastého tvaru a rastú pripevnené k podkladu, lymfoblastoidné majú guľovitý tvar a rastú v suspenzii bez pripevnenia ku povrchu. Epitelilálne bunky majú pravidelnejší sploštený tvar a rastú pripevnené ku substrátu.

3.5.1.1 Keratinocyty

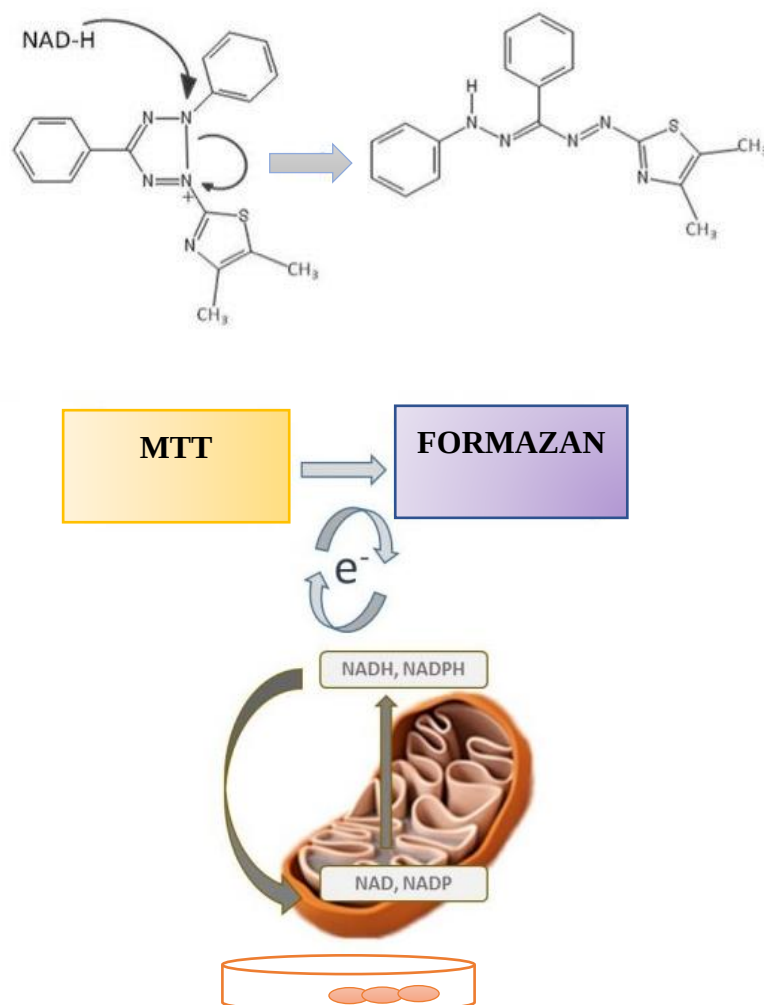
Keratinocyty regulujú aktivitu fibroblastov, sú dôležitou súčasťou hojenia rán. Epidermálna homeostáza si vyžaduje rovnováhu medzi rastom a diferenciáciou keratinocytov. Táto rovnováha musí byť výrazne posunutá v smere proliferácie, okrem toho majú epidermálne keratinocyty dôležité funkcie ako regulátory kožnej imunity a zápalu [86]. Pri narušení bariéry uvoľňujú keratinocyty interleukín 1 (IL-1), ktorý funguje ako autokrinný aj parakrinný signál, ktorý aktivuje a zvyšuje migráciu a proliferáciu keratinocytov, ako aj mobilizuje okolité bunky na pomoc pri hojení. Keratinocyty tiež vylučujú angiogénne rastové faktory, ako je vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF), krvné doštičky, odvodený rastový faktor (PDGF), ktorý indukuje migráciu endotelových buniek a angiogézu v lôžku rany [87].

3.5.2 Základné vybavenie

Aseptické techniky zabezpečujú, aby sa do bunkovej kultúry nedostali žiadne mikroorganizmy [88]. Pokiaľ je to možné, mala by byť k dispozícii samostatná miestnosť pre prácu s čistou bunkovou kultúrou. Všetky pracovné povrchy sa musia udržiavať čisté dezinfekčným prostriedkom (70% etanol). Inkubačná teplota závisí od typu kultivovaných buniek, pohybuje sa v rozmedzí 30 až 40 °C. Koncentrácia CO₂ sa udržiava v rovnováhe s hydrogenuhličitanom sodným v médiu. Činidlá sa môžu skladovať pri teplote -20 °C, ale ak sa majú bunky konzervovať, môže byť potrebné mať k dispozícii tekutý dusík alebo mrazničku nastavenú na teplotu -70 °C. K základnému vybaveniu laboratória možno tiež zaradiť sterilný laminárny box a inkubátor s riadenou atmosférou (vyšší parciálny tlak CO₂, vysoká relatívna vlhkosť). Okolitý vzduch je nasávaný pomocou radiálnych ventilátorov a pretláčaný cez filter a usmerňovač toku. Toto generuje laminárne prúdenie, to znamená, že vzduch prúdi dole v rovnobežných líniách [89].

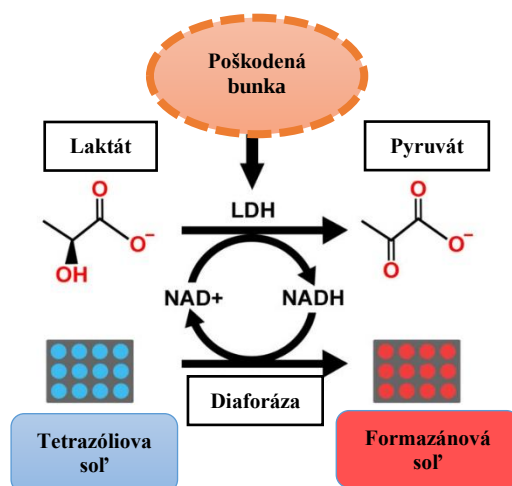
3.5.3 Testy preukazujúce viabilitu buniek

Tu patria hlavne testy s tetrazoliovými soľami, testy uvoľňovania enzýmov a to vrátane luminiscenčných metód (fluorescenčný test Alamar blue, bioluminiscencia v reálnom čase). Metóda MTT je jednou z najbežnejšie používaných metód na analýzu bunkovej proliferácie a životaschopnosti [90], [91]. Reakcia prebieha v mitochondriálnej membráne vplyvom mitochondriálnych dehydrogenáz živých buniek. Testy s tetrazoliovými soľami sa vykonávajú v troch fázach. V prvej fáze sú živé bunky vystavené určitému množstvu toxickej látky. V druhom kroku sa oddelí toxická látka a pridá sa tetrazoliová zlúčenina a zmes sa inkubuje po dobu 1 až 4 dní. V posledných fázach sa zmenou farby pomocou spektrofotometrických metód stanoví počet živých alebo mŕtvych buniek.



Obrázok 17: Redukcia žltého tetrazoliového farbiva MTT na jeho nerozpustný fialový formazan [92,93]

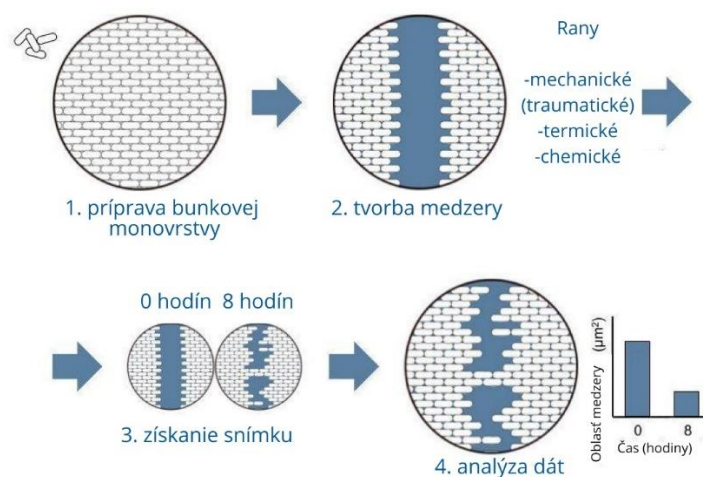
Ďalšou metóda, ktorá analyzuje životaschopnosť buniek, je stanovenie aktivity laktátdehydrogenázy (LDH) uvoľnenej z poškodených buniek do média. Je to cytoplazmatický enzým, ktorý sa nachádza vo všetkých bunkách. Keď sú bunky vystavené toxickým účinkom, je narušená integrita ich cytoplazmatickej membrány a LDH enzým uniká z buniek a prechádza do média [90]. Reakcia zahŕňa premenu laktátu na pyruvát pomocou LDH a zároveň redukciu NAD^+ (niktoinamid adenín dinukleotidu). Diaforáza v prítomnosti NADH redukuje tetrazóliovu soľ a vytvára sa tak červené sfarbenie formazánu. Jeho množstvo je potom úmerné LDH uvoľnenej do média a teda množstvu poškodených buniek. Testuje sa väčšinou na 96-jamkových mikrotitračných doštičkách pri $A = 540 \text{ nm}$.



Obrázok 18: Schéma kvantitatívneho stanovenia laktátdehydrogenázy [94]

3.5.4 Test hojenia rán

Test poškriabania (Scratch test) je ľahká, lacná a dobre vyvinutá metóda na meranie migrácie buniek *in vitro*. Na spojovacej bunkovej monovrstve sa vytvorí umelá medzera a pohyb sa sleduje mikroskopickými zobrazovacími metódami. Medzi základné kroky patrí vytvorenie „škrabanca“ v bunkovej monovrstve, zachytenie snímok na začiatku a v pravidelných intervaloch počas migrácie buniek, a porovnanie snímku s cieľom kvantifikovať rýchlosť migrácie buniek. V porovnaní s inými metódami je tento *in vitro* test vhodný najmä na štúdium interakcií migrácie buniek počas hojenia rany *in vivo* [95], [96], [97].



Obrázok 19: Zjednodušená schéma testu hojenia rán [98]

4. CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo pripraviť a charakterizovať rôzne typy krytov rán a overiť ich bezpečnosť na ľudských kožných bunkách.

V rámci práce tak boli riešené nasledujúce čiastkové ciele:

- 1) Spracovanie rešerše na danú tému
- 2) Príprava rôznych kožných krytov rán
- 3) Charakterizácia pripravených krytov
- 4) Testovanie interakcie pripravených krytov s humánnymi bunkami
- 5) Vyhodnotenie výsledkov a diskusie

5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Použité prístroje a chemikálie

- Analytické váhy, Boeco (Nemecko)
- Automatické pipety rôzneho objemu – Discovery (DE) a Biohit (Nemecko)
- ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (DE)
- Epoch, Spektrofotometer, BioTek Instruments, Inc (USA)
- Inkubátor CO₂, ESCO Memmer ICO 105med 56 litrov, 230/115 V, 50/60 Hz (Nemecko)
- Inverzný biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv (Česká republika)
- Magnetická miešačka s ohrevom, Lavat – Verkon (Česká republika)
- Predvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Nemecko)

5.1.1 Chemikálie použité na prípravu krytov

- Ampicilin, Sigma-Aldrich (Anglicko)
- Alginát sodný, Sigma-Aldrich (Anglicko)
- Chitosan, Sigma-Aldrich (Anglicko)
- Kyselina octová, Lach-Ner (Česká republika)
- Kolagenáza z *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich (Anglicko)
- Želatína, Penta (Česko)

5.1.2 Chemikálie použité pri kultivácii humánnych buniek a MTT testoch

- DMEM High glucose medium, Biosera, w/stable glutamine, w/o sodium pyruvate, w/25 mM Hepes, BioTech a.s (Česká republika)
- MTT, Duchefa Biochemie (Holandsko)
- Trypsín, Versene EDTA, P-Lab (Česká republika)
- Antibiotic-Antimycotic 100X (Biosera), Biotech (Nemecko)

5.1.3 Použité mikroorganizmy

Mikroorganizmy, ktoré sa použili pri testovaní antimikrobiálnej aktivity inkorporovaných látok pochádzajú z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne:

- *Escherichia coli* CCM 7395
- *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418
- *Candida glabrata* CCM 8270

5.1.4 Použité humánne bunky

Pri stanovení cytotoxicity boli použité humánne bunky HaCaT (Human keratinocytes cell line), zo zbierky bunkových kultúr Cell Lines Service, Eppelheim (Nemecko).

5.1.5 Vybrané aktívne zložky krytov

Aktívne zložky krytov, ktoré sa pridali do nanovlákných krytov, boli zvolené na základe výsledkov diplomovej práce Ing. Lucie Dzurickej [99], na ktorú táto práca nadväzuje.

5.2 Optimalizácia prípravy rôznych nanovlákných krytov

5.2.1 Optimalizácia prípravy chitosanových krytov

Kolektor bol na začiatku experimentu dôkladne vyčistený etanolom a destilovanou vodou. Pri optimalizácii prípravy sa použili koncentrácie v rozmedzí 0,5 až 5 % roztoku chitosanu. Ako rozpúšťadlo sa zvolilo kyselina octová v rozmedzí 50 až 90 %. Aby sa získal homogénny roztok, bola zmes pred elektrospínavaním po dobu 24 hodín jemne miešaná na magnetickej miešačke. Roztok chitosanu sa udržiaval pri pH= 5. Použila sa injekčná ihla s priemerom 0,8 mm, ktorá bola upravená tak, že sa skosil jej hrot na 2,5 cm. Naplnená striekačka s ihlou sa umiestnila do pumpy. Na hrot ihly a na kolektor boli pripevnené elektródy zdroja vysokého napätia, ich vzdialenosť sa upravila na 10 cm a prietok sa nastavil na 0,1 ml/hod. Ako posledné sa zapojil zdroj vysokého napätia na hodnotu 15,2 kV. Tento spôsob prípravy sa však ukázal ako neefektívny, preto sa pripravili kombinované vlákna so želatinou.

5.2.2 Optimalizácia prípravy alginátových krytov

PEG a alginát sodný boli rozpustené v destilovanej vode pri laboratórnej teplote. Aby sa získal homogénny roztok, bola zmes pred elektrospínavaním po dobu 24 hodín jemne miešaná na magnetickej miešačke s ohrevom pri teplote 37 °C. Pripravili sa rôzne koncentrácie (0,5, 1, 2 a 5%) roztokov s 50% kyselinou octovou a potom aj roztoky v pomere NaAlg/PEG 1:1. Pri udržiavaní prietoku 0,4 ml /hod, aplikovaného napätia 15 kV a vzdialenosti 12 cm boli viditeľné len veľmi jemné vlákna. Preto sa zvolil ďalší postup, kde sa pripravil roztok, ktorý obsahoval 25 mg alginátu, 25 mg PEG, 20 µl Triton X-100 v 2 ml destilovanej vody. Čas zvlákňovania sa určil na 10 až 12 hodín. Ani tento spôsob zvlákňovania sa neosvedčil a nebol vhodný pre ďalšie testovanie.

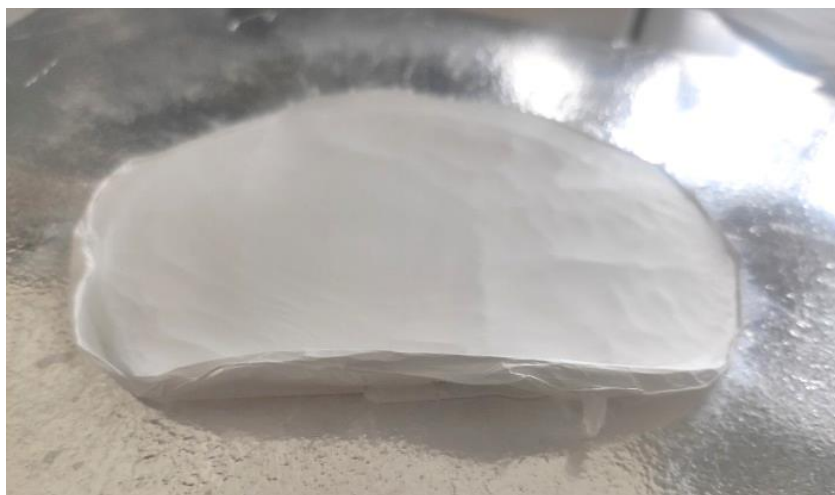
5.2.3 Optimalizácia prípravy želatinových krytov

5.2.4 Želatinové vlákna

Proces zvlákňovania sa uskutočňoval pri teplote 22 °C a napätí 15 kV. Vlákna sa zhromaždili na uzemnenej hliníkovej fólii vo vzdialenosti 10 cm od hrotu injekčnej ihly s priemer 1,3 mm. Konštantný objemový prietok 0,6 ml/hod sa udržiaval pomocou injekčnej pumpy. Pri priemere ihly 0,8 mm sa prietok zvýšil na 0,8 ml/hod a jej hrot bol skosený na 1,4 cm. Použili sa rôzne koncentrácie, kým sa optimalizoval postup prípravy. Ako najvhodnejšia sa zvolila 30 % koncentrácia želatiny v 50 % kys. octovej. Roztoky sa miešali vo vodnej lázni a pri teplote 30 °C. Čas zvlákňovania sa stanovil na 4,5 hodiny.



Obrázok 20: Elektrostatické zvlákňovanie želatiny (3 g/10 ml 50% AA)



Obrázok 21: Želatinový kryt po optimalizácii prípravy

5.3 Optimalizácia viacrstvových želatinových krytov

Ďalej boli pripravené kryty, ktoré obsahovali dve vonkajšie vrstvy želatiny bez aktívnej látky a vnútornú vrstvu s aktívnou látkou, tak aby sme dosiahli postupné uvoľňovanie terapeutika v nehojacej s rane.

5.3.1 Želatinovo-alginátové kryty

Hodnotila príprava želatinových vlákien v kombinácii s alginátom, kde tieto biopolyméry tvorili 3 až 33% z hmotností želatiny. Pri koncentrácii 20 % NaAlg, boli vlákna po odstránení z kolektora deformované ale dostatočne pevné.



Obrázok 23: Alginátovo-želatinový kryt, kde alginát tvoril 10 % z celkového množstva želatiny

5.3.2 Želatinovo-chitosanové kryty

Najprv sa optimalizovali kryty, kde tvoril chitosan 3 až 33 % z hmotností želatiny. Následne sa overil ďalší spôsob prípravy a to tak, že sa osobitne pripravili zásobné roztoky 5 % chitosanu v 50 % AA a 30 % želatiny v rovnakom rozpúšťadle a na zvlákňovanie sa pripravil ich pomer 1:1. Prietok bol upravený na 0,2 ml/hod, vzdialenosť ihly od kolektora sa nastavila na 13 cm a napätie sa udržiavalo pri 15,3 kV. Po 5 hodinách boli kryty odstránené z kolektora, no vlákna neboli dostatočne súdržné a pevné. Predpokladáme, že nedochádzalo iba ku zvlákňovaniu ale aj rozprašovaniu biopolyméru (Obrázok 24).



Obrázok 24: Želatinovo-chitosanový kryt v pomere 1:1 s ampicilínom

5.4 Charakterizácia kožných krytov

U pripravených nanovlákných krytov bola stanovená krátkodobá a dlhodobá stabilita v modelovom prostredí. Antimikrobiálna aktivita bola overená na 96-jamkové mikrotitračnej doštičke a to na spomínaných mikroorganizmoch *E. coli* a *S. epidermidis*. Testovali sa koncentračné rady aktívnych látok. Uvoľňovanie aktívnych látok sa stanovilo spektrofotometricky. Morfologické zmeny a štruktúra vlákien sa sledovali pomocou svetelného mikroskopu.

5.4.1 Dilučný test

Antimikrobiálne účinky sa zisťovali na gram-pozitívnej baktérii *Staphylococcus epidermidis*, gram-negatívnej bakterií *Escherichia coli* a na kvasinke *Candida glabrata*. Do 96-jamkové mikrotitračnej doštičky sme napipetovali 150 μ l čerstvo inokulovaných kultúr a pridali 50 μ l roztoku s danou aktívnou látkou. Kultivácia prebiehala na temperovanej trepačke 24 hodín pri teplote 37 °C. Pripravené mikrotitračné doštičky obsahovali rozmedzie koncentrácií aktívnych látok a boli premerané na ELISA readeru, ktorý vyhodnotil absorbanciu v jednotlivých jamkách pri 630 nm. Ako blank sa do jamky pridalo 150 μ l čerstvo inokulovaných buniek a 50 μ l rozpúšťadla použitého k príprave vzoriek. Blank je nutný pre sledovanie rastu daného mikroorganizmu.

5.4.1.1 Príprava živného média

Tekuté živné médium bolo vytvorené zmiešaním príslušného množstva práškoveho média a 100 ml destilovanej vody. Zmes bola rozdelená do Erlenmayerových baniek, ktoré sa sterilizovali v tlakovom hrnci po dobu 30 minút pri teplote 100 °C.

Tabuľka 2: Použité médium pre kultiváciu mikroorganizmov

Mikroorganizmus	Médium
<i>Escherichia coli</i>	LB (Lysogeny broth/ Luria-Bertani)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI medium (Brain heart infusion)
<i>Candida glabrata</i>	YPD (Yeast pepton dextrose médium)

5.4.1.2 Kultivácia mikroorganizmov

Do 50 ml sterilného média sa sterom zaočkovala kultúra z pevného média pomocou kľučky. Následne boli mikroorganizmy kultivované v inkubačnom boxe s trepaním pri teplote 37 °C. Kultivácia prebiehala 24 hodín na temperovanej trepačke, potom boli mikroorganizmy preočkované a kultúra sa nariedila na absorbanciu $A = 0,1$.

5.4.2 Spektrofotometrické stanovenie

Absorpčné maximum každej zlúčeniny sa zistilo v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 900 nm. Zvolené vlnové dĺžky a rozsah koncentrácií použitých na zhotovenie kalibračnej krivky sú uvedené v *tabuľke 3*. Na stanovenie sa použil štvorec krytu o veľkosti 1 cm² obsahujúci ampicilín, kolagenázu a ibuprofén a ten sa následne umiestnil do 2 ml fyziologického roztoku (0,9g/100 ml NaCl) na temperovanú trepačku pri teplote 37 °C. Množstvo uvoľnenej účinnej látky sa sledovalo v časových intervaloch 0, 30, 60 minút, 2, 5, 10, 24 hodín a 2, 4, 7 dní.

Tabuľka 3: Rozsah koncentrácií použitých na stanovenie kalibračnej krivky

Aktívna látka	λ [nm]	c [mg/ml]
Ampicilín	260	1,0 – 0,2
Ibuprofén	265	0,8 – 0,1
Kolagenáza	259	0,6 – 0,1

5.4.3 Morfologické zmeny krytu v modelovom prostredí

Pripravený kryt o veľkosti 1 cm² bol umiestnený do petriho misky a preliaty 100 μ l modelového prostredia. V jednotlivých časových intervaloch sa hodnotila zmena hmotnosti na analytických váhach a vizuálne súdržnosť krytu. Časový interval bol zvolený na 0, 2, 5 a 24 hod.

5.5 Kultivácia kožných buniek

V práci boli použité kultivačné nádoby s HaCaT (z angl. Human keratinocyte cell line) – lúnia ľudských keratinocytov (26. pasáž) a štandardné rastové médium obohatené o glukózu a glutamín. Médium neobsahoval pyruvát, a to z toho dôvodu, že sa plánoval aj LDH test, kde by vychádzal falošne pozitívny výsledok. Tiež bola pridaná zmes antibiotika (výsledná koncentrácia 1 %) a 10 % FBS – Fetálne hovädzie sérum (z angl. Fetal bovine serum). Kultivácia prebiehala v inkubačnom boxe pri 37°C a 95 % vlhkej atmosfére s 5% obsahom CO₂ vo vzduchu. Médium bolo pred použitím uchované v chladničke pri teplote 4 °C. Roztoky, ktoré sa vytiahli z chladničky ako médium, PBS alebo trypsín sa umiestnili do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C. Kontrola konfluencie, kontaminácie a príľnavosti ku dnu kultivačnej nádoby prebiehala pod inverzným mikroskopom každý deň alebo obdeň, aby sa zvolil ďalší postup ako výmena média, pasážovanie alebo MTT test.



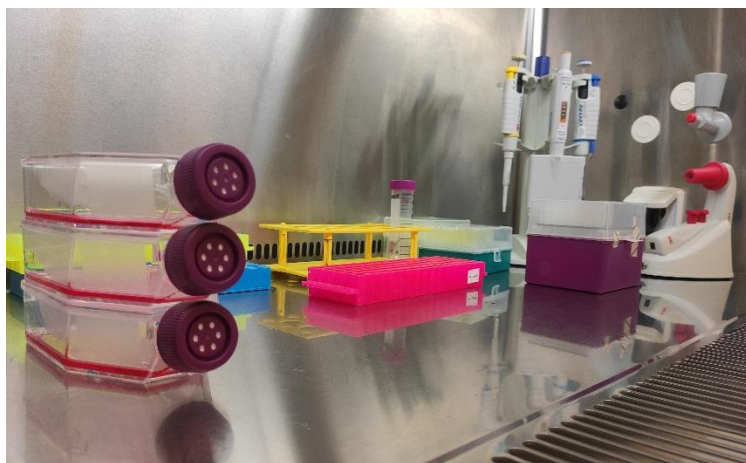
Obrázok 25: Inkubátor Memmert s CO₂ atmosférou typ ICO150med

5.5.1 Výmena média

Výmena média je nutná raz za dva dni alebo keď pozorujeme farebnú zmenu z červenej na oranžovú. Pri výmene média nie je potrebné nádobu preplachovať pufrom. Z kultivačnej nádoby sa opatrne vyleje staré médium a napipetuje nové. V prípade veľkých kultivačných nádob sa napipetovalo 15 ml média, do malých 5 ml média.

5.5.2 Pasážovanie

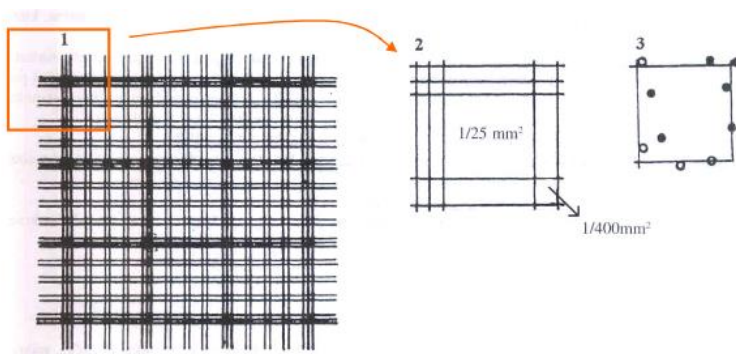
Pasážovanie buniek znamená, že časť buniek sa odoberie a zmieša s novým médiom. Nariedená suspenzia buniek sa tak prepipetuje do novej kultivačnej nádoby, pretože sa po určitom čase živiny z média vyčerpali a exponenciálne stúpol počet buniek. Pri pravidelnej kontrole buniek sa vždy kontrolovala aj konfluencia buniek, čo je miera zaplnenia vrstvy buniek na dne kultivačnej nádoby. Ak bola konfluencia vyššia ako 80 %, previedli sa bunky zo starej kultivačnej nádoby do dvoch nových. Ako prvé sa z kultivačnej nádoby vylialo médium a 3krát premylo PBS na prepláchnutie vápenatých iónov, na 4krát sa pufoval a napipetovalo sa 1 ml trypsínu do veľkej nádoby, kde sa nechal inkubovať 10 minút. Bunková membrána obsahuje veľké množstvo proteínov a proteolytický enzým trypsin môže tieto proteíny poškodiť a ovplyvniť tak celkový stav buniek. Ďalej sa zabezpečilo odlepenie buniek od dna nádoby a to buď pomocou úderov na steny nádob alebo použitím sterilnej škrabky. Potom sa napipetovalo 5 ml PBS pufru a celý obsah bol scentrifugovaný pri otáčkach 320–360 rcf po dobu 5 minút. Supernatant sa zliat a peletka buniek sa rozsuspenderovala v 5 ml DMEM, médium sa doplnilo na potrebný objem a rozdelilo do nových kultivačných nádob. Na záver sme bunkové kultúry skontrolovali pod mikroskopom.



Obrázok 26: Kultivačné nádoby s čerstvým médiom

5.5.3 Počítanie buniek

Pre stanovenie počtu buniek vo vzorke sa využívajú priame a nepriame metódy. Medzi nepriame metódy patrí metódy kultivačné. Medzi priame metódy patrí stanovenie počtu buniek pomocou mikroskopu, počítanie samotných buniek v preparáte zo vzorky, bez kultivácie. Výhodou je rýchlosť a stanovenie počtu ako živých tak mŕtvych buniek alebo ich pomer.



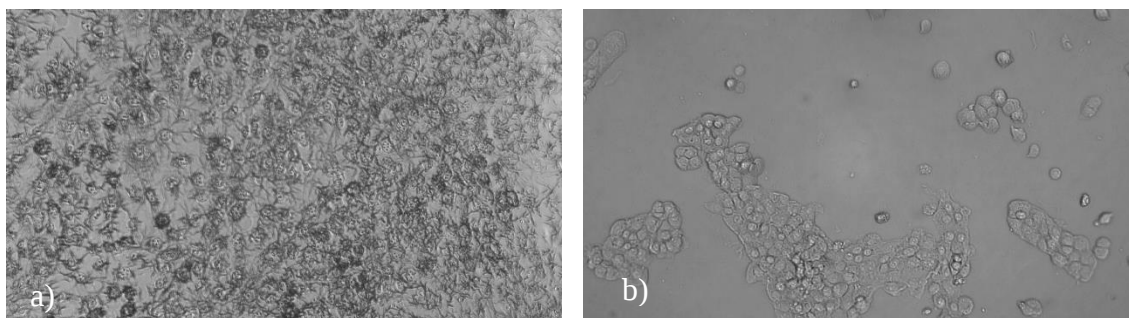
Obrázok 27: Bürkerova komôrka [100]

Bunková suspenzia sa pred meraním zmieša s farbivom trypanová modrá a ten difunduje cez plazmatickú membránu do intracelulárneho priestoru, toto farbivo však živá bunka aktívne transportuje von z intracelulárneho priestoru cez bunkovú membránu. Väčšinou je postačujúce stanoviť bunky odhadom v zornom poli mikroskopu. Medzi najčastejšie využívané metódy patrí cytometrická Bürkerova komôrka, ide o špeciálne upravené podložné sklíčko, ktoré obsahuje dve mriežky rozdelené na 9 štvorcových polí o dĺžke 1 mm. Pomocou výpočtu vieme stanoviť počet buniek v 1 ml analyzovaných buniek. Bunky počítame vnútri štvorcov a tie čo sa dotýkajú hornej a ľavej strany štvorca. Bunky dotýkajúce sa pravej a spodnej strany a bunky mimo štvorcov do výpočtu nezahrnieme. Postup práce je zhodný s pasážovaním buniek až po centrifugáciu. Po nej je potrebné zliať PBS a peletu rozsuspendovať v 5 ml médiu. Do epiniek

sa napipetuje 100 μ l farbiva trypanová modrá a 100 μ l. suspenzie buniek. V pomere 1:1 sa roztok dôkladne rozsuspenderuje a pipetou premiestni pod sklíčko na Bürkerovej komôrke.

5.5.4 MTT test

Ľudské keratinocyty sa previedli do centrifugačnej skúmavky pomocou PBS pufru a trypsínu a zcentrifugovali sa (5 minút, 360 rcf). Táto doštička je tvorená ôsmimi radmi od A po H a dvanástimi stĺpcami. Analyzovali sa vzorky ampiclínu (4 mg/ml), ibuprofénu (3 mg/ml) a kolagenázy (3 mg/ml) na troch 96-jamkových doštičkách. Bunkovú kultúru je potrebné neriediť čerstvým médiom na koncentráciu $2 \cdot 10^4$ buniek/100 μ l v jednej jamke. Počítanie buniek sa uskutočnilo pomocou Bürkerovej komôrky (Obrázok 27). Takto pripravená suspenzia buniek bola po 100 μ l rozpipetovaná na doštičku a kultivovala sa 24 hodín v termostate. Do krajných jamiek sa napipetoval pufr (PBS) aby sa zamedzilo prípadnému vysychaniu. Pripravené vzorky sa prefiltrovali do mikroskúmavky pomocou striekačkového filtra 25 mm. Dôkladne sme odpipetovali médium a napipetovali vzorky a kontroly (CC,VC,PC) po 100 μ l. Inkubovali sme 24 hodín a následne pipetovali vzorky.



Obrázok 28: a) kryštáliky formazanu, b) mŕtve bunky po pridaní etanolu pri celkovom zväčšení 400x

Do každej jamky sa napipetovalo 20 μ l MTT v koncentrácii 2,5 mg/ml PBS. Na 3 hodiny sa vložili doštičky inkubátoru pri teplote 37 °C. Pridalo sa 100 μ l 10 % roztoku SDS v PBS (1 g SDS/10 ml PBS). Výsledná cytotoxicita sa zistila spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 540 nm a 562 nm pomocou ELISA readeru po 48 hodinách. Vzorky boli ponechané v tme pri laboratórnej teplote. Hodnota absorbancie roztoku zodpovedá množstvu živých buniek, čím tmavšia farba a teda vyššia absorbanca, tým vyššie percento živej bunkovej kultúry.

Tabuľka 4: Schéma pipetovania aktívnych látok na mikrodostičku

PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	CC	1 %	4 %	10 %	16 %	24 %	28 %	32 %	Vc	Vc	PBS
PBS	CC	1 %	4 %	10 %	16 %	24 %	28 %	32 %	Vc	Vc	PBS
PBS	CC	1 %	4 %	10 %	16 %	24 %	28 %	32 %	Vc	Vc	PBS
PBS	CC	2 %	6 %	12 %	20 %	26 %	30 %	34 %	Vc	PC	PBS
PBS	CC	2 %	6 %	12 %	20 %	26 %	30 %	35 %	Vc	PC	PBS
PBS	CC	2 %	6 %	12 %	20 %	26 %	30 %	34 %	Vc	PC	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

5.5.5 LDH test

Pre stanovenie LDH testu sa využili supernatanty z MTT testovania na 96-jamkových mikrotitračných doštičkách. Ako prvé boli pripravené štandardy v šiestich mikroskúmavkách typu eppendorf v pomere, ktoré sú uvedené v *Tabuľka 5*. Následne sme k 10 µl bunkových supernatantov pridali 50 µl roztoku NADH v pyruváte, ktorý vznikol rozpustením NADH do 0,75 mM roztoku pyruvátu sodného s koncentráciou 1mg/ml. Vzorky sa nechali inkubovať pri 37 °C po dobu 30 minút. Pomocou viacnásobovej manuálnej pipety sa pridalo 50 µl 2,4-dinitrofenylhydrazinu v koncentracii 20 mg/100 ml 1M kyseliny chlorovodíkovej. Doštičky sme preniesli do tmy na 20 minút. Prebiehajúca reakcia sa zastavila pridaním 50 µl 4M hydroxidu sodného. Po 5 minútach, kedy boli opäť vzorky ponechané tme a určila sa absorbancia pri vlnových dĺžkach 450 a 540 nm pomocou spektrofotometrického readeru EPOCH.

Tabuľka 5: Koncentračná rada štandardov pre LDH testovanie

	Pyruvát/NADH [µl]	Voda [µl]	Aktivita LDH [U/ml]
1.	500	50	0
2.	400	150	280
3.	300	250	640
4.	200	350	1040
5.	100	450	1530
6.	50	500	2000

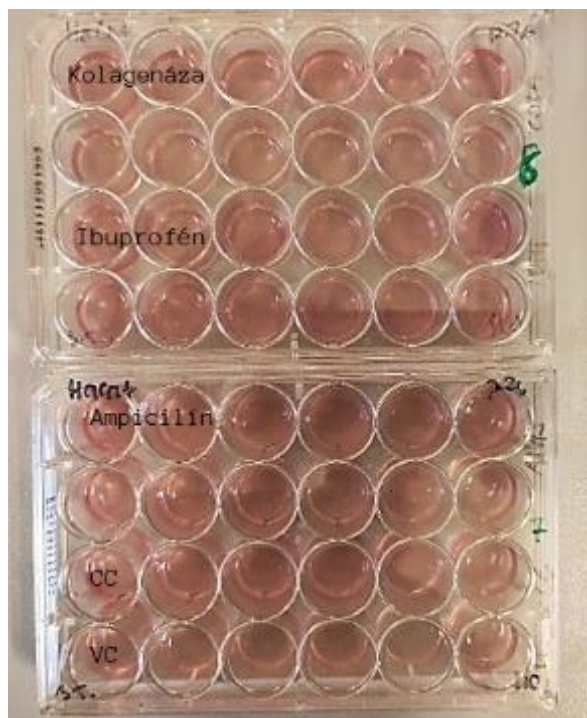
5.5.6 Scratch test

Na 24 jamkovej doske s konfluentnou kultúrou buniek sa odškrabnutím pomocou pipety odstráni časť buniek a vytvorí sa tak súvislá medzera na jamke (*Obrázok 44a*). Pozorovali sme migrujúce bunky, ktoré toto prázdne miesto v priebehu dvoch dní zaplnili. Pohyb buniek

v monovrstve sa hodnotil na základe merania zmenšovania odkrytej oblasti v časových intervaloch 24 a 48 hod. Objemové koncentrácie terapeutík sa pohybovali v rozmedzí 1 až 8%. V triplikátoch sme pozorovali aj kontrolu buniek (CC), kde sa nachádzalo iba médium, kontrolu vehicle (VC), kde okrem média bola pridaná aj destilovaná voda a pozitívnu kontrolu (PC) s 70% etanolom. Zacelenie medzery sa hodnotilo pomocou inverzného biologického mikroskopu pri zväčšení 100x a snímky boli vyhotovené kamerou Canon EOS 1100 D 18-55 mm.



Obrázok 29: Inverzný biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv

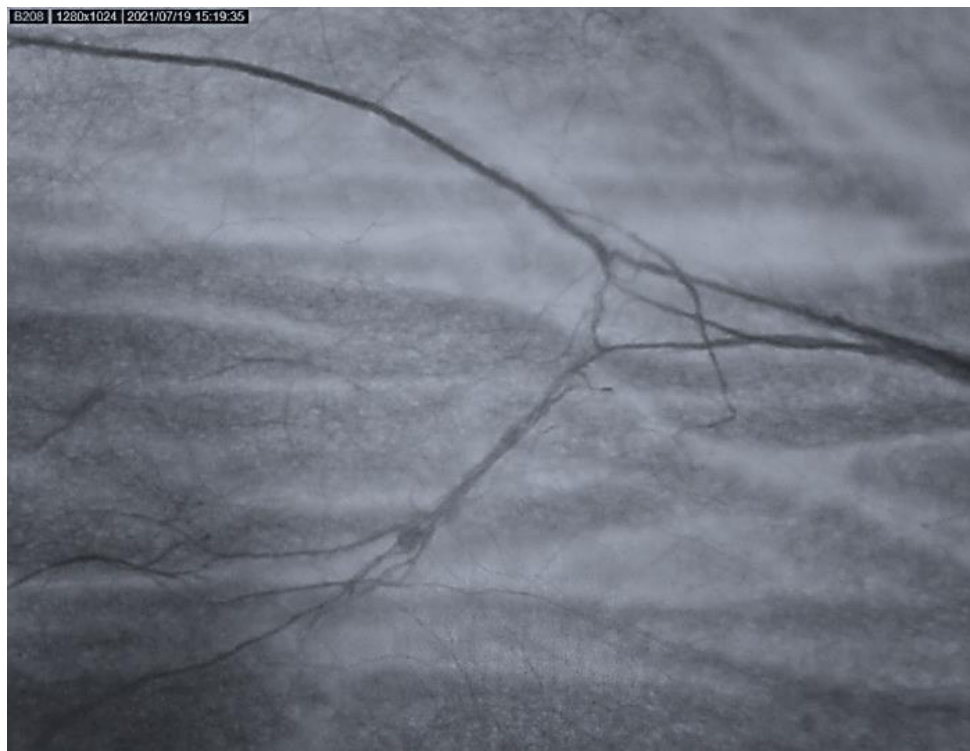


Obrázok 30: Rozloženie aktívnych látok na 24 jamkových doštičkách

6. DISKUSIA VÝSLEDKOV

6.1 Charakterizácia pripravených krytov rán

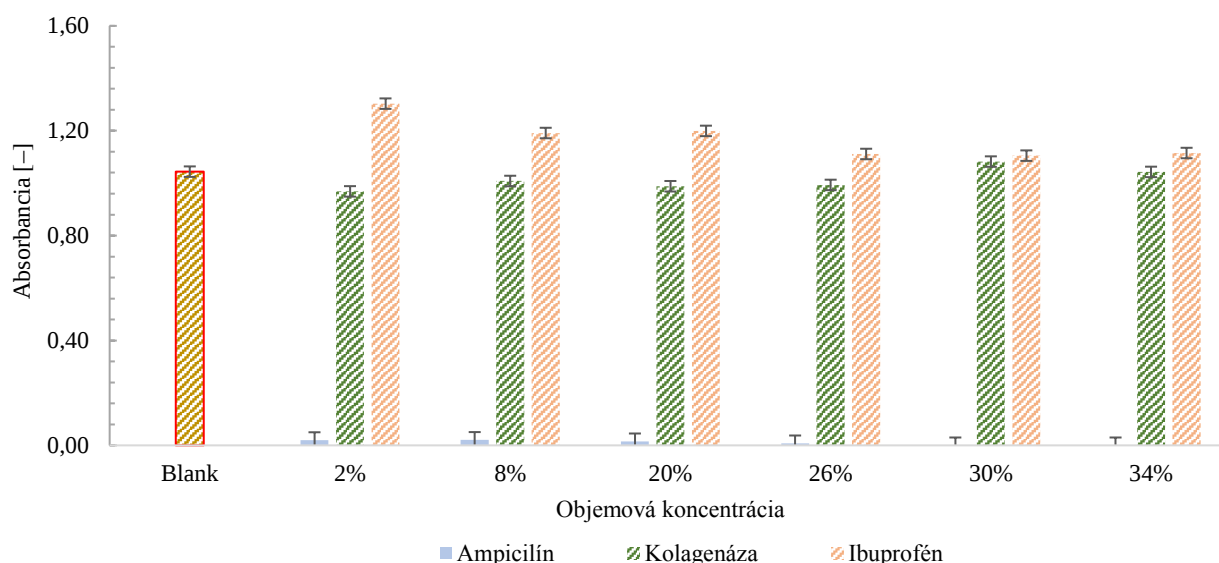
Štruktúra vytvorených vlákien sa pozorovala pod svetelným mikroskopom. Pri vyššom zväčšení sa na pozorovaný objekt nepodarilo dostatočne zaostriť. Predpokladáme, že pomocou metódy elektrospinningu sme pripravili vlákna o veľkosti v jednotkách mikrometrov.



Obrázok 31: Štruktúra želatinového krytu pri celkovom zväčšení 10x

6.1.1 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity pomocou zákalu

Podľa postupu uvedeného v kapitole 5.4.1 bola stanovená základná antimikrobiálna aktivita kultúry *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*. Stanovenie citlivosti bakteriálneho kmeňa k antibiotiku sa využila bujónová dilučná metóda. Hodnotí sa nárast kultúry v stacionárnej fáze, po inkubácii v tekutom médiu, ktorú na mikrotitračných doštičkách pozorujeme ako zmenu zákalu v jednotlivých jamkách.



Obrázok 32: Dilučný test na *G– Escherichia coli*

Z výsledkov, ktoré sú zhrnuté v grafoch (Obrázok 32 a Obrázok 33) usudzujeme, že kolagenáza prejavila minimálnu (takmer žiadnu) antimikrobiálnu aktivitu. V prípade ibuprofénu dokonca rast daného mikroorganizmu skôr podporoval. Na druhú stranu pri antibiotiku voči kmeňu *E. coli* pozorujeme výrazný antimikrobiálny účinok, pretože nárast buniek za 24 hodín nepresiahol absorbanciu 0,05 a teda predstavovala takmer 100 % inhibíciu rastu *G–* baktérie.

Tabuľka 6: Prepočet objemových percent na skutočnú koncentráciu v mg/ml

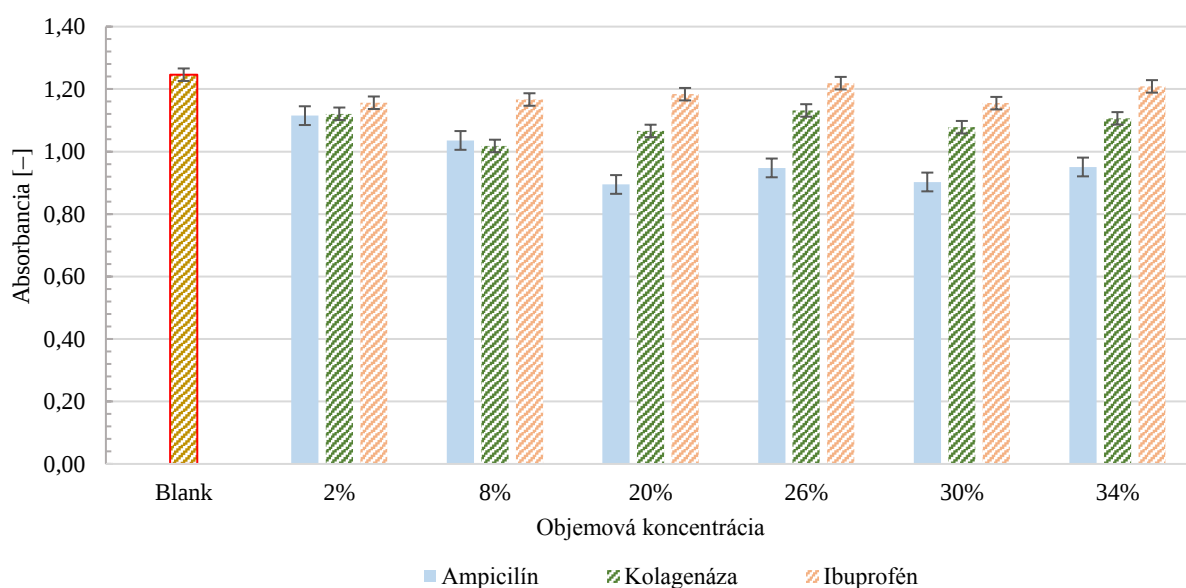
	2 %	8 %	20 %	26 %	30 %	34 %
Kolagenáza + ibuprofén [mg/ml]	0,06	0,24	0,6	0,78	0,9	1,02
Ampicilin [mg/ml]	0,08	0,32	0,8	1,04	1,2	1,36

Lokálna aplikácia antimikrobiálnych látok na kožu alebo sliznice, prináša riešenie na závažný medicínsky problém, akým je rezistencia baktérií na antibiotika. Medzi vedľajšie účinky užívania širokospetrálneho antibiotika ampicilínu je zaradená kandidóza, pretože ničí aj prospešné baktérie v tele a v dôsledku toho, dochádza k premnoženiu kvasiniek. Možný spôsob ako kandidóze predchádzať je antibiotikum do rany podávať lokálne v oveľa menších koncentráciách priamo na lôžko rany.

Tabuľka 7: Antimikrobiálny účinok *E. coli* [%]

	2 %	8 %	20 %	26 %	30 %	34 %
Ampicilín	-98,08	-98,02	-98,53	-100,00	-100,00	-100,00
Kolagenáza	-7,22	-3,42	-5,33	-4,85	3,67	-0,10
Ibuprofén	24,84	14,11	14,88	6,45	5,84	6,80

Pre lepšiu prehľadnosť je ku antimikrobiálnym testom uvedená aj tabuľka (Tabuľka 7), kde antimikrobiálny účinok u látok s rôznou koncentráciou je vyjadrený v percentách. Príslušný blank predstavuje 100%. Záporné hodnoty predstavujú inhibíciu rastu kultúry. Prípadné kladné čísla určujú o koľko percent, bol rast daného MO podporený.



Obrázok 33: Dilučný test na *G+* *Staphylococcus epidermidis*

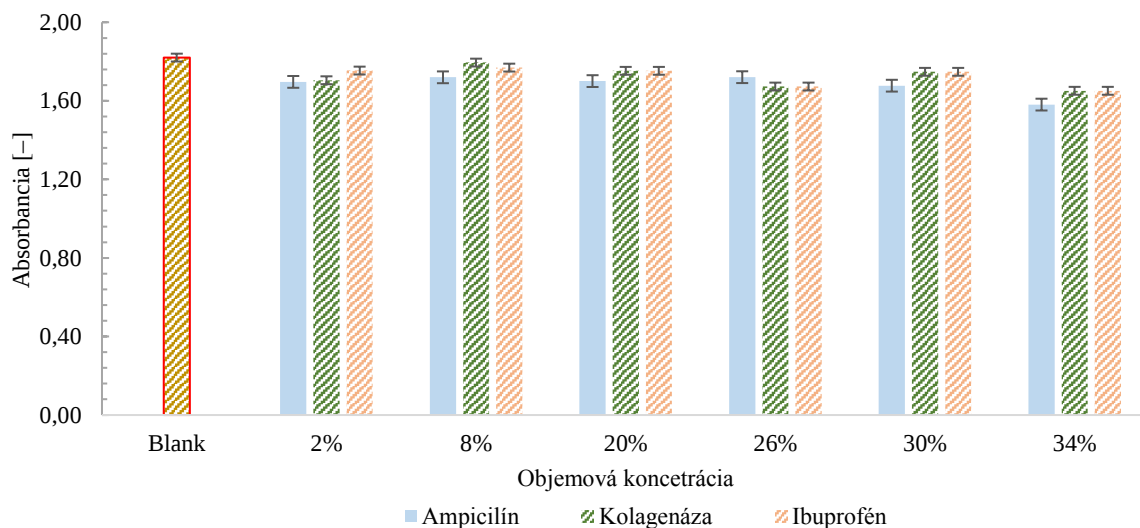
Do vlákien sme pridávali ampicilín v objemovej koncentrácii 5 %, no pre dosiahnutie výraznejšieho efektu, je možné túto koncentráciu aj zvýšiť ako uvádza tabuľka 8.

Tabuľka 8: Antimikrobiálny účinok *S. epidermidis* [%]

	2 %	8 %	20 %	26 %	30 %	34 %
Ampicilín	-10,80	-17,15	-28,43	-24,19	-27,79	-23,95
Kolagenáza	-10,32	-18,56	-14,72	-9,47	-13,76	-11,49
Ibuprofén	-7,49	-6,67	-5,31	-2,48	-7,60	-3,31

Síce sa najväčšia pozornosť venuje antibakteriálnej rezistencii na lieky, podobný jav sa vyskytol aj v dôsledku dlhodobého používania antitumorálnych látok, najmä u pacientov, ktorí

tieto lieky užívajú po celý život ako sú HIV pozitívni pacienti či príjemcovia transplantovaných orgánov.



Obrázok 34: Antimykotická aktivita jednotlivých látok na kvasinku *Candida glabrata*

Testovanie citlivosti kvasiniek mikrodilučnou metódou sa vykonávalo v jamkách mikrotitračných doštičiek, ktoré obsahujú rôzne koncentrácie antifungálnych látok. Naočkovanie sa vykonáva štandardným množstvom čistej kultúry testovaného kmeňa a po inkubácii sa porovnávala intenzita rastu v jednotlivých riedeniach s kontrolnou jamkou bez antimykotika. Ani jedna z látok nemala výrazný vplyv na rast kvasinky a teda vykazovali iba mierny inhibičný účinok na rast MO (Tabuľka 9).

Tabuľka 9: Antimikrobiálny účinok *C. glabrata* [%]

	2%	8%	20%	26%	30%	34%
Kolagenáza	-6,34	-1,39	-6,79	-4,74	-6,45	-4,10
Ibuprofén	-3,63	-2,80	-3,70	-8,10	-3,97	-9,29
Ampicilín	-6,79	-5,51	-3,88	-6,58	-5,48	-7,86

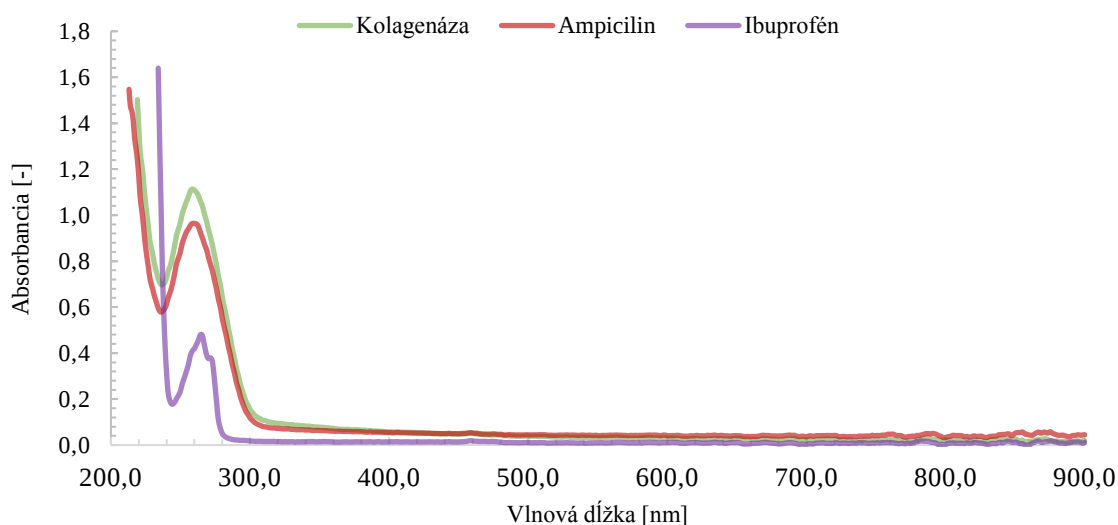
6.1.2 Stanovenie postupného uvoľňovania terapeutík

Uvoľňovanie troch aktívnych látok z vlákien sa stanovilo za využitia spektrofotometra. Postup práce je zhrnutý v kapitole 5.4.2. Ako prvé sa zhotovilo absorpčné spektrum od 200 až 900 nm danej zlúčeniny.

Tabuľka 10: Kalibračné závislosti terapeutík

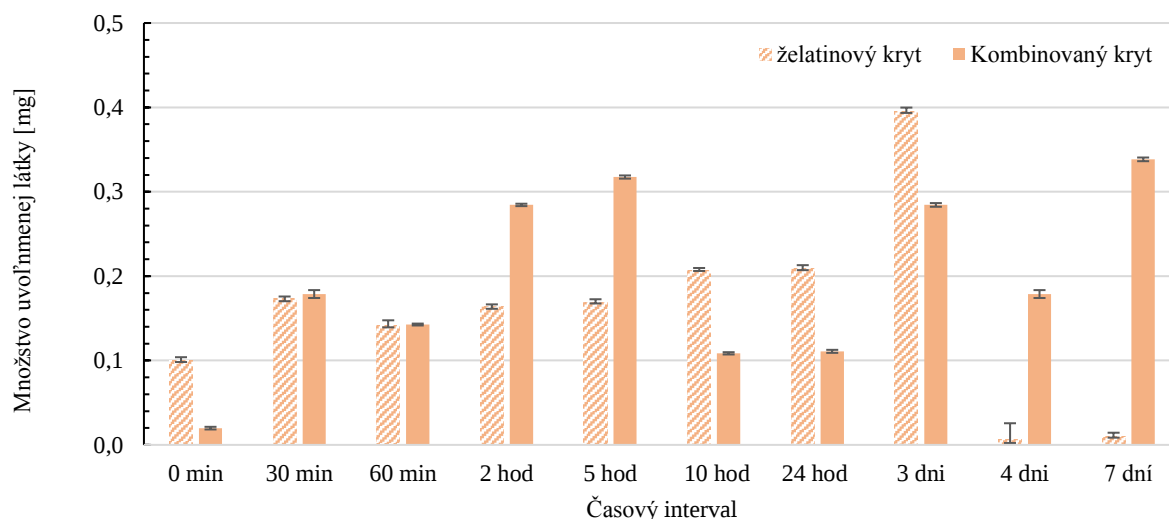
Aktívna látka	Kalibračná rovnica
Kolagenáza	$y = 2,5254x$; $R^2=0,9903$
Ampiciín	$y = 0,8517y$; $R^2 = 0,9983$
Ibuprofén	$y = 1,8459x$; $R^2 = 0,9448$

Z týchto spektier (Obrázok 35) sa následne určilo absorpčné maximum, ktoré bolo potrebné na zostrojenie závislosti grafu závislosti absorbancie od koncentrácie skúmaných terapeutík.



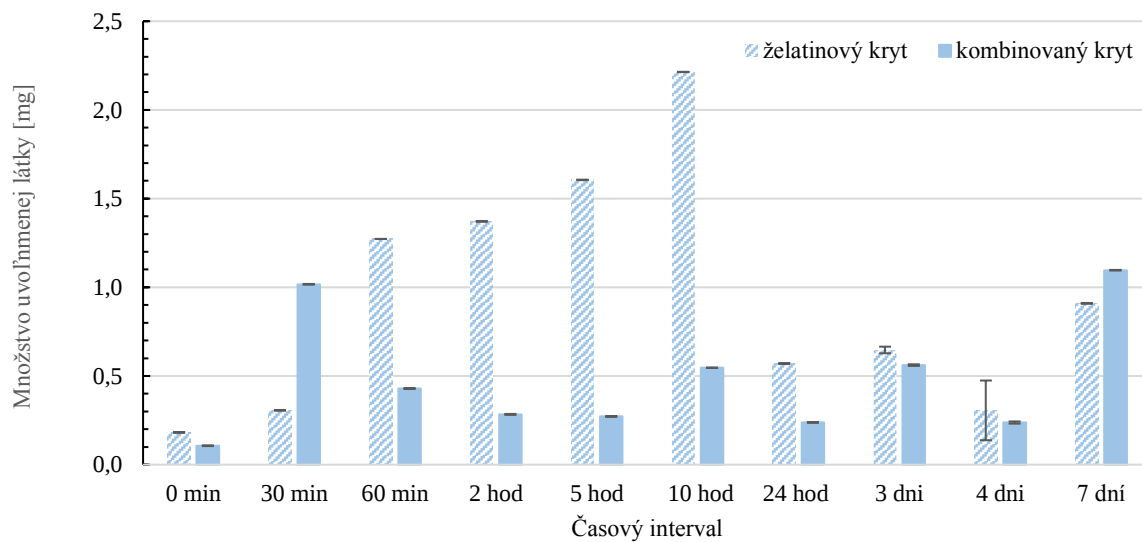
Obrázok 35: Absorčné spektrá aktívnych látok

Do krytov sme pridávali aktívnu látku v množstve 5 % z celkového množstva želatíny a postup prípravy je opísané v bode 5.2.4. Z grafického zobrazenia je vidieť, že ibuprofén bol najviac detekovateľný až na 3 deň (0,28 mg). Následne došlo k jeho degradácii. Kombinovaný kryt obsahoval vrchnú a spodnú želatinovú vrstvu bez aktívnej látky. Z výsledkov pozorujeme, že tieto dve želatinové vrstvy bez aktívnej látky nemali žiadny vplyv na pomalšie uvoľňovanie analgetika do modelového prostredia.



Obrázok 36: Uvoľňovanie ibuprofenu z 30 % krytu želatíny

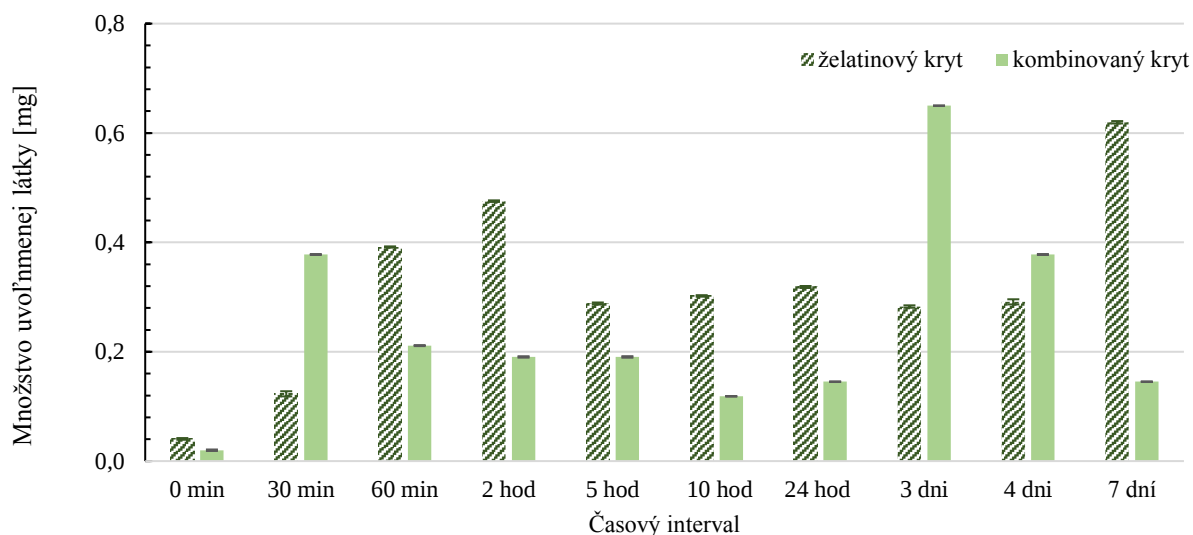
V grafe (Obrázok 37) je spracované uvoľňované antibiotika a najväčšie množstvo sa zaznamenalo po 10 hodinách inkubácie. Jeho degradáciu pravdepodobne naznačuje jeho nasledujúci prudký pokles po 24 hodinách. Presnejšie výsledky by boli dosiahnuté za použitia citlivejšie techniky (napr. kvapalinovej chromatografia).



Obrázok 37: Uvoľňovanie ampicilínu z 30 % krytu želatíny

Nasledujúci graf (Obrázok 38) zobrazuje postupné uvoľňovanie enzýmu. Je viditeľné, že uvoľnené množstvo sa výrazne nelíšilo a pohybovalo sa v rozmedzí 0,28 až 0,39 mg, najviac však po 2 hodinách v množstvo 0,48 mg. Pri kombinovanom kryte sa najväčšie množstvo zaznamenalo už po 30 minútach. Želatinové kryty obohatené o enzým boli v porovnaní

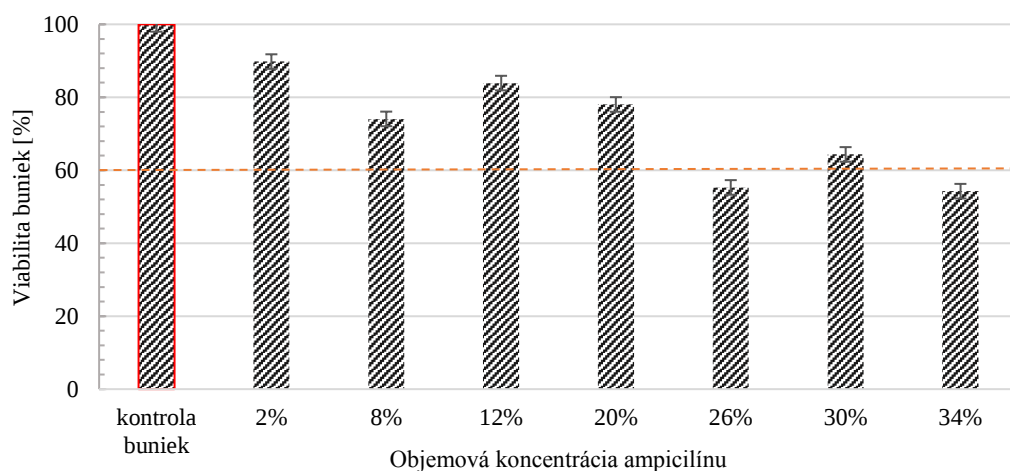
s ostatnými krytmi najmenej súdržné. Riešením môže byť zníženie koncentrácie rozpúšťadla AA na 10%, aby nedošlo k denaturácii enzýmu a jeho odstredenie a prefiltrovanie cez 0,8 µm filter.



Obrázok 38: Uvoľňovanie kolagenázy z 30 % krytu želatíny

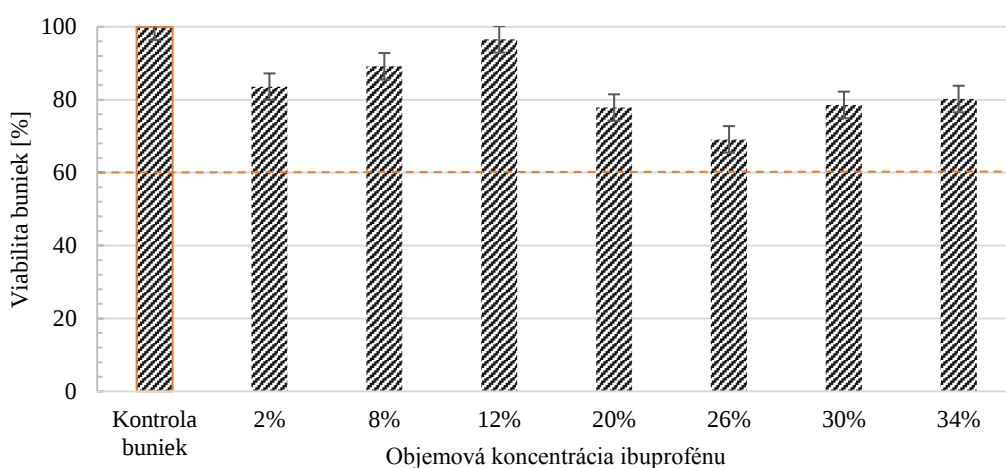
6.1.3 Testovanie cytotoxicity aktívnych látok

Metabolickú aktivitu buniek sme určili pomocou testu MTT na ľudských epidermálnych keratinocytoch na základe postupu, ktorý je zhrnutý v kapitole 5.5.4. Testované boli aktívne látky, ktoré sa následne inkorporovali do krytov. Ak viabilita buniek neklesne pod hodnotu 60 % po 48 hodinách inkubácie, tak táto látka je považovaná za bezpečnú a nie je toxická pre bunky. Počet živých buniek je indikovaný množstvom redukovaného MTT. Najlepšie výsledky boli zistené pri analgetiku ibuprofén (Obrázok 40), ktorý pomalým uvoľňovaním zmierňuje bolesť rany pri exsudujúcich ranách, čo dokazujú zistenia z medzinárodnej štúdie [66].



Obrázok 39: Viabilita buniek po pridaní antibiotika

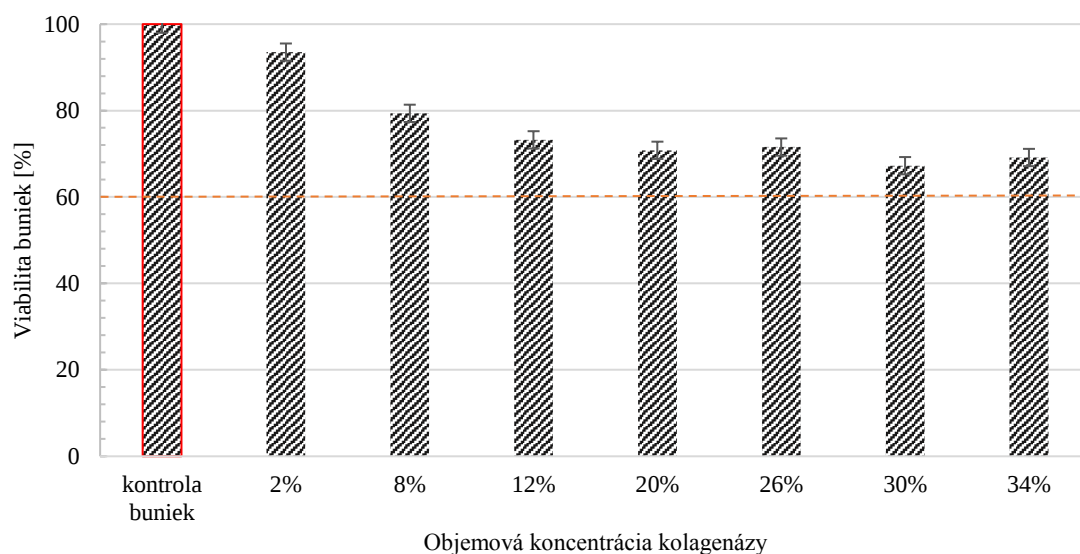
Ampicilín bol vybraný ako antibiotikum kvôli jeho účinnosti proti rôznym grampozitívnym a gramnegatívnym baktériám, čo je užitočné pri liečbe infikovanej rany, alebo predchádza jej infekcii. Pri zvýšenej koncentrácii tohto penicilínového širokostrekrálneho antibiotika viabilita klesla pod hranicu 60% (Obrázok 39). Farmakoterapeutický účinok ampicilínu by mohol byť využitý pri nekrotických ranách, kedy by boli v kontakte s odumretým tkanivom a na rane by sa ponechávali kratší časový interval.



Obrázok 40: Viabilita buniek po pridaní analgetika

Z grafu (Obrázok 41) vidíme, že kryty funkcionalizované o enzým kolagenáza, ktorý bol izolovaný z *Clostridium histolyticum* (CHC) môžeme považovať za bezpečné. Viabilita buniek sa pohybovala v rozmedzí 67 až 93 %. Použitie tohto imobilizovaného enzýmu u nanovláknenných krytov predstavuje vysoký potenciál pre hojenie rán, pretože klostridiálne

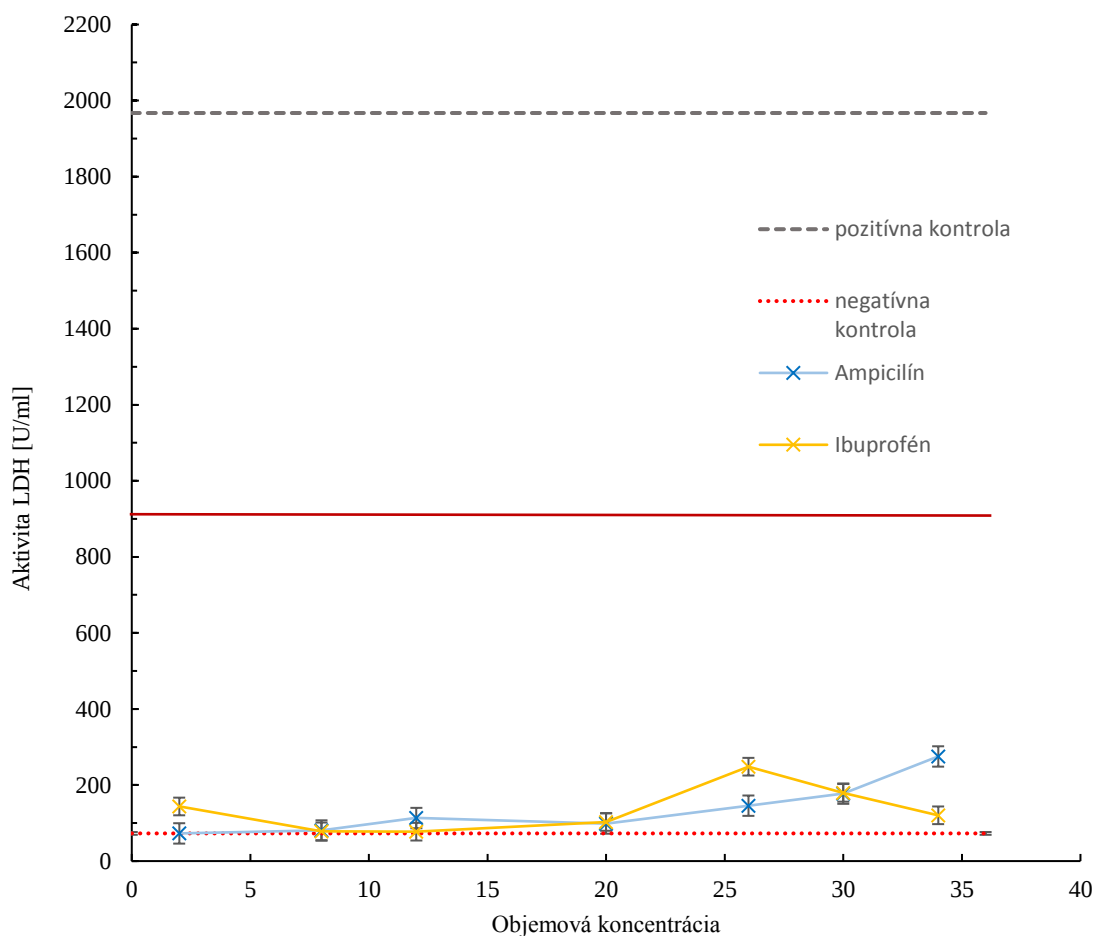
kolagenázy štiepia trojšroubovicu kolagénu a sú schopné bezbolestne odbúravať nekrotické zvyšky, čo je podstatou enzymatického debridementu, ktorý sa používa na otvorené rany (najmä popáleniny). Nevýhodou enzymatického debridementu je finančná náročnosť a nestabilita enzýmu. Na druhú stranu lokálne pôsobenie enzýmu pri čistení rany nepoškodzuje okolité zdravé tkanivo.



Obrázok 41: Viabilita buniek po pridaní enzýmu

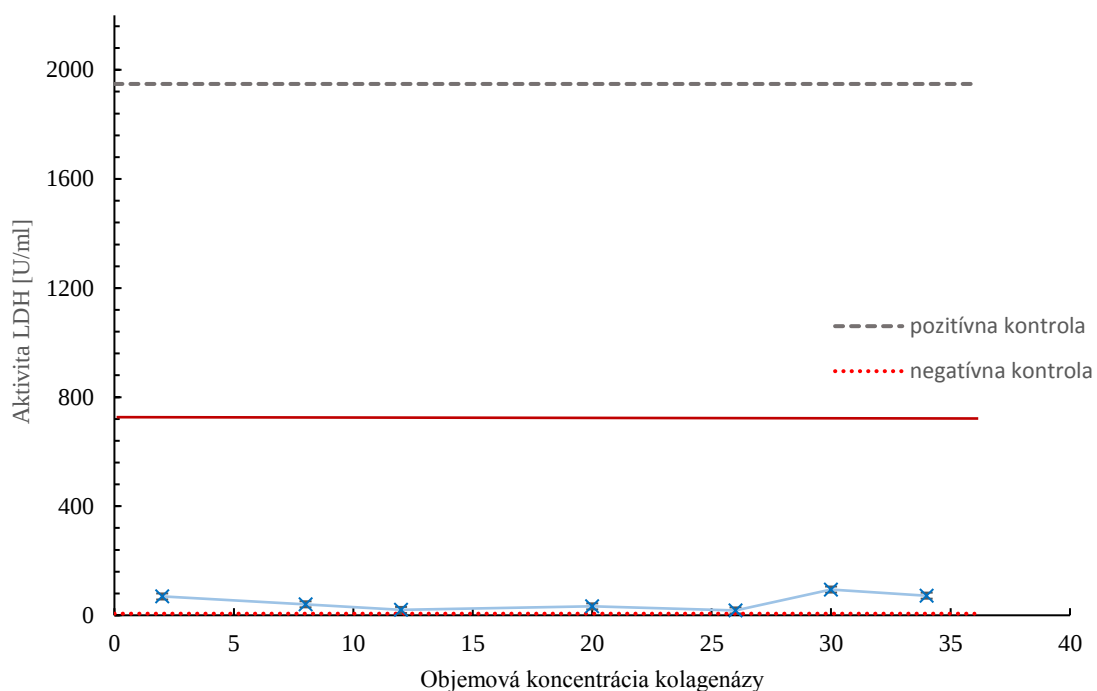
Cytotoxicitu sme vyjadrili aj pomocou aktivity laktátdehydrogenázy v supernatante po jeho expozícii vybranými terapeutikami. Hlavnou funkciou enzýmu je katalyzovať reverzibilnú premenu laktátu na pyruvát redukciou NAD^+ na NADH a naopak. Zvýšenie LDH alebo jeho izoenzýmov v organizme slúži ako biomarker bunkovej nekrózy. Pri pozitívnej kontrole sme k zmesi pridali 70 % etanol, pri negatívnej kontrole sa bunky kultivovali iba v médiu, čo predstavovalo prirodzené úmrtie buniek, ktoré uvoľnili enzým LDH. Podrobný postup prípravy testu je zhrnutý v bode 4.4.5. Aktivita testovaných látok sa pohybovala v rozmedzí

72,5 až 275 U/ml a teda nedosiahla hranicu cytotoxicity, ktorá predstavuje 40 % mortalitu.



Obrázok 42: Vyhodnotenie LDH testu za použitia antibiotika a analgetika

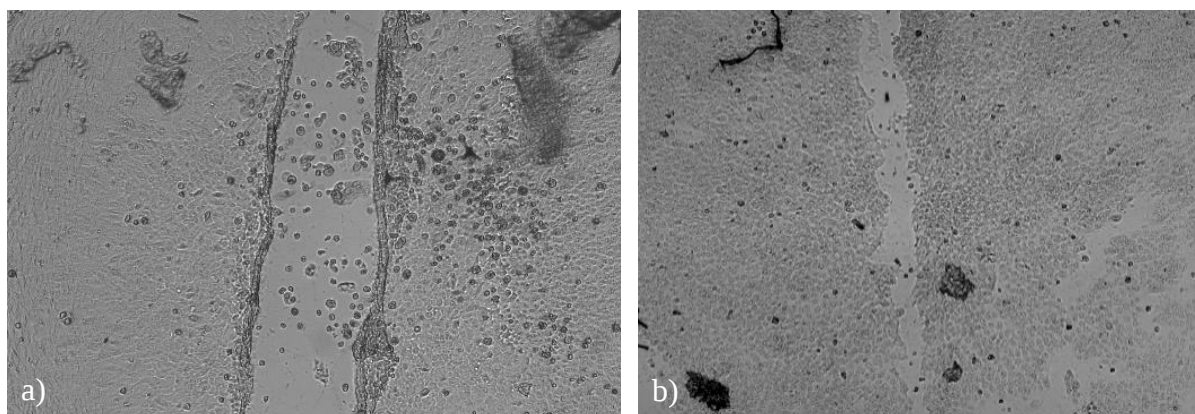
Z grafu vieme zistiť, že žiadna vzorka nespôsobila poškodenie v plazmatickej membráne HaCaT buniek. Tento výsledok úplne nekorešponduje s výsledkami MTT testu, kde za cytotoxické sa určili vzorky 26 % a 34 % ampicilínu. Tento rozdiel vo výsledkoch týchto dvoch analýz posilňuje potrebu vykonať niekoľko druhov testov, aby sa dospelo k záveru o bezpečnostnom profile daných látok.



Obrázok 43: Vyhodnotenie LDH testu za použitia enzýmu

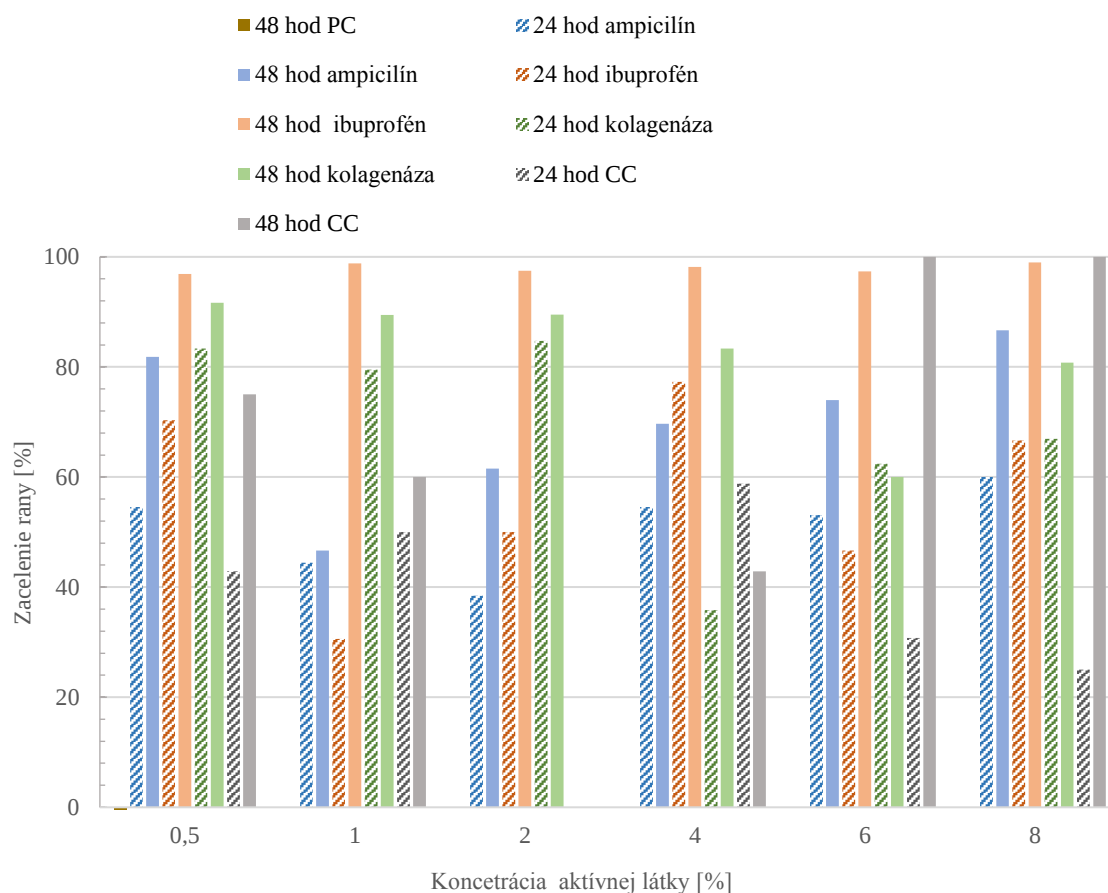
6.1.4 Test hojenia rán

Skúška hojenia rán je dvojrozmernou technikou, ktorá sa využíva na štúdium bunkovej migrácie *in vitro*. Patrí medzi jednoduché a lacné metódy a postup testu je zhrnutý v kapitole 5.5.6. Zacelenie medzery sa vyhodnotilo percentuálne pomocou dát, ktoré sa získali z kamery umiestnenej na inverznom mikroskope.



Obrázok 44: a) zacelenie rany 8 % obj. konc. ibuprofenu v čase 0 hod., b) po 24 hod pri celkovom zväčšení 100x

Najlepšie výsledky dosiahlo analgetikum ibuprofén, kedy sa rana po 48 hodinách zacelila takmer úplne. Naopak ako najmenej účinná látka na migráciu buniek sa určilo antibiotikum. Na dvojici fotografií (Obrázok 44) pozorujeme zacelenie rany po pridaní látky ibuprofenu v 8 % obj. koncentrácií. Kultivácia prebiehala v inkubačnom boxe Memmert pri 37°C s 5% obsahom CO₂ vo vzduchu počas 48 hodín.



Obrázok 45: Zacelenie rany počas 48 hodín

7. ZÁVER

Teoretická časť diplomovej práce je zameraná na proces hojenia rán a zahrňuje aktuálne produkty kožných krytov dostupné na trhu. V tejto súvislosti obsahuje aj stručný prehľad procesu výroby, čoraz aktuálnejších nanovláknenných materiálov a ich uplatnením pri príprave terapeutických krytov. Ďalej popisuje základné parametre metódy práce pri kultivácii buniek *in vitro* v laboratóriu a princípy stanovenia ich viability.

Praktická časť je zameraná najmä na optimalizáciu a charakterizáciu vláknenných želatínových kožných krytov, ktoré boli pripravené aj v kombinácii s alginátom a chitosanom. Ako efektívny spôsob prípravy sa ukázal 5% roztok chitosanu a 30 % roztok želatíny v 50% AA v pomere 1:1. Vlákná sa zhromaždili na uzemnenej hliníkovej fólii vo vzdialenosti 10 cm od hrotu injekčnej ihly a priemer ihly bol zvolený v rozmedzí 0,5 až 1,3 mm. Pri priemere ihly 0,8 mm sa prietok ustálil na 0,8 ml/hod. Proces zvlákňovania sa uskutočňoval pri teplote 22 °C a napätí 15,1 kV.

Rýchlosť hojenia sa zaznamenala pomocou scratch testu. Po 48 hodinách sa rana s analgetikom zacelila takmer úplne, pri antibiotiku sa zmenšila odkrytá oblasť na 87 %, pri enzýme to bolo na 81 %. Uvoľňovanie troch aktívnych látok z vlákien sa stanovilo spektrofotometricky. Do modelového prostredia sa najpomalšie uvoľňovala látka ibuprofén. Pri trvalom uvoľňovaní nízkej dávky ibuprofenu do lôžka rany počas celej doby opotrebovania obväzu, by takýto kožný kryt poskytoval pacientovi vysoký komfort. Množstvo kolagenázy sa pohybovalo v rozmedzí 0,28 mg (5 hod.) až 0,39 mg (4. deň) a teda sa výrazne nelíšilo. Najväčšie množstvo ampicilínu sa zaznamenalo už po 10 hodinách inkubácie.

Bezpečnosť inkorporovaných účinných látok vo forme dvoch liečiv a enzýmu sa potvrdila na imortalizovaných ľudských keratinocytoch línie HaCaT pomocou MTT, LDH testu cytotoxicity a novo zavedného scratch testu. Výsledky dilučných testov ukázali, že látka ampicilín má výrazne antimikrobiálnu aktivitu voči kmeňu *Escherichia coli*.

Nanovláknenné materiály by mohli nájsť uplatnenie pri ošetrovaní chronických rán, pričom kožné kryty by boli vytvorené z viacerých vrstiev (LbL), každá vrstva by obsahovala inú účinnú zložku, ktorá by sa rany sa uvoľňovala postupne. V budúcnosti by bolo vhodné vyhodnotiť elektrostatické zvlákňovanie pri zapojení zdroja el. napätia nad hodnotu 30 kV a použití injekčnej ihly s vnútorným priemerom 0,5 mm. Zároveň pre rovnomerné začlenenie a distribúciu bioaktívnych zlúčenín do vlákennej štruktúry použiť látku polyetylén oxid s relatívnou molekulovou hmotnosťou 900 000 g/mol.

8. ZDROJE

1. POND, D., A.T. MCBRIDE, L.M. DAVIDS, B.D. REDDY a G. LIMBERT. Microstructurally-based constitutive modelling of the skin – Linking intrinsic ageing to microstructural parameters. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 2018, 444, 108-123 [cit. 2020-10-16]. ISSN 00225193. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtbi.2018.01.014
2. ABDO, Joseph M., Nikolai A. SOPKO a Stephen M. MILNER. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine* [online]. 2020, 28 [cit. 2020-10-16]. ISSN 22139095. Dostupné z: doi:10.1016/j.wndm.2020.100179
3. YOUSEF, H., M. ALHAJJ a S. SHARMA, 2020. *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. [: Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; [online]. [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
4. NAFISI, Shohreh a Howard I. MAIBACH. Skin penetration of nanoparticles. *Emerging Nanotechnologies in Immunology* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 47-88 [cit. 2020-10-17]. ISBN 9780323400169. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-40016-9.00003-8
5. LAWTON S (2019) Skin 1: the structure and functions of the skin. *Nursing Times* [online]; 115, 12, 30-33. [cit. 2020-10-16]. Dostupné z: <https://cdn.ps.emap.com/wp-content/uploads/sites/3/2019/11/191127-Skin-1-the-structure-and-functions-of-the-skin.pdf>
6. LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
7. ŠIMKO, Štefan a Ján KOLLER, 1992. *Popáleniny*. Ilustroval Dušan ČERVENÝ. Martin: Osveta. Dérerova zbierka. ISBN 80-217-0427-6.
8. FANČOVIČOVÁ, Jana, Pavol PROKOP a Mário SZIKHART, 2017. *Biológia človeka pre učiteľské kombinácie s biológiou II. Druhá časť 2. prepracovaného vydania*. Trnava. ISBN 978-80-568-0092-8.

9. YOUSEF, H., M. ALHAJJ a S.A. SHARMA. Skin (Integument), Epidermis. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020, 29.3.2020 [cit. 2020-10-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
10. RIEG, Siegbert, Heiko STEFFEN, Silke SEEGER, Andreas HUMENY, Hubert KALBACHER, Klaus DIETZ, Claus GARBE a Birgit SCHITTEK, 2005. Deficiency of Dermcidin-Derived Antimicrobial Peptides in Sweat of Patients with Atopic Dermatitis Correlates with an Impaired Innate Defense of Human Skin In Vivo. The Journal of Immunology [online]. 174(12), 8003-8010 [cit. 2021-6-15]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.174.12.8003
11. BUKOVČAN, P.. Hojenie rán. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2019. ISBN 978-80-223-4793-8
12. HRABÁLEK, Alexandr a Kateřina VÁVROVÁ. Lze překonat kožní bariéru?: Aktuální farmakoterapie. 2005, 8-11 s. Dostupné z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2005/01/02.pdf>
13. KOTINGOVÁ Lenka, Lenka BORSKÁ a Zdeněk FIALA. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. Chemické listy. 2009, č. 103, 533 – 539 s.
14. POSPÍŠILOVÁ, Alena a Sabina SELLNER ŠVESTKOVÁ. Léčba chronických ran. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2001. ISBN 80-7013-348-1
15. TIRPÁKOVÁ, Libuša, Mária SOVÁRIOVÁ SOÓSOVÁ, Lucia DIMUNOVÁ, et al. Ošetrovateľské techniky. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, 2016. Vysokoškolská učebnica. ISBN 978-80-8152-441-7
16. EDWARDS-JONES, Valerie, 2016. Essential Microbiology for Wound Care. ISBN 978-0-19-871600-6.
17. Národný portál zdravia [online], 14. 11. 2019, [cit. 2020-11-05]. Dostupné z: https://www.npz.sk/sites/npz/Stranky/NpzArticles/2019_11/Nadej_pre_diabetikov__Novy_pristup_k_liecbе_cukrovky.aspx?did=6&sdid=81&tuid=0&

18. RODRIGUES, Melanie, Nina KOSARIC, Clark A. BONHAM a Geoffrey C. GURTNER. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews* [online]. 2019, 99(1), 665-706 [cit. 2021-6-15]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00067.2017
19. Kompendium ran a jejich ošetřování, 1999. HARTMANN-RICO A.S. 664 71 Veverská Bitýška. ISBN 3-929870-18-5.
20. FERENČÍK, Miroslav, Jozef ROVENSKÝ, Yehuda SHOENFELD a Vladimír MAŤHA. Imunitný systém - dobrý obranca, ale aj možný diverzant. Bratislava: Slovak Academic Press, 2004. ISBN 80-89104-45-2.
21. NEUSCHLOVÁ, Martina, Elena NOVÁKOVÁ a Jana KOMPANÍKOVÁ. *Imunológia - ako pracuje imunitný systém*. Martin: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, 2018. ISBN 978-80-8187-031-6.
22. Regionální zpravodajství NZIS: Česká republika [online], 2017. [cit. 2020-11-05]. Dostupné z: <https://reporting.uzis.cz/cr/index.php?pg=souhrnne-prehledy--ukazatele-zdravotniho-stavu--vyskyt-a-lecba-diabetu-mellitu-podle-sidla-zdravotnickeho-zarizeni-lecby>
23. VLČEK, Jiří, Daniela FIALOVÁ a Magda VYTRŘÍSALOVÁ. *Klinická farmacie*. Praha: Grada, 2014. ISBN 9788024731698
24. GUO, S. a L.A. DIPIETRO. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research* [online]. 2010, 89(3), 219-229 [cit. 2021-6-15]. ISSN 0022-0345. Dostupné z: doi:10.1177/0022034509359125
25. *O nanovlákněch: nafigatepark.cz* [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <https://www.nafigatepark.cz/o-nanovlaknech/>
26. PATIL, Priyanka P., Michaela R. REAGAN a Raghvendra A. BOHARA. Silk fibroin and silk-based biomaterial derivatives for ideal wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, 164, 4613-4627 [cit. 2020-10-30]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.08.041

27. ZHANG, Miao a Xia ZHAO. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, 162, 1414-1428 [cit. 2020-11-04]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.311
28. MRÁZOVÁ, Romana. Nové typy krytí ran – novinky, použití, aplikace: *Medicína pro praxi* [online]. 2014; 11(2) [cit. 2020-11-04]. Dostupné z: www.medicinapropraxi.czZačiatok formulára
29. LIU, Yueqi, Tianya LI, Yufen HAN, Fangjun LI a Yong LIU. Recent development of electrospun wound dressing. *Current Opinion in Biomedical Engineering* [online]. 2021, 17 [cit. 2020-11-06]. ISSN 24684511. Dostupné z: doi:10.1016/j.cobme.2020.100247
30. WOSKOVÁ, Veronika a Alexandra JIRKOVSKÁ. Hlavní zásady léčby syndromu diabetické nohy. *Medicína pro praxi* [online]. 43-55 [cit. 2020-11-05]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2010/88/06.pdf>
31. ZAJICEK, Robert, Vaclav MANDYS, Ondrej MESTAK, Jan SEVCIK, Radana KÖNIGOVA a Eva MATOUSKOVA. Human Keratinocyte Growth and Differentiation on Acellular Porcine Dermal Matrix in relation to Wound Healing Potential. *The Scientific World Journal* [online]. 2012, 2012, 1-8 [cit. 2020-11-06]. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1100/2012/727352
32. POSPÍŠILOVÁ, Alena. Léčba chronických ran moderními krycími prostředky [online]. *Prakt. lékařn.* 2010; 6(6): 276–281 [cit. 2020-11-06]. Dostupné z: https://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-201006-0004_Lecba_chronickych_ran_modernimi_krycimi_prostredky.php
33. Mezioborové přístupy v hojení ran: česko-slovenský kongres : 28.-29. listopadu 2019, Lednice .. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2019. ISBN 978-80-01-06669-
34. Capesmedical.co.nz [online]. [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: <https://www.capesmedical.co.nz/medical-products/woundcare/film/3m-tegaderm-iv-dressing/7cm-8p5cm>Začiatok formulára

35. *NANOTECHNOLOGY*: www.czechtrade.eu [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <https://www.czechtradeoffices.com/d/.www.czechtradeoffices.com/sector%20publications/czech-nanotechnology.pdf>
36. *O nanovlákněch*: navigatepark.cz [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <https://www.navigatepark.cz/o-nanovlaknech/>
37. *Želatina*: lekopis.cz [online]. [cit. 2021-6-15]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Gelatina.htm
38. FURUNO, Kotoko, Jing WANG, Keiichiro SUZUKI, Masaki NAKAHATA a Shinji SAKAI. Gelatin-Based Electrospun Fibers Insolubilized by Horseradish Peroxidase-Catalyzed Cross-Linking for Biomedical Applications. *ACS Omega* [online]. 2020, 5(33), 21254-21259 [cit. 2021-6-15]. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.0c03164
39. MARIOD, Abdalbasit Adam a Hadia Fadol ADAM, 2013,. *REVIEW: GELATIN, SOURCE, EXTRACTION AND INDUSTRIAL APPLICATIONS* [online]. [cit. 2021-6-15]. ISSN 1644-0730. Dostupné z: https://www.food.actapol.net/pub/1_2_2013.pdf
40. ALIHOSSEINI, F. Plant-based compounds for antimicrobial textiles. *Antimicrobial Textiles* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 155-195 [cit. 2021-6-3]. ISBN 9780081005767. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100576-7.00010-9
41. ULUBAYRAM, K. EGF containing gelatin-based wound dressings. *Biomaterials* [online]. 22(11), 1345-1356 [cit. 2021-6-3]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(00)00287-8
42. MOGHADDAM, Meghdad Kamali, Sayed Majid MORTAZAVI a Taghi KHAYAMIAN. Preparation of calcium alginate microcapsules containing n-nonadecane by a melt coaxial electrospray method. *Journal of Electrostatics* [online]. 2015, 73, 56-64 [cit. 2021-6-4]. ISSN 03043886. Dostupné z: doi:10.1016/j.elstat.2014.10.013

43. QIN, Zeyu, Xiwen JIA, Qian LIU, Baohua KONG a Hao WANG. Enhancing physical properties of chitosan/pullulan electrospinning nanofibers via green crosslinking strategies. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, **247** [cit. 2020-11-28]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2020.116734

44. PAL, Preeti, Anjali PAL, Kazunori NAKASHIMA a Brijesh Kumar YADAV. Applications of chitosan in environmental remediation: A review. *Chemosphere* [online]. 2020 [cit. 2020-11-26]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128934

45. KYZIOŁ, Agnieszka, Justyna MICHNA, Ivan MORENO, Enrique GAMEZ a Silvia IRUSTA. Preparation and characterization of electrospun alginate nanofibers loaded with ciprofloxacin hydrochloride. *European Polymer Journal* [online]. 2017, 96, 350-360 [cit. 2021-6-4]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.09.020

46. HU, C., R. H. GONG a F. L. ZHOU. Electrospun Sodium Alginate/Polyethylene Oxide Fibers and Nanocoated Yarns. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2015, **2015**, 1-12 [cit. 2021-6-4]. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2015/126041

47. BONINO, Christopher A., Melissa D. KREBS, Carl D. SAQUING, Sung In JEONG, Kimberly L. SHEARER, Eben ALSBERG a Saad A. KHAN. Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, 85(1), 111-119 [cit. 2021-6-4]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.02.002

48. BRÁS, Teresa, Daniela ROSA, Ana C. GONÇALVES, Andreia C. GOMES, Vítor D. ALVES, João G. CRESPO, Maria F. DUARTE a Luísa A. NEVES. Development of bioactive films based on chitosan and *Cynara cardunculus* leaves extracts for wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, 163, 1707-1718 [cit. 2020-11-22]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.09.109

49. PAL, Preeti, Anjali PAL, Kazunori NAKASHIMA a Brijesh Kumar YADAV. Applications of chitosan in environmental remediation: A review. *Chemosphere* [online]. 2020 [cit. 2020-11-26]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128934
50. WOO, Chang Hee, Young Chan CHOI, Ji Suk CHOI, Hee Young LEE a Yong Woo CHO. A bilayer composite composed of TiO₂-incorporated electrospun chitosan membrane and human extracellular matrix sheet as a wound dressing. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2015, 26(13), 841-854 [cit. 2021-6-4]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2015.1061349
51. QASIM, Saad, Muhammad ZAFAR, Shariq NAJEEB, Zohaib KHURSHID, Altaf SHAH, Shehriar HUSAIN a Ihtesham REHMAN. Electrospinning of Chitosan-Based Solutions for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(2) [cit. 2021-6-4]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19020407
52. ROŠIĆ, R., P. KOCBEK, S. BAUMGARTNER a J. KRISTL. Electrospun Chitosan/Peo Nanofibers and Their Relevance in Biomedical Application. JOBBÁGY, Ákos, ed. *5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, 2011, s. 1296-1299 [cit. 2021-6-15]. IFMBE Proceedings. ISBN 978-3-642-23507-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-23508-5_335
53. *Elmarco.cz: TECHNOLOGIE NANOSPIDER* [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <https://www.elmarco.cz/ns-technologie>
54. *Českí vynálezci: www.ciexpo.cz* [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <http://www.ciexpo.cz/rodokmen/oldrich-jirsak/>
55. SUTKA, Anna, Silvija KUKLE, Janis GRAVITIS, Rimvydas MILAŠIUS a Jolanta MALAŠAUSKIENĖ. Nanofibre Electrospinning Poly(vinyl alcohol) and Cellulose Composite Mats Obtained by Use of a Cylindrical Electrode. *Advances in Materials Science and Engineering* [online]. 2013, **2013**, 1-6 [cit. 2021-6-3]. ISSN 1687-8434. Dostupné z: doi:10.1155/2013/93263

56. TOPUZ, Fuat, Mahmoud A. ABDULHAMID, Tibor HOLTZL a Gyorgy SZEKELY. Nanofiber engineering of microporous polyimides through electrospinning: Influence of electrospinning parameters and salt addition. *Materials & Design* [online]. 2021, **198** [cit. 2020-11-28]. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2020.109280
57. SUBBIAH, Thandavamoorthy, G. S. BHAT, R. W. TOCK, S. PARAMESWARAN a S. S. RAMKUMAR. Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2005, 96(2), 557-569 [cit. 2020-11-28]. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.21481
58. LIU, Yan, Shiya ZHOU, Yanlin GAO a Yinglei ZHAI. Electrospun nanofibers as a wound dressing for treating diabetic foot ulcer. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2019, 14(2), 130-143 [cit. 2020-11-05]. ISSN 18180876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajps.2018.04.004
59. *Electrospinning for Beginners: LINARI NanoTech* [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <https://www.linarinanotech.com/blogs/news/electrospinning-for-beginners>
60. JECKSON, Tracey Anastacia, Yun Ping NEO, Sreenivas Patro SISINTHY a Bapi GORAIN. Delivery of Therapeutics from Layer-by-Layer Electrospun Nanofiber Matrix for Wound Healing: An Update. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2021, 110(2), 635-653 [cit. 2021-04-15]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1016/j.xphs.2020.10.003
61. ZHENG, Weishi, Chuntao CHEN, Xujun ZHANG, et al. Layer-by-layer coating of carboxymethyl chitosan-gelatin-alginate on cotton gauze for hemostasis and wound healing. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2021, **406** [cit. 2021-04-15]. ISSN 02578972. Dostupné z: doi:10.1016/j.surfcoat.2020.126644
62. *ElectrospinTech* [online]. [cit. 2021-6-15]. Dostupné z: <http://electrospintech.com/layerbylayer.html#.YMjRKHkzVaQ>
63. RIAHI, Daniel N. Modeling and computation of nonlinear rotating polymeric jets during forcespinning process. *International Journal of Non-Linear Mechanics*

- [online]. 2017, 92, 1-7 [cit. 2020-11-28]. ISSN 00207462. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijnonlinmec.2017.03.004
64. SARKAR, Kamal, Carlos GOMEZ, Steve ZAMBRANO, Michael RAMIREZ, Eugenio DE HOYOS, Horacio VASQUEZ a Karen LOZANO. Electrospinning to Forcespinning™. *Materials Today* [online]. 2010, 13(11), 12-14 [cit. 2020-11-28]. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(10)70199-
 65. SINGH, Subhash, February 2018. *Nanofiber Electrodes for Biosensors* [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-for-the-centrifugal-jet-spinning-system_fig6_323365059
 66. ERFURT-BERGE, Cornelia a Regina RENNER. Recent Developments in Topical Wound Therapy: Impact of Antimicrobiological Changes and Rebalancing the Wound Milieu. *BioMed Research International* [online]. 2014, 2014, 1-8 [cit. 2020-11-29]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/819525
 67. ERFURT-BERGE, Cornelia a Regina RENNER. Chronic wounds – Recommendations for diagnostics and therapy. *Reviews in Vascular Medicine* [online]. 2015, 3(1), 5-9 [cit. 2020-11-29]. ISSN 22120211. Dostupné z: doi:10.1016/j.rvm.2015.05.001
 68. MCCALLON, Stanley K., Dorothy WEIR a John C. LANTIS. Optimizing Wound Bed Preparation With Collagenase Enzymatic Debridement. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists* [online]. 2014, 6(1-2), 14-23 [cit. 2020-11-29]. ISSN 22135103. Dostupné z: doi:10.1016/j.jccw.2015.08.003
 69. SLOVÁKOVÁ, M., V. KRATOCHVILOVÁ a R. METELKA, 2016. *CHITOSAN NANOFIBERS AND NANOPARTICLES FOR IMMOBILIZATION OF MICROBIAL COLLAGENASE: Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice* [online]. In: . [cit. 2021-6-16]. Dostupné z: <https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/67518/Slov%C3%A1kov%C3%A1%202016%20VI%C3%A1kna%20a%20textil.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 70. SARHEED, Omar, Asif AHMED, Douha SHOUQAIR a Joshua BOATENG. Antimicrobial Dressings for Improving Wound Healing. ALEXANDRESCU, Vlad

- Adrian, ed. Wound Healing - New insights into Ancient Challenges [online]. InTech, 2016, 2016-10-12 [cit. 2020-11-29]. ISBN 978-953-51-2678-2. Dostupné z: doi:10.5772/6396
71. *Ampicillin* [online]. [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00415>
 72. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 6249, Ampicillin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ampicillin>. Accessed Nov. 29, 2020.
 73. BARANOWSKA-KORCZYC, Anna, Alicja WAROWICKA, Małgorzata JASIURKOWSKA-DELAPOORTE, Bartosz GRZEŚKOWIAK, Marcin JAREK, Barbara M. MACIEJEWSKA, Justyna JURGA-STOPA a Stefan JURGA. Antimicrobial electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for gingival fibroblast growth. RSC Advances [online]. 2016, 6(24), 19647-19656 [cit. 2020-11-29]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C6RA02486F
 74. *Chemspider.com: D-(-)-ampicillin* [online]. [cit. 2021-6-16]. Dostupné z: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6013.html>
 75. PASCHOU, Stavroula A., Maria STAMOU, Hubert VUAGNAT, Nicholas TENTOLOURIS a Edward JUDE. Pain management of chronic wounds: Diabetic ulcers and beyond. Maturitas [online]. 2018, 117, 17-21 [cit. 2020-12-04]. ISSN 03785122. Dostupné z: doi:10.1016/j.maturitas.2018.08.013
 76. DrugBank: Ibuprofen [online], Updated on December 04, 2020 01:13. [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01050>
 77. ABUALHASAN, MURAD, MOHYEDDIN ASSALI a NIDAL JARADAT, 18 Nov 2014n. 1. Synthesis and formulation of ibuprofen pro-drugs for enhanced transdermal absorption. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences [online]. (Vol 7, 2, 352-354) [cit. 2020-11-28]. ISSN 0975-1491. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/270283844>
 78. Handbook: Non-Clinical Safety Testing: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR [online]. 2004 [cit. 2020-12-04]. Dostupné z:

<https://www.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/handbook-non-clinical-safety-testing/en/>

79. [60] Európsky systém regulácie liekov: Jednotný prístup k regulácii liekov v Európskej únii [online], 2016. [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/european-regulatory-system-medicines-european-medicines-agency-consistent-approach-medicines_sk.pdf
80. Spravodajský portál UK: *Lieky patria medzi najprísnejšie regulované produkty* [online], 2021. [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: https://uniba.sk/spravodajsky-portal/detail-aktuality/back_to_page/univerzita-komenskeho/article/lieky-patria-medzi-najprisnejsie-regulovane-produkty/
81. Štátna veterinárna potravinová správa Slovenskej republiky [online]. [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: https://www.svps.sk/dokumenty/zvierata/NZP_2016-04.pdf
82. Štátny ústav pre kontrolu liečiv [online]. [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: https://www.sukl.sk/buxus/docs/Klinicke_skusanie_liekov/Definie_najdolezitejsich_pojmov_KS_1_8_2016.pdf
83. CELL CULTURE BASICS HANDBOOK [online]. [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>
84. Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci [online]. [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: http://old.lf.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/hippokrat/Pracoviste/Histologie/03_Seznamte_se_bunecna_kultura.pdf
85. VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury: Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze* [online]. [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: <https://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
86. HERNDON, MD. a N. DAVID, 2018. *Total Burn Care , 5th Edition*. ISBN 978-0-323-47661-4.

87. WOJTOWICZ, Abigail M., Steve OLIVEIRA, Mark W. CARLSON, Agatha ZAWADZKA, Cecile F. ROUSSEAU a Dolores BAKSH. The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* [online]. 2014, **22**(2), 246-255 [cit. 2021-04-14]. ISSN 1067-1927. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12154
88. *Proteintech* [online]. [cit. 2021-6-16]. Dostupné z: <https://www.ptglab.com/support/cell-culture-protocol/introduction-to-cell-culture/>
89. UNCHERN, Surachai. *BASIC TECHNIQUES IN ANIMAL CELL CULTURE* [online]. [cit. 2021-6-16]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/266455722_BASIC_TECHNIQUES_IN_ANIMAL_CELL_CULTURE
90. [61] Eurolab: Testy cytotoxicity [online]. [cit. 2020-12-04]. Dostupné z: <https://www.eurolab.com.tr/cs/testler/medikal-tibbi-cihaz-performans-testleri/sitotoksikite-testleri>
91. [62] KUETE, V., O. KARAOSMANOĞLU a H. SIVAS. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. Medicinal Spices and Vegetables from Africa [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 271-297 [cit. 2020-11-28]. ISBN 9780128092866. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8
92. ZERBINATI, Nicola, Torello LOTTI, Damiano MONTICELLI, et al. In Vitro Evaluation of the Biosafety of Hyaluronic Acid PEG Cross-Linked with Micromolecules of Calcium Hydroxyapatite in Low Concentration. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* [online]. 2018, **6**(1), 15-19 [cit. 2021-6-16]. ISSN 1857-9655. Dostupné z: doi:10.3889/oamjms.2018.04
93. *Bioquochem: MTT Cell Proliferation Assay Kit B | KF03001B* [online]. [cit. 2021-6-16]. Dostupné z: <https://bioquochem.com/cellular-line/mtt-cell-proliferation-assay-kit/>
94. *LDH Cytotoxicity Assay Kit Colorimetric: Cepham Life Sciences, Inc.* [online]. [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://www.cephamlife.com/ldh-cytotoxicity-assay-kit-colorimetric-2/>

95. DUCHESNE, Constance, Nadira FRESCALINE, Jean-Jacques LATAILLADE a Antoine ROUSSEAU. Comparative Study between Direct and Indirect Treatment with Cold Atmospheric Plasma on In Vitro and In Vivo Models of Wound Healing. *Plasma Medicine* [online]. 2018, 8(4), 379-401 [cit. 2021-03-09]. ISSN 1947-5764. Dostupné z: doi:10.1615/PlasmaMed.2019028659
96. LIANG, Chun-Chi, Ann Y PARK a Jun-Lin GUAN. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* [online]. 2007, 2(2), 329-333 [cit. 2021-03-09]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2007.30
97. LIN, Hui-Hsien, Kelly L. ROBERTSON, Sujeewa S. LELLUPITIYAGE DON, Stephanie R. TAYLOR a Michelle E. FARKAS. Chemical modulation of circadian rhythms and assessment of cellular behavior via indirubin and derivatives. *Chemical Tools for Imaging, Manipulating, and Tracking Biological Systems: Diverse Methods for Optical Imaging and Conjugation* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 115-140 [cit. 2021-03-09]. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780128211519. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mie.2020.04.011
98. *Cytosmart: Wound healing assay - what, why and how* [online]. [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://cytosmart.com/resources/wound-healing-assay-what-why-how>
99. DZURICKÁ, Lucia. Příprava a charakterizace krytů ran [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-05-21]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123824>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Matoušková
100. *Protokoly k praktickým cvičením z fyziologie: fyzi-web.lf1.cuni.c* [online], 2014. In: . [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/21440223-1-uvod-do-cviceni-biologicka-data.html>

9. ZOZNAM SKRATIEK

AA	Kyselina octová
CC	Kontrola nárastu buniek (cell control)
DMEM	Dulbeccova modifikácia Eagleova média (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
ECM	Extracelulárna matrix
FBS	Fetálne bovinné sérum(Fetal Bovine Serum)
LbL	Layer-by-Layer
LDH	Laktát dehydrogenáza
MTT	3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAD ⁺	Oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
PBS	Fosfátový pufor (Phosphate Buffered Saline)
PC	Pozitívna kontrola buniek (positive control)
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
VC	Kontrola prostredia (vehicle control)
λ	Vlnová dĺžka