



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

PŘÍPRAVA BIOAKTIVNÍCH KRYTŮ RAN A TESTOVÁNÍ JEJICH INTERAKCE S LIDSKÝMI BUŇKAMI

PREPARATION OF BIOACTIVE WOUND DRESSINGS AND TESTING THEIR
INTERACTION WITH HUMAN CELLS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Agáta Bendová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1259/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Agáta Bendová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Příprava bioaktivních krytů ran a testování jejich interakce s lidskými buňkami

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) optimalizace přípravy nanovláknenných kožních krytů na bázi PHA
- 2) optimalizace přípravy nevláknenných krytů ran
- 3) příprava krytů ran s aktivní složkou
- 4) testování interakce připravených krytů s humánními buňkami

Termín odevzdání diplomové práce: 17.5.2019

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

Bc. Agáta Bendová
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Diplomová práce byla zaměřena na přípravu a optimalizaci přípravy kožních krytů ran z materiálů obohacených bioaktivními složkami. V práci byly připraveny nanovláknenné kryty na bázi polyhydroxybutyrátu a nevláknenné kryty z alginátu a chitosanu. Nanovláknna byla připravována metodami elektrospinning a forcespinning. Bioaktivní složky použité k funkcionalizaci připravených krytů byly rostlinné extrakty, klotrimazol, ampicilin, lysozym a proteolytické enzymy.

Teoretická část práce je zaměřena na popis využití nanovláknenných a nevláknenných materiálů v medicíně, charakterizaci materiálů na výrobu krytů a bioaktivních složek. Dále tato část popisuje metody použité pro přípravu a charakterizaci krytů.

V praktické části byly připraveny vodné a olejové extrakty z vybraných rostlin, které byly charakterizovány na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu. Pomocí metod elektrospinningu a forcespinningu byly připraveny nanovláknna na bázi PHB. Nanovláknna byla obohacena vybranými rostlinnými olejovými extrakty a klotrimazolem, u takto modifikovaných nanovlákn byla určena antioxidační aktivita, krátkodobá a dlouhodobá stabilita. Nevláknenné kryty byly připravovány z alginátu a chitosanu, tyto kryty bylo funkcionalizovány přidavkem vybraných vodných extraktů, ampicilinem, lysozymem, papainem, bromelainem a kolagenasou. U nevláknenných krytů byla stanovena antioxidační aktivita, krátkodobá stabilita a proteolytická aktivita. Připravené kryty byly testovány pro své antimikrobiální účinky na kulturách *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli*. Na závěr byly úspěšně připravené kryty s obsahem bioaktivních látek s antioxidačním i antimikrobiálním účinkem podrobeny testům bezpečnosti na humánní buňky. Stanovení bylo provedeno pomocí MTT testu cytotoxicity na lidských keratinocytech HaCaT.

Klíčová slova

kožní rány, kryty ran, polyhydroxybutyrát, alginát, chitosan, rostlinné extrakty, keratinocyty, cytotoxicita

Abstract

The thesis was focused on the preparation and optimization of the preparation of wound dressing from materials with bioactive ingredients. In this work were prepared nanofiber dressings based on polyhydroxybutyrate and non-fibrous dressings from alginate and chitosan. Nanofibers were prepared by electrospinning and forcespinning methods. The bioactive components, which were used to functionalize the prepared dressings, were plant extracts, clotrimazole, ampicillin, lysozyme, and proteolytic enzymes.

The theoretical part is focused on the description of the use of nanofibrous and non-fibrous materials in medicine, characterization of materials for the production of wound dressings and bioactive components. Furthermore, this section describes the methods used to prepare and characterize wound dressings.

In the practical part were prepared aqueous and oil extracts from selected plants. Extracts were characterized for polyphenols content and antioxidant activity. PHB-based nanofibers were prepared using electrospinning and forcepinning methods. Nanofibers were enriched with selected plant oil extracts and clotrimazol. Modified nanofibres were detemined for antioxidant activity, short-term and long-term stability. Non-fibrous wound dressings were prepared from alginate and chitosan. These dressings were functionalized by the addition of selected aqueous extracts, ampicillin, lysozyme, papain, bromelain, and collagenase. Non-fibrous wound dressings were determined for antioxidant activity, short-term stability and proteolytic activity. The prepared wound dressings were tested for their antimicrobial effects on cultures of *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. In conclusion, successfully prepared bioactive wound dressings with antioxidant and antimicrobial agents were tested for safety on human cells. The determination was performed using the MTT cytotoxicity test on human keratinocytes.

Keyword

skin wounds, wound dressing, polyhydroxybutyrate, alginate, chitosan, plant extracts, keratinocytes, cytotoxicity

BENDOVI, Agáta. *Příprava bioaktivních krytů ran a testování jejich interakce s lidskými buňkami* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113488>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Matoušková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Renatě Pavelkové a Ing. Natálii Burešové za cenné rady, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnovaly. V neposlední řadě patří velké poděkování mým kolegům z laboratoře, rodině a přátelům za trpělivost a optimismus.

OBSAH

1 Úvod.....	9
2 Teoretická část	10
2.1 Kůže	10
2.2 Prostup látek kůží.....	11
2.3 Léčba kožních ran	11
2.4 Kryty ran	11
2.5 Využití kožních krytů v medicíně	12
2.6 Polyhydroxybutyrát (PHB)	12
2.7 Metody přípravy PHB nanovláken	13
2.7.1 Elektrosinning.....	13
2.7.2 Forcespinning	13
2.8 Aplikace vláknenných krytů v medicíně.....	14
2.9 Alginát.....	14
2.10 Chitosan	15
2.11 Aplikace nevláknenných krytů v medicíně.....	15
2.12 Antimikrobiální a antioxidační látky	16
2.12.1 Polyfenolické látky	16
2.13 Vybrané rostliny.....	16
2.13.1 Kozinec blanitý	16
2.13.2 Muškátový oříšek.....	17
2.13.3 Pepř černý	17
2.13.4 Tymián obecný	17
2.13.5 Zázvor pravý	17
2.14 Klotrimazol	17
2.15 Ampicilin	18
2.16 Využití enzymů v medicíně	18
2.17 Lysozym.....	19
2.18 Papain a bromelain.....	19
2.19 Kolagenasa	19
2.20 Buněčné kultury	19
2.20.1 Keratinocyty	20
2.20.2 MTT test cytotoxicity	20
2.21 Mikrobiální kultury	21
2.21.1 Kultivace mikroorganismů	21
2.21.2 Použité mikroorganismy	21
2.22 Metody stanovení antimikrobiální aktivity	23
2.22.1 Difúzní metody	23
2.22.2 Diluční metody	23

2.22.3 Epsilon test.....	24
3 Cíle práce	25
4 Experimentální část	26
4.1 Použité přístroje a pomůcky.....	26
4.2 Použité chemikálie	26
4.2.1 Chemikálie použité ke spektrometrickým stanovením.....	26
4.2.2 Chemikálie použité na přípravu krytů	26
4.2.3 Chemikálie použité na kultivaci keratinocytů a MTT testy.....	27
4.2.4 Chemikálie na kultivaci mikroorganismů.....	27
4.3 Použité humánní buňky.....	27
4.4 Použité mikroorganismy	27
4.5 Použité byliny a koření	27
4.6 Příprava extraktů	27
4.6.1 Příprava vodných extraktů	27
4.6.2 Příprava olejových extraktů	28
4.7 Charakterizace extraktů.....	28
4.7.1 Stanovení celkové koncentrace polyfenolů	28
4.7.2 Stanovení antioxidační aktivity	28
4.8 Příprava nanovlákněných krytů na bázi PHB	29
4.8.1 Metoda elektrospinning	29
4.8.2 Metoda forcespinning	29
4.9 Příprava nevlákněných krytů	29
4.10 Charakterizace krytů	30
4.10.1 Stanovení antioxidační aktivity krytů	30
4.10.2 Stanovení krátkodobé stability krytů	30
4.10.3 Stanovení dlouhodobé stability nanovlákněných krytů.....	30
4.10.4 Stanovení proteolytické aktivity nevlákněných krytů	30
4.11 Kultivace mikroorganismů.....	31
4.12 Antimikrobiální testy	31
4.12.1 Bujónová diluční metoda	31
4.13 Kultivace keratinocytů	32
4.13.1 Výměna živného média	32
4.13.2 Pasážování	32
4.14 Stanovení růstové křivky keratinocytů	32
4.15 MTT test cytotoxicity.....	32
5 Výsledky a diskuze	34
5.1 Charakterizace rostlinných extraktů.....	34
5.1.1 Celkový obsah polyfenolů v extraktech.....	34
5.1.2 Antioxidační aktivita extraktů	35

5.2	Výtěžnost olejových extraktů.....	35
5.3	Příprava a optimalizace přípravy nanovlákných krytů.....	36
5.4	Charakterizace nanovláken s obsahem olejových extraktů.....	37
5.4.1	Antioxidační aktivita nanovláken	37
5.4.2	Krátkodobá stabilita nanovláken	39
5.4.4	Dlouhodobá stabilita nanovláken	42
5.5	Příprava a optimalizace přípravy nevlákných krytů.....	43
5.6	Charakterizace nevlákných krytů	44
5.6.1	Antioxidační aktivita nevlákných krytů s obsahem vodných extraktů	44
5.6.2	Krátkodobá stabilita nevlákných krytů s obsahem vodných extraktů	45
5.6.4	Proteolytická aktivita nevlákných krytů s obsahem enzymů.....	48
5.7	Antimikrobiální testy připravených krytů.....	49
5.7.1	Antimikrobiální aktivita vodných extraktů.....	49
5.7.2	Antimikrobiální aktivita krytů	52
5.8	Růstová křivka keratinocytů	57
5.9	MTT testy cytotoxicity.....	58
5.9.1	Stanovení cytotoxicity vodných extraktů	59
5.9.2	Stanovení cytotoxicity krytů.....	61
6	Závěr	66
7	Seznam použité literatury	68
8	Seznam použitých zkratk	75

1 ÚVOD

Současnost přináší dynamický rozvoj nanotechnologií, to je příčina prakticky denního kontaktu člověka s různými formami aplikací nanomateriálů. Nejedná se pouze o nanomateriály využívané ve farmacii či medicíně, ale uplatňují se i v kosmetice, zemědělství a řadě dalších průmyslových odvětví.

V poslední době se stala velmi aktuální problematika léčby kožních ran. Z celé řady důvodů, jako jsou vzrůstající rezistence mikroorganismů, špatná životospráva a generační choroby, dochází ke stále vyššímu výskytu chronických kožních ran, jejichž léčba je finančně i časově náročná. Kvůli rozšíření užívání širokospektrálních antibiotik došlo k nárůstu mikrobiální rezistence a řada používaných antibiotik ztrácí své účinky. To zapříčinilo zvýšený zájem o přírodní látky s antimikrobiálními účinky, které mohou napomoci při léčbě onemocnění. Mezi další výhody využívání rostlin patří i posilující vliv na lidský organismus, díky obsahu mnoha hodnotných živin. Proto jsou rostlinné bioaktivní látky čím dál častěji předmětem zkoumání moderních nanotechnologií.

Při léčbě ran nacházejí nanotechnologie široké uplatnění ve formě krytů ran, do kterých je možno zainkorporovat různé bioaktivní látky, příkladem jsou zmíněné rostlinné antimikrobiální složky, komerční léčiva, enzymy napomáhající čištění rány a další. Výzkum se zabývá celou řadou různých typů krytů. Podle typu kožní rány se navrhuje ideální materiály k její léčbě, oblíbené jsou nanovlákná nebo hydrogely. Cílem je podpora růstu tkáně a zabránění vzniku infekcí a jizev. Kryty jsou často používány za účelem ochrany rány před průnikem mikroorganismů, které mohou způsobovat infekci a tím komplikovat hojení rány. Z toho důvodu bývají nanovlákná obohacena složkami s širokospektrální antimikrobiální aktivitou. Kožní kryty mají za úkol udržovat vhodnou vlhkost rány, důležitým faktorem je i snadná aplikace a odstranění krytu. Další důležitou funkcí krytů na bázi nanomateriálů je postupné uvolňování aktivních složek.

Myšlenkou neustále se rozvíjejících nanotechnologií, zaměřených na problematiku léčby kožních ran, je spojení všech klíčových vlastností do jednoho modifikovaného nanomateriálu, který bude ideálním řešením na vzrůstající potřeby pacientů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

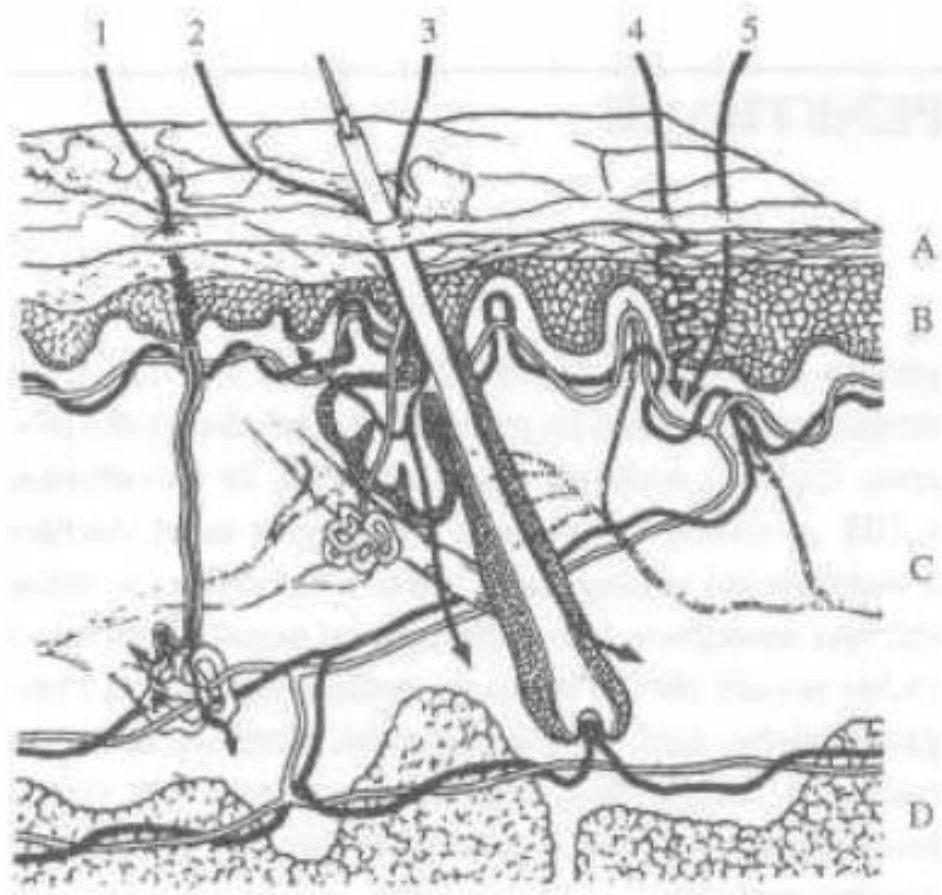
2.1 Kůže

Kůže je protektivní systém na povrchu těla, vytváří souvislý pokryv těla a plní řadu významných funkcí, jako je funkce ochranná, imunitní, receptorová, termoregulační a metabolická. Kůže tvoří ochranný štít zabráňující průniku škodlivému UV záření ze Slunce, průniku škodlivých patogenům a odpařování vody [1][2].

Vlastní kůže je složena ze dvou vrstev, pokožky (epidermis) a škáry (dermis), pod kůží se nachází vrstva podkožního vaziva (subcutis). Pokožka plní funkci primární chemicky inertní bariéry, má zejména statické mechanické funkce. Škára zajišťuje převážně dynamické vlastnosti kůže, pružnost a tažnost. V podkožním vazivu jsou pak lokalizovány kožní žlázy a přídatné kožní orgány, ty napomáhají udržovat a chránit kůži, hrají roli i při jejím hojení [1][2].

Kvůli neustálému poškozování povrchu kůže vlivy vnějšího prostředí je nutné, aby docházelo k nepřetržitému obnovování kůže. Náhradu poškozených vrstev kůže zabezpečují tzv. kmenové buňky epidermis, ty jsou schopné se neustále dělit, takže zajišťují generace buněk, které dále tvoří povrchové buňky pokožky. Funkcí kožních kmenových buněk není jen obnova kůže, ale i hojení při poškození kůže [1].

Základem hojení ran jsou tedy buněčné a molekulární mechanismy a pochopení těchto mechanismů je cesta, kterou je možné ovlivnit a urychlit procesy regenerace rány [2][1].



Obrázek 1: Schématický řez kůží; A – stratum corneum, B – živá epidermis, C – dermis, D – podkožní tuk, 1 – cesta potní žlázou, 2 – cesta mazovou žlázou, 3 – transfolikulární cesta, 4 – intercelulární cesta, 5 – transcelulární cesta [3]

2.2 Prostup látek kůží

Obečně látky prostupují do kůže procesem nazývaným transdermální absorpce. Jedná se o proces, který je možné rozdělit do tří kroků. Prvním krokem je proniknutí látky do konkrétní vrstvy epidermis (penetrace), druhým krokem je přesun látky mezi kožními vrstvami (permeace), třetím a finálním krokem tohoto procesu je vstup látky do cévního systému těla (resorpce) [4].

Proces absorpce je ovlivňován řadou faktorů, jako je stav kůže a velikost jejího povrchu, kde absorpce probíhá, množství transportované látky, rozpustnost ve vodě a obecný charakter aktivní látky a nosiče [4][5].

Dermis i epidermis mají hydrofilní charakter. Stratum corneum je ale hydrofobní, tento fakt dělá absorpci hydrofilních látek značně složitou. Z tohoto důvodu dochází k absorpci hydrofilních látek skrze vlasové folikuly či intracelulární cestou přes rohovou vrstvu, účinnost absorpce je však snížena. Přenos lipofilních látek je mnohem jednodušší, dochází k rozpuštění transportovaných látek v intercelulárních lipidech [4][5].

2.3 Léčba kožních ran

Kožní rány mohou být způsobeny řadou zranění, například mechanickým, chemickým, biologickým nebo tepelným. Je možné rány klasifikovat v závislosti na jejich trvání na rány akutní a chronické. Akutní rány jsou povrchní a běžně se vyléčí do 3 týdnů. Chronické rány se obvykle vyskytují jako komplikace chorobného procesu a přetrvávají po dobu minimálně 3 měsíců. Hojení kožních ran je komplexní proces, během kterého se kůže snaží o nápravu po zranění. Obečně můžeme proces obnovy rány rozdělit do tří základních fází – zánět, proliferace a zrání [6].

Při zánětlivé fázi dochází k uvolňování cytokinů a chemokinů, které způsobují migraci neutrofilů, makrofágů a lymfocytů do rány. Tyto buňky následně vylučují růstové faktory a dochází k tvorbě prozatímní matrice ze sousedních epidermálních a dermálních buněk. Proliferační fáze se vyznačuje tvorbou granulační tkáně, která se vyznačuje zvýšenou úrovní proliferace keratinocytů a fibroblastů, epidermální migrací buněk a syntézou extracelulární matrice. To má za následek reepitelizaci a angiogenezi. Konečná fáze hojení ran zahrnuje zrání rány a remodelování extracelulární matrice. Fáze zrání je zakončena tvorbou acelulární jizvy [6].

2.4 Kryty ran

Z důvodů kritické role kůže pro život člověka a kvůli nárůstu výskytu chronických kožních ran dochází k dynamickému rozvoji tkáňového inženýrství, které se zaměřuje na potenciální alternativy, jež je možné využít při hojení ran [7][8].

Mezi ideální vlastnosti kožního krytu bezpochyby patří vytvoření vhodného vlhkého prostředí na povrchu rány, odstraňování odumřelých buněk, zabezpečení výměny plynů a tvoření bariéry proti mikroorganismům. Tradiční kryty ran jsou na bázi bavlněných vat či vláken, při jejichž odstraňování může docházet k poškození vytvořené tkáně [8][9].

To vedlo ke zvýšenému zájmu o biodegradabilní kryty ran, jejichž základem jsou bioaktivní materiály, které napomáhají hojení, podporují ukládání extracelulárního matrixu. Doposud byla jako bioaktivní kryty ran aplikována celé řada přírodních i syntetických biomateriálů. K většímu využívání přírodních polymerů vedla jejich biokompatibilita, nízká imunogenicita a

toxicita, minimum alergických reakcí a obecně vyšší klinická funkčnost než vykazují syntetické polymery [10].

Klíčovým faktorem pro tvorbu účinného kožního krytu je výběr vhodného nosiče. Různé druhy aktivních látek mají specifické požadavky na nosič, do kterého jsou imobilizovány. Zvolený nosič musí splňovat jistá kritéria. Je nutné používat materiály, které nejsou toxické, mají vhodnou mechanickou pevnost a stabilizují obsažené aktivní látky biologicky, chemicky i fyzikálně během manipulace a zpracování. Podle konkrétního uplatnění se dále zohledňují další kritéria jako je biodegradabilita, rozpustnost, porozita, míra bobtnání, obsah vhodných funkčních skupin a cena materiálu [11].

2.5 Využití kožních krytů v medicíně

Již v roce 2001 byl celosvětový trh zaměřený na péči o rány odhadován na necelých 13 500 milionů USD s roční mírou růst 15 %, do tohoto odhadu byly zahrnuty chirurgické zákroky, péče o chronické rány, otlaky, vředy nohou a popáleniny. Tato analýza poukazuje i na postupný posun péče o rány směrem k pokročilým obvazům [12].

Ve farmacii je kryty ran možné rozdělit na kryty pasivní, interaktivní a bioaktivní, dle povahy jejich působení. Kryty pasivní jsou například tradiční gázy, tylové obvazy. Mezi interaktivní kryty se řadí polymerní fólie a formy, většinou transparentní, propustné pro vodní páru a kyslík, nepropustné pro bakterie. Bioaktivní kryty ran mají schopnost dodávat látky, které jsou aktivní při procesu hojení ran, používají se materiály jako proteoglykany, kolagen, nekolagenní proteiny, alginát či chitosan [12].

Kvůli velkému a rychlému rozvoji nanotechnologií dochází k i stále častějšímu zkoumání nanovláken. Velmi populární metodou se stává elektrospinning. Tento zájem je zapříčiněn celou škálou zajímavých vlastností těchto vláken. Vlákná se vyznačují nízkou hmotností s vysokým poměrem povrch/objem, nastavitelnou morfologií, kontrolovatelnou funkcionalizací a nastavitelným průměrem vláken. Proto je možné vlákna využívat jako materiály pro vysoce efektivní filtrace, jako kryty ran nebo jako scaffoldy v tkáňovém inženýrství [13][14].

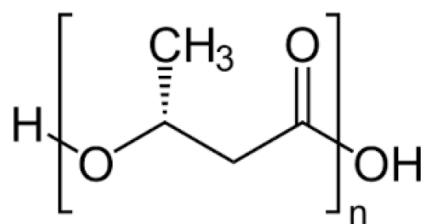
Nanovláknenné matrice mohou sloužit jako nosiče pro buňky, léky, proteiny, malé molekuly nebo jiné terapeutické látky. Dále je možné do elektrospinnových polymerů začlenit růstové faktory a tím zlepšit regeneraci poškozené lidské kůže [15].

Pro přípravu krytů se využívá řada polymerů, konkrétně PHB, želatina, chitosan, polyuretan, alginát, polykaprolakton, polyvinylalkohol, karboxymethylcelulóza a kyselina polymléčná [16].

2.6 Polyhydroxybutyrát (PHB)

Poly-(3-hydroxybutyrát) je polyester, který je inertní, biodegradabilní a biokompatibilní, má termoplastické vlastnosti. PHB je produkován a intracelulárně akumulován jako rezervní zdroj energie a uhlíku. Existuje řada bakterií, které jsou schopny PHB produkovat, jako je *Cupriavidus necator*, několik druhů *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* a také rekombinantní *Escherichia coli*. Avšak vyrábí se i syntetickou cestou [17].

Od svého objevení je PHB používáno v chemickém průmyslu jako náhrada polyethylenu a polypropylenu. Na základě jeho biokompatibility a biodegradability byl navržen pro aplikace ve farmaceutických oborech, například při konstrukci umělých orgánů, pro drug delivery systémy a kryty ran [17].



Obrázek 2: Struktura PHB [17]

2.7 Metody přípravy PHB nanovláken

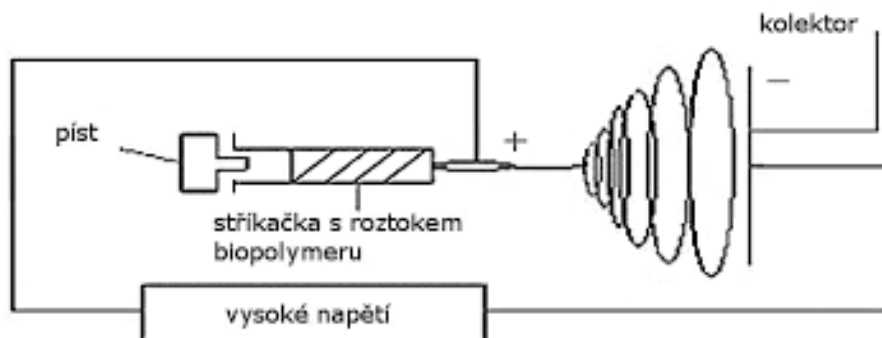
Existuje celá řada metod, pomocí kterých je možné připravovat nanovlákná na bázi PHB. Ty nejčastěji využívané jsou metody elektrospinningu a forcespinningu.

2.7.1 Elektrospinning

Elektrospinning je technika známá již od minulého století. Jedná se o metodu, která se jeví jako nejvhodnější pro získání polymerních vláken s průměrem v mikrometrickém a nanometrickém rozsahu [14].

Jedná se o výrobní proces, při kterém dochází k tvorbě jemných polymerních vláken z kapaliny za použití elektrostatische síly. Systém je obvykle složený ze tří částí – zdroje vysokého napětí, stříkačky s jehlou a uzemněného kovového kolektoru [18].

Po zapnutí zdroje vysokého napětí se mezi jehlou a kolektorem vytváří elektrický potenciál. Ze začátku tvoří roztok polymeru na špičce jehly hemisféru kvůli povrchovému napětí. Z důvodu aplikace elektrického potenciálu dochází k prodlužování hemisféry a vytváří se Taylorův kužel. Zvýšení elektrického potenciálu způsobí překonání povrchového napětí a tvoří se polymerní proud směrem ke kolektoru. Z proudu polymeru se odpařuje rozpouštědlo a tím se vlákno zakoncentrovává. V tuhém stavu se polymerní vlákna shromažďují na kolektoru [18].



Obrázek 3: Schéma elektrospinningu, převzato a upraveno z [18]

2.7.2 Forcespinning

V posledních letech dochází k rozvoji experimentálních výzkumů vedoucích k vývoji a použití metody forcespinningu. Forcespinning je technika rotačního zvláknování, která k výrobě vláken velikostí mikro a nano používá vnější odstředivou sílu. Tato metoda může vytvářet vlákna z různých typů tavenin a roztoků, tím umožňuje výrobu nanovláken z mnoha materiálů s důležitými technologickými aplikacemi. Metoda je použitelná k výrobě vláken z polymerů, kompozitů, kovů, keramiky. Její další velkou výhodou je vysoká rychlost výroby [19].

2.8 Aplikace vláknenných krytů v medicíně

Rozvoj technologií zaměřených na nanovláknna zpřístupnil nové možnosti v celé řadě průmyslových odvětví a oborů. Příkladem je uplatnění v kosmetickém průmyslu, kde jsou nanovláknna využívána jako součást pleťových masek, které fungují na podobném principu jako krycí vrstvy používané proti kožním ranám a jizvám. Dále se právě nanovláknna na bázi biopolymerů v lékařském odvětví používají jako krycí materiály při léčbě akutních i chronických povrchových kožních ran [20][21].

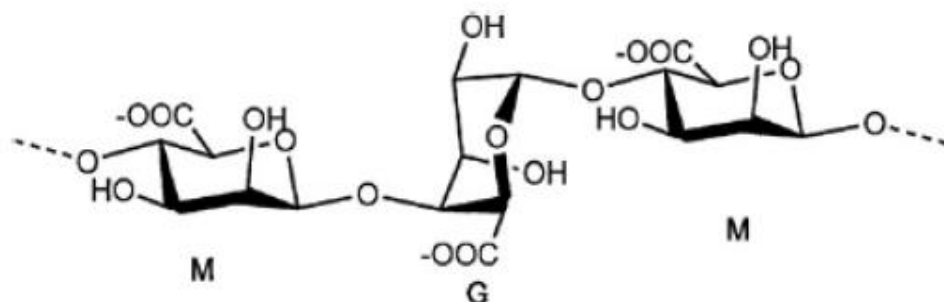
Stále častější využívání nanovláken v medicíně je způsobeno kladnými vlastnosti nanovláknenných materiálů, jako je jejich pružnost kopírující reliéf rány, podpora hojení, simulace mimobuněčné hmoty. Z těchto důvodů jsou tvořeny a testovány nanovláknenné kryty s obsahem antibiotik, které napomáhají rychlejšímu hojení ran. Nanovláknenná síť také účinně zabraňuje průniku mikroorganismů do rány díky své hustotě zesílení. Další aplikací v medicíně je použití nanovláken jako scaffold, který nahradí chybějící matrix při kultivaci nové tkáně. Výzkum na Technické univerzitě v Liberci se zabývá aplikací nanovláken ve formě umělé cévní náhrady. Tato umělá céva je během operace vložena do poškozeného místa, kde plní funkci dočasné sítě k zachytávání buněk a tvorbě nové cévy. Umělá céva se po splnění své funkce degraduje a vstřebá do těla. Nanovláknna se testují také z hlediska vývoje nových obvazových materiálů s kontrolovaným uvolňováním léčivých složek nebo možnosti využití na drenáž, k odvádění tekutin z ran [20].

Mezi další směry, ve kterých jsou nanovláknna zkoumána pro své budoucí uplatnění, je například využití vláknenných biomateriálů pro zubní implantáty, náhrady kostí, kostní cement, umělé srdeční chlopně, vaskulární štěpy, při kosmetických operacích. Tkáňové inženýrství se dále zabývá i uplatněním nanovláken ve formě umělých kožních implantátů, umělých cév, chrupavek, kostí i nervů [22].

2.9 Alginát

Alginát je lineární polysacharid, jenž se skládá z β -D-mannuronové kyseliny a α -L-guluronové kyseliny. Alginát je biosyntetizován hnědými řasami a některými druhy bakterií. Pro komerční účely se alginát získává z hnědých řas rodu *Ascophyllum*, *Macrocystis* a *Laminaria*. Mezi bakteriální rody, které jsou schopné alginát syntetizovat, patří například *Azotobacter* nebo *Pseudomonas*. Rozdíl mezi bakteriálním a rostlinným alginátem je v počtu a uspořádání jednotlivých kyselinových zbytků [23].

Alginát vykazuje řadu vlastností, díky kterým nachází velké uplatnění v průmyslovém odvětví. Do výčtu jeho kladných vlastností patří biodegradovatelnost, biokompatibilita, rozpustnost ve vodě, schopnost tvořit hydrogely bez přídavku toxických rozpouštědel, jedná se o přirozené hemostatikum. Alginátové gely se v biomedicíně využívají jako vlhké kryty ran, které napomáhají procesu hojení díky tvorbě vhodného vlhkého prostředí a možnosti inkorporace a následného řízeného uvolňování léčivých látek [11][23][24].

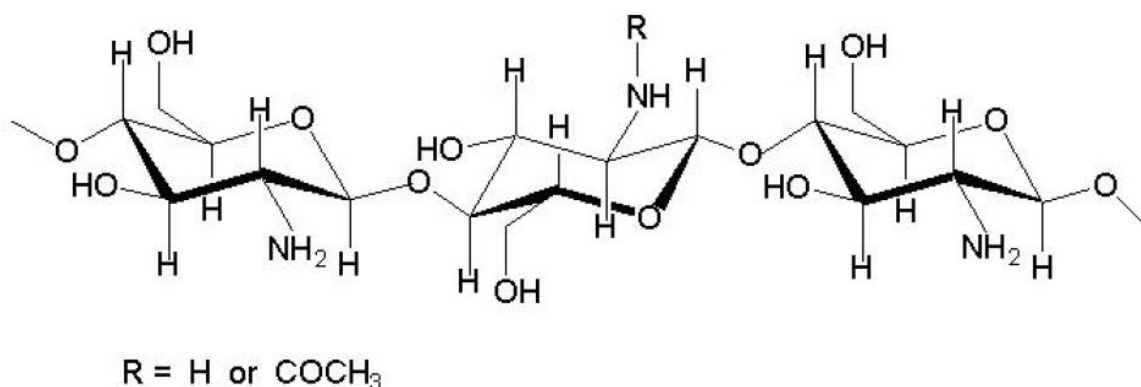


Obrázek 4: Struktura alginátu [23]

2.10 Chitosan

Chitosan je nejběžněji získáván alkalickou deacetylací chitinu, který se v přírodě hojně vyskytuje, například je součástí skeletu korýšů či křídel hmyzu. Chitosan je v přírodě zastoupen méně, a to u některých rodů hub, například *Mucor* a *Aspergillus* [25].

Tento polysacharidový polymer (poly-D-glukosamin) má široké uplatnění v biomedicínských aplikacích. Chitosan má antimikrobiální účinky proti některým grampozitivním i gramnegativním bakteriím, je biokompatibilní, biodegradovatelný, netoxický, tvoří gely. Proto je vhodný pro tvorbu transportních systémů s cíleným uvolňováním terapeutických látek, které je možné zainkorporovat do tenkých filmů nebo enkapsulovat do částic [25].



Obrázek 5: Struktura chitosanu [26]

2.11 Aplikace nevlákněných krytů v medicíně

Nevlákněné materiály na bázi hydrogelů jsou velmi populární, a to díky jejich jedinečným vlastnostem, vysoké vaznosti vody, měkkosti, pružnosti a biokompatibilitě. Přírodní i syntetické hydrofilní polymery mají schopnost fyzikálního nebo chemického zesílení, tím se vytváří hydrogely, jejichž podobnost s živou tkání otevírá řadu možností pro aplikaci v medicíně. V současnosti se hydrogely používají pro výrobu kontaktních čoček, hygienických výrobků, scaffoldů v tkáňovém inženýrství, systému pro dodávání léčiv a krytů ran [27].

Hydrogelové kryty ran jsou velmi moderním tématem, které prochází neustálým vývojem. Používané materiály na přípravu takovýchto krytů jsou například modifikovaná karboxymethylcelulóza, polyethylenglykol, propylenglykol, chitosan nebo alginát. Pro drug delivery systémy jsou zkoumány materiály jako polyvinylalkohol, keratin, beta-glukan a další [27].

2.12 Antimikrobiální a antioxidační látky

Aby mohly být látky nazývány antimikrobiální, musí vykazovat schopnost inhibice růstu mikroorganismů. Detailněji je možné antimikrobiální látky dělit podle typu jejich aktivity na látky antibakteriální, antimykotické, antiparazitické a antivirové. V rostlinách obecně tyto látky zprostředkovávají funkce stavební a strukturní, vytváří rostlinám ochranu před škůdci, infekcím, mechanickým poškozením, chladu a dalším stresovým faktorům. Z chemického hlediska jsou to nejčastěji fenolické látky, které jsou zodpovědné za barvu, vůni a chuť plodů a květů [28][29].

Antioxidační látky neboli antioxidanty jsou protektivní látky, které se účastní ochrany vůči volným radikálům tvořených při patogenních stavech. Často jsou antioxidanty diskutovány kvůli jejich údajným blahodárným účinkům na lidské zdraví. Biologické systémy vyžadují stálý příjem exogenních antioxidantů kvůli kontrole hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS). Mezi ROS patří volné radikály i neradikálové formy, jejichž množství prudce narůstá v patogenních podmínkách a vyvolává oxidační stres v biologických systémech. Oxidační stres je možné si představit jako nerovnováhu mezi množstvím přítomných ROS a schopností biologického systému detoxikovat reaktivní intermedie či opravit již vzniklé poškození. U člověka oxidační stres způsobuje stárnutí, rakovinu, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění [28][29][30].

Zdroji přírodních antimikrobiálních a antioxidačních látek jsou fenolické látky, ty se nacházejí v řadě rostlinných orgánů, v zelenině a ovoci [30].

2.12.1 Polyfenolické látky

Přírodní polyfenolické látky jsou, co se týče jejich struktury, značně rozmanitá skupina látek. Doposud bylo odhaleno více jak 8 000 druhů polyfenolických látek, z toho 4 000 druhů je řazeno do skupiny flavonoidů, což je nejvíce zkoumaná skupina polyfenolických látek pro svůj pozitivní vliv na zdraví člověka. Dalšími skupinami patřící mezi tyto látky jsou taniny, izoflavony, ligniny, katechiny atd. Řada přírodních polyfenolů má strukturu podobnou estrogenům, z toho důvodu se do skupiny polyfenolických látek řadí i fytoestrogeny [31].

Jelikož jsou polyfenolické látky v rostlinách prakticky všudypřítomné, jsou hojnou součástí lidské stravy, Mezi hlavní zdroje těchto látek jsou řazeny různé druhy ovoce a zeleniny, byliny, obiloviny, sója, ořechy, olivový olej, zelený čaj, káva, červené víno a pivo [31].

2.13 Vybrané rostliny

Používání rostlin kvůli jejich léčivým vlastnostem má dlouholetou tradici. Pomocí různých aromatických sloučenin, které jsou schopny syntetizovat, mohou pozitivně ovlivňovat jiné živé organismy. Řada rostlin má schopnost produkovat látky s antimikrobiálními a léčivými účinky, jež jim slouží jako ochrana proti mikroorganismům, hmyzu nebo býložravcům [32][33].

Za účelem zkoumání těchto vlastností bylo do této práce vybráno 5 bylin, které jsou blíže popsány v bodech 2.13.1 až 2.13.5.

2.13.1 Kozinec blanitý

Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus*) je rostlina pocházející z Číny, Koreje a Mongolska, kde je součástí tradičního léčitelství. Za nejvíce léčivou část rostliny je považován kořen, ale používá se i kvetoucí nať. Mezi kladné vlastnosti kozince jsou řazeny jeho antioxidační, antibakteriální, antivirové a protizánětlivé účinky. Často bývá kozinec označován

termínem adaptogen, toto označení si kozinec vysloužil díky schopnosti chránit organismus vůči fyzickému i duševnímu stresu. Dále jsou známy i močopudné účinky, schopnosti snížení krevního tlaku a zvýšení odolnosti a celkové vitality [34].

2.13.2 Muškátový oříšek

Muškátoý oříšek je semeno listnatého stromu muškátovníku vonného (*Myristica fragrans*), ten je pěstován v tropických oblastech, původem pochází z Indie. Zpracovávají se květy, plody i semena. Muškátový květ je v malých dávkách používán jako koření, dužina plodů se zpracovává na kompoty. Vysušená semena nebo olej ze semen je využíván k výrobě mýdel, mastí, voňavek a náplastí. Díky obsahu vitamínů, polyfenolických látek, alkaloidů, karotenoidů a terpenů, má antimikrobiální a antioxidační aktivitu. Uplatnění nachází v lékařství, potravinářství a kosmetice [34][35].

2.13.3 Pepř černý

Pepř černý je plod pepřovníku černého (*Piper nigrum*), původem je z Indie. Vcelku či v mleté formě je pepř jedno z nejvíce používaných a známých koření, díky kterému lze dodávat jídlu ostrost. Hlavními složkami esenciálního oleje obsaženého v pepři jsou aromatické sloučeniny, terpenové uhlovodíky a oxidované terpeny. Esenciální oleje izolované z černého pepře mají protizánětlivé a antioxidační účinky[36].

2.13.4 Tymián obecný

Tymián obecný (*Thymus vulgaris*) je trvalka původem ze Středomoří. Jeho nať se používá jako koření a terapeutikum. Tymián celkově působí fytoncidně a antimikrobiálně. V tymiánové silici jsou přítomny trísloviny, organické kyseliny, triterpeny, hořčiny, saponiny, flavonové glykosidy. Jako hlavní složky silice jsou uváděny thymol a karvakrol. Nejčastěji se tymiánové tinktury používají ve formě nálevů jako antiseptika při onemocnění horních cest dýchacích [34].

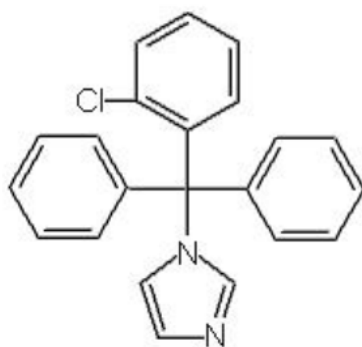
2.13.5 Zázvor pravý

Zázvor pravý (*Zingiber officinale*) je bylina původem z Asie, kde je nedílnou součástí jejich tradiční medicíny i kuchyně. Nejběžněji se oddenek používá jako koření, dále se používá při léčbě nachlazení a vykazuje antibakteriální a protizánětlivé účinky. Svou typickou výraznou a ostrou chuť získal díky obsahu aromatické látky gingerol [34].

Antimikrobiální účinky extraktů z oddenků zázvoru byly testovány v řadách studií na různých mikroorganismech. Největší antimikrobiální aktivita byla pozorována na bakteriích *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* [37].

2.14 Klotrimazol

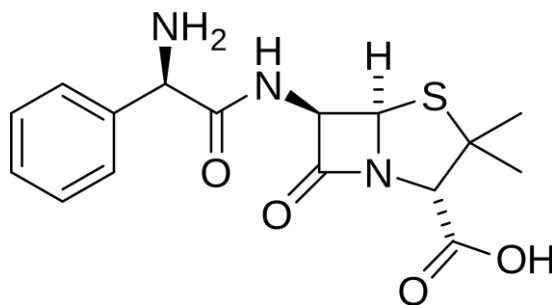
Klotrimazol patří do skupiny imidazolových derivátů, které mají schopnost inhibovat tvorbu základní složky buněčné membrány mikroorganismů, ergosterol. Jedná se účinné lokální širokospektrální antimykotikum, je účinné proti plísním, kvasinkám a dermatofytám. Vykazuje také účinnost i proti různým druhům bakterií. Dobrá účinnost klotrimazolu je způsobena prostupem látky kůži v dostatečné koncentraci. Výhodou jsou minimální nežádoucí účinky kvůli obtížnému prostupu látky do krevního řečiště [38].



Obrázek 6: Struktura klotrimazolu [38]

2.15 Ampicilin

Ampicilin, α -aminobenzylpenicilin, je semisyntetický penicilin, který vykazuje antimikrobiální aktivity proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Jeví se jako ideální léčivo na léčbu akutní zánětlivé meningitidy. Ampicilin má vysokou efektivitu proti *Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* a *Hemophilus influenzae*. Toto antibiotikum vykazuje minimum vedlejších účinků, při orálním nebo parenterálním podání je možné dosáhnout vhodné hladiny léčiva v krvi [39].



Obrázek 7: Struktura ampicilinu [40]

2.16 Využití enzymů v medicíně

Hlavním důvodem používání enzymů jako léčiv jsou jejich dvě unikátní vlastnosti, díky kterým se odlišují od jiných druhů léčiv. Jedná se o vlastnost specificky se vázat k substrátu a mnohonásobně přeměnit substrát v konečný produkt. Proto jsou enzymy významnou složkou v řadě farmaceutických přípravků [41].

Léčebné enzymy jsou využívány jako antimikrobiální činidla, trombolytika a onkolytika, složky vlhkých krytů ran a mastí, dále se používají při špatné produkci trávicích enzymů. Enzymatickou terapií je možné léčit onemocnění, která zapříčiňují deficit některých klíčových enzymů. V kombinaci s jinými léčivy se terapeutické enzymy využívají dvěma způsoby, buď podporují účinky léčivé složky, nebo snižují negativní vedlejší účinky léčiva [42].

Mezi zástupce terapeutických enzymů patří lysozym, ten je využíván pro své silné antimikrobiální účinky. Pro léčbu trombózy se používají enzymy streptokinasa, urokinasa a nattokinasa, které napomáhají rozpouštět krevní sraženiny a obnovovat průchodnost cév. Jako onkolytikum je zkoumán enzym arginindeaminasa, ten inhibuje tvorbu lidského melanomu. U léčby pacientů s deficitem vlastních trávicích enzymů jsou podávány přípravky s obsahem trávicích enzymů proteas, lipas a amylas. Při terapii kožních ran jsou využívány proteolytické

enzymy, které mají schopnost čistit ránu pomocí odstranění nekrotické tkáně a aktivace endogenních proteas, tím dochází ke snížení rizika infekce a zkrácení doby léčby rány. Dále jsou enzymy používány na substituční terapii [41][42].

2.17 Lysozym

Lysozym je přírodní enzym, který má baktericidní a bakteriostatické účinky založené na schopnosti katalyzovat hydrolýzu vazeb mezi N-acetylglukosaminem a N-acetylmuramovou kyselinou, což jsou složky buněčné stěny grampozitivních bakterií. Tento enzym je tvořen jednoduchým polypeptidickým řetězcem složeným ze 129 aminokyselin [43][44].

Pro své bakteriolytické vlastnosti je lysozym hojně používán ve farmaceutickém průmyslu jako součást léku na řadu infekčních onemocnění, využívá se jako pomocná látka do některých antibiotik a analgetika. V potravinářském průmyslu zastává funkci konzervantu [42][43][44].

2.18 Papain a bromelain

Papain a bromelain jsou rostlinné proteasy cysteinového typu. Obecně se cysteinové proteasy účastní řady aspektů v rostlinné fyziologii, například při vývoji či stárnutí. Dále se zapojují během řízení buněčné smrti, při klíčení semen regulují ukládání a odbourávání zásobních látek a nacházejí uplatnění i při různých reakcích na stres z prostředí [45].

Tyto enzymy mají velmi rozsáhlé spektrum léčebného uplatnění. Aplikují se do přípravků na hojení ran, kde pomáhají při odstraňování odumřelé tkáně, díky své vlastnosti hydrolyzovat vlákna kolagenu. Dále se používají jako trombolytika, protizánětlivá činidla a nacházejí své uplatnění i v kosmetice [45].

Papain je získáván z nezralých plodů papáje. Jedná se o globulární protein, jehož řetězec je složen z 212 aminokyselin. Na rozdíl od papainu není struktura bromelainu zcela popsána. Doposud je jeho struktura charakterizována jen z části, bromelain je popsán jako komplexní směs složená ze sacharidů, glykoproteinů, thiol-endopeptidas a dalších složek. Bromelain se izoluje z nezralých plodů a stonků ananasu jako surový vodný extrakt [46][47].

2.19 Kolagenasa

Přirozenou součástí prakticky všech tkání obratlovců je kolagen, v případě potřeby rozrušit tkáň se využívají proteolytické enzymy, konkrétně kolagenasy. Jedná se o enzymy, které mají schopnost štěpit peptidické vazby v molekule kolagenu [48][49].

V klinickém výzkumu se kolagenasy testují jako složka prostředků pro enzymaticky řízené čištění ran, pro izolaci kardiomyocytů, adipocytů, hepatocytů a dalších druhů tkáňových buněk. Kolagenasy pro průmyslové uplatnění jsou nejčastěji produkovány pomocí bakterie *Clostridium histolyticum*, což je bakterie schopná tvorby dvou typů kolagenas, které se od sebe liší počtem aminokyselin v peptidickém řetězci. Typ I je tvořen řetězcem 936 aminokyselin a typ II tvoří 1 021 aminokyselin [49][50].

2.20 Buněčné kultury

Systémy buněčných kultur jsou moderní metody využívané v tkáňovém inženýrství, buněčné biologii, biochemii, při vývoji léčiv a farmakokinetických studiích a to z důvodu imitace stavu *in vivo*. Buněčné kultury jsou používány ve výzkumu i ve výrobě, kde slouží převážně jako zdroj materiálu. Nepostradatelné jsou hybridomové kultury, ty slouží k výrobě monoklonálních

protilátek, jiné buněčné kultury jsou používány na výrobu různých bílkovinných molekul či peptidů [51][52].

Výhodou použití buněčných kultur v porovnání s využitím izolovaných tkání, orgánů nebo laboratorních zvířat je zásadní. Experimentální práce se provádí na jediném, dobře charakterizovaném typu buněk, výsledky nejsou ovlivňovány interakcemi s jinými buněčnými populacemi, tkáněmi nebo orgány. Velké množství buněčných linií je možno snadno kultivovat, v krátkém časovém období lze vypěstovat poměrně velké množství homogenního a konkrétně definovaného buněčného materiálu. Tímto způsobem dochází k omezení etických problémů spojených s experimentální prací se zvířaty [52].

Mezi nevýhody buněčných kultur patří řada omezení, kvůli kterým je práce s nimi limitována. Jedno ze zmíněných omezení je i fakt, že kultivované buňky nerostou ve fyziologických podmínkách, nýbrž jsou kultivovány v atmosféře s vyšším tlakem kyslíku a v umělém kultivačním médiu, které svým složením přesně neodpovídá složení vnitřního prostředí v organismu. Pěstovaným buňkám tedy chybí obvyklý tkáňový kontext [52].

Práce s buněčnými kulturami je ve srovnání s jinými laboratorními technikami náročnější. V buněčných laboratořích je nutné používat jednorázový sterilní materiál, aby se zamezilo přístupu i běžným kontaminantům, jako jsou některé přechodné kovy, endotoxiny a další organickým molekulám. Obecně je práce s buněčnými kulturami zdlouhavá, náročná na pozornost a soustředění a poměrně drahá [52].

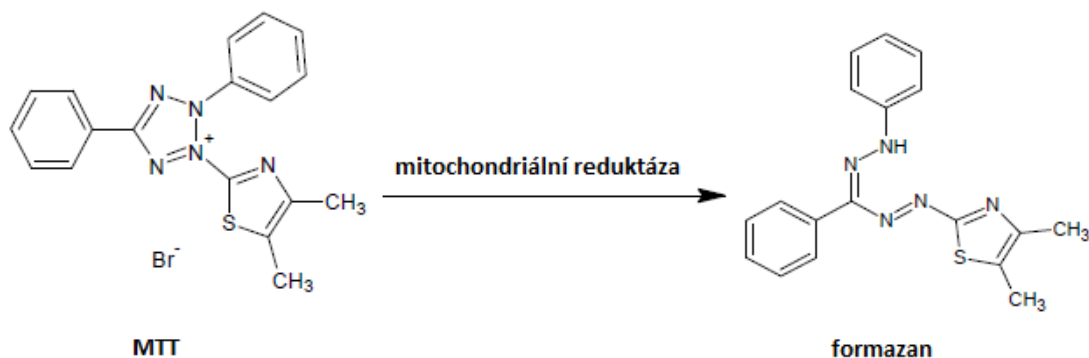
2.20.1 Keratinocyty

Keratinocyty tvoří hlavní složku epidermis, dále jsou v epidermis přítomny melanocyty, Merkelovy buňky a Langerhansovy ostrůvky. Kožní bariéra se vytváří procesem nazvaným keratinizace. Nejsvrchnější část epidermis (stratum corneum) se skládá z keratinocytů ve finální fázi diferenciaci (korneocytů) a lipidické matrix, tato vrstva udává bariérovou funkci kůže. Keratinocyty se účastní zánětlivých procesů syntézou protizánětlivých cytokinů, což vede k nahromadění leukocytů. Dále jsou keratinocyty důležité při hojení kožních ran, jejich migrací a proliferací dochází k reepitelizaci poškozených míst [53].

2.20.2 MTT test cytotoxicity

Testování *in vitro* je používanou strategií k určení toxicity nanočástic, nanovláken a celé řady dalších látek, jedná se o možnou alternativu k testům na zvířatech, které jsou finančně i časově nákladné [54].

MTT test cytotoxicity je nejvíce využívanou metodou, která je založena na kolorimetrickém určení počtu životaschopných buněk. Hlavním principem tohoto testu je enzymatická redukce žlutého MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromidu) na fialové krystaly formazanu, ten je nerozpustný ve vodném kultivačním prostředí buněk. Redukce MTT je způsobena aktivitou buněčných NAD(P)H oxidoreduktas, ty se nachází hlavně v cytoplazmě a plazmatické membráně. Zmíněné redukce jsou schopny jen živé buňky, a proto barevná změna znázorňuje míru buněčné metabolické kapacity. Na závěr testu se přidává SDS (dodecylsírán sodný), v němž se formazonové krystalky rozpustí a vytvoří se čirý roztok, které se spektrofotometricky stanoví [54][55].



Obrázek 8: Princip MTT testu cytotoxicity, převzato a upraveno z [56]

2.21 Mikrobiální kultury

Mikrobiální svět je největší neprozkoumaná zásobárna biodiverzity na Zemi, proto je tato oblast pod intenzivním výzkumem. Zájem o objevování mikrobiální rozmanitosti je motivován celou řadou funkcí, které zahrnují environmentální detoxifikaci a koloběh živin. Kolekce mikrobiálních kultur obsahuje více než milion různých kmenů [57].

Pomocí opatrné selekce mikroorganismů a důmyslného navržení testů je klíčovým krokem pro rozvoj nových technologií, jako je efektivní využití mikroorganismů pro udržitelné zemědělství, ochranu environmentálního prostředí, lidskou a veterinární medicínu. Mezi konkrétní aplikace patří ochrana rostlinného zdraví a produkce plodin, recyklace zemědělského a průmyslového odpadu, bioremediace půdy a vody od organických a anorganických nečistot. Mikrobiální kultury se používají při výrobě biosenzorů, syntéze nanomateriálů, antibiotik, probiotik a jiných mikrobiálních produktů. Dále se využívají v enzymologii, manipulaci s geny, bioproceních technologiích a bioinformatice [57][58].

2.21.1 Kultivace mikroorganismů

Pěstování, jinak řečeno kultivace, je základní úkon mikrobiologické práce. Mezi faktory určující správnost kultivace patří volba vhodného živného média, teploty, přístupu vzduchu dle požadavků kultivovaných mikroorganismů. Kultivační média se dělí podle skupenství (pevná, polotuhá, tekutá), obsahu živin (základní, obohacená, limitovaná), původu (přírodní, syntetická, umělá) a účelu použití (univerzální, selektivní, diagnostická, výběrová-diagnostická) [59].

Živných médií je spousta druhů, společným znakem je všeobecné složení, konkrétně zdroj uhlíku, dusíku a minerálních látek, selektivního činidla, vody, ztužovačů (želatina, agar) a látky upravující pH. Kapalná média jsou kultivována v termostátované třepačce, díky třepání je zajištěn správný přísun kyslíku k pěstovanému mikroorganismu. Kultivace na tuhých médiích probíhá v termostátu s výměnou vzduchu, Petriho misky jsou v něm uchovávány dnem vzhůru z důvodu kondenzace vody. Celá kultivace probíhá několik dní [59].

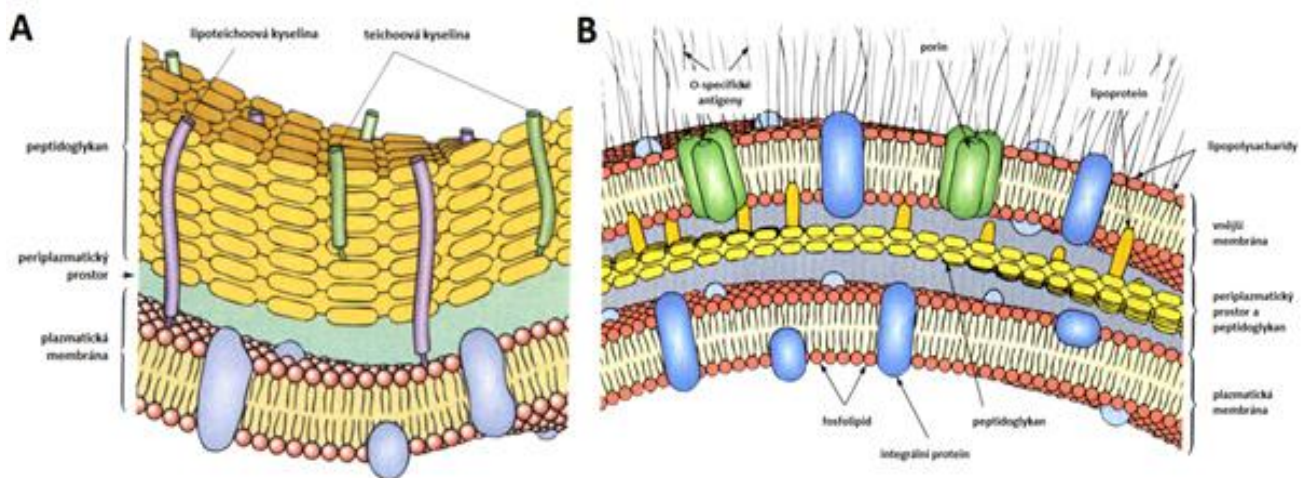
2.21.2 Použité mikroorganismy

V této práci byly mikroorganismy využity pro určení antimikrobiální aktivity připravených krytů. Zvoleny byly 4 druhy bakterií, zástupci grampozitivních i gramnegativních druhů. Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické mikroorganismy s rozmanitou morfológií a velikostí v řádech mikrometrů. Charakteristickým rysem je jejich specifický metabolismus, který jim

umožňuje rychlé množení a růst. Nejvíce zastoupeny jsou bakterie tyčinkového tvaru, dále existují kulovité (koky) a vláknité bakterie. Liší se mezi sebou způsoby získání energie a zdrojem uhlíku. Podle těchto kritérií se bakterie dělí na fotoheterotrofní, fotoautotrofní, chemoheterotrofní a chemoautotrofní [60][61][62].

Buněčná stěna bakterií má velký význam, díky řadě svých funkcí, jako je ochrana před chemickým a mechanickým poškozením, vysycháním, udržování osmotického tlaku a tvaru buňky. Hlavní stavební složkou buněčné stěny je peptidoglykan (murein), dále jsou ve stěně přítomny lipidy, proteiny, polysacharidy a další látky. Podle struktury buněčné stěny se bakterie rozdělují do dvou skupin, a to na grampozitivní a gramnegativní bakterie. K rozlišení skupin se používá Gramovo diagnostické barvení [60][61][62].

Stěna grampozitivních bakterií je vytvořena silnou vrstvou peptidoglykanů, která je vyplněna teichoovou kyselinou. Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu tvořenou z tenké vrstvy peptidoglykanů, neobsahuje teichoovou kyselinu, vnější membrána obsahuje strukturní a enzymové proteiny, lipoproteiny a fosfolipidy [63].



Obrázek 9: Struktura buněčné stěny grampozitivní (A) a gramnegativní (B) bakterie [64]

2.21.2.1 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus je grampozitivní, aerobní bakterie z čeledě Micrococcaceae. Buňky této bakterie mají kulovitý tvar, jejich velikost je od 1 do 1,8 μm . Jedná se o rozšířenou bakterii, která se vyskytuje v půdě, ve vzduchu i vodě. Je možné je najít i na kůži savců včetně člověka, mohou být přítomny i na sliznicích ústní či v horních cestách dýchacích. U jedinců s oslabeným imunitním systémem může být *Micrococcus luteus* původcem různých infekcí, například meningitidy, pneumonie, endokarditidy [65].

2.21.2.2 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je zástupcem skupiny gramnegativních bakterií, dále se řadí mezi Enterobacteriaceae. Jedná se o fakultativně anaerobní bakterii, která má tyčinkovitý tvar a svůj pohyb zajišťuje pomocí peritrichálních bičičků. Tato bakterie má schopnost tvořit hydrolytické enzymy (lipasy, DNasy, gelatinasy) a také produkuje červený pigment prodigiosin. *Serratia marcescens* může u pacientů s oslabenou imunitou vyvolat infekce ran, dýchacího traktu, sepsi, endokarditidu, meningitidu [66][67].

2.21.2.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) se řadí do gramnegativní skupiny bakterií, je fakultativně anaerobní, má tvar tyčinky a též jako *Serratia marcescens* je řazena do čeledi Enterobacteriaceae. Výskyt této bakterie v jídle či vodě je indikátorem fekálního znečištění. Některé kmeny mohou produkovat toxiny, být patogenní a způsobovat střevní potíže, infekce močových cest a jiné infekce. Jiné kmeny *E.coli* však naopak žijí v symbióze v tlustém střevě a díky produkci vitamínu K jsou prospěšné, dále také znemožňují množení jiných patogenních bakterií ve střevě. V moderních biotechnologiích se tato bakterie používá i k molekulárnímu klonování [67] [68].

2.21.2.4 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis je grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie, jež tvoří nepravidelné shluky. Patří do čeledi Micrococcaceae. Jednotlivé kmeny se od sebe liší fermentací koagulasy a mannitolu. *Staphylococcus epidermidis* je koagulasa-negativní druh, který je dominantním patogenem mezi dalšími koagulasa-negativními staphylokoky. Tato bakterie je součástí normální kožní mikroflóry, z kůže snadno kontaminuje ovzduší a další osoby, část je příčinou nemocničních infekcí. *Staphylococcus epidermidis* způsobuje infekce chirurgických ran, močového traktu a je spojován s infekcemi z protetických prostředků [57].

2.22 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Mezi metody, které se používají k otestování antimikrobiální aktivity účinných látek, patří difúzní a diluční testy a Epsilon test. Během testování jsou klíčové vhodné kultivační podmínky a živné médium. Pomocí antimikrobiálních testů se určuje hodnota MIC, tzv. minimální inhibiční koncentrace. Jedná se o nejnižší koncentraci látky, která viditelně inhibuje růst testovaného mikroorganismu [69].

2.22.1 Difúzní metody

Tyto metody jsou založeny na principu difúze antimikrobiálních látek ze vzorku do jeho okolí. V této oblasti se vytváří klesající koncentrační gradient, který zabraňuje růstu mikroorganismů a tím se vytváří inhibiční zóny. Difúzní testování se provádí na pevných agarových plotnách a jedná se o jednoduché a rychlé měření antimikrobiální aktivity. Difúzní metody se dělí na diskovou a jamkovou agarovou metodu [69].

Difúzní disková metoda aplikuje testované vzorku na agarové médium nasáté do papírových disků, uvolňování vody z media způsobuje difúzi antimikrobiální látky v disku a kolem něj se tvoří koncentrační gradient a inhibiční zóna, kde dochází k inhibici růstu mikroorganismů [69].

Difúzní jamková metoda má shodný princip jako metoda disková. Mezi sebou se liší v aplikaci antimikrobiální látky, při této metodě se do agarových ploten hloubí jamky, do kterých se poté testované látky aplikují a opět se pozorují vzniklé inhibiční zóny [69].

2.22.2 Diluční metody

Diluční metody se používají pro určení a kvantifikaci hodnoty MIC. Principem těchto metod je vyhodnocení nepřítomnosti růstu mikroorganismů. Výstupem jsou přesné informace o účincích aktivních látek. Měření je možné provádět v tekutých či pevných médiích, je nutné do kultivačních médií přidávat přesné množství analyzované látky. Tato metoda se tedy dělí na bujónovou a agarovou metodu [69].

Diluční bujónová metoda je nejčastěji prováděna v mikrotitrační destičkách, do kterých je nadávkováno médium s klesající koncentrací antimikrobiální látky. Po uplynutí daného časového intervalu (např. 24 hodin) se vyhodnotí minimální inhibiční koncentrace látky pomocí měření absorbance, průtokové cytometrie, turbidimetricky či vizuálně. Vzorek, ve kterém nedošlo ke vzniku zákalu či sedimentu, vykazuje nejvyšší antimikrobiální aktivitu [69].

Diluční agarová metoda se provádí na agarovém médiu, do kterého jsou aplikovány testované antimikrobiální látky o různé koncentraci. Tato metoda slouží jako srovnávací metoda [69].

2.22.3 Epsilon test

Epsilon test (E-test) je technika spojující diluční a difúzní metody. Touto metodou je možné konkrétně určit hodnotu MIC. Na pevný agar se zaočkovanou mikrobiální kulturou je aplikován E-testový proužek, který na svých krajích tvoří koncentrační gradient testované látky. Po proběhnutí inkubace dochází ke vzniku inhibičních zón elipsového tvaru. MIC se určuje v bodě, ve kterém protíná okraj testovaného proužku okraj vzniklé inhibiční zóny [70].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je příprava vlákných a nevlákných krytů ran s obsahem bioaktivních látek, například proteolytické enzymy, léčiva a rostlinné extrakty. U připravených krytů jsou testovány jejich interakce s humánními buňkami a jsou zkoumány pro své antimikrobiální účinky. V rámci této práce byly plněny následující úkoly:

1. optimalizace přípravy nanovlákných kožních krytů na bázi PHA
2. optimalizace přípravy nevlákných krytů ran
3. příprava krytů ran s aktivní složkou
4. testování interakce připravených krytů s humánními buňkami

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Boeco (DE)
- Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (DE)
- Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
- Centrifuga, Sartorius, Biotech (ČR)
- Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (ČR)
- ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (DE)
- Ultrazvuková lázeň PS02000 (ČR)
- Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (UK)
- IMPLEN Nanophotometer UV-VIS
- Vakuová rotační odparka Werke RV06-ML: IKA (DE)
- Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)
- Biohazard box, model Airstream, třída II -ESCO, Biotech (ČR)
- Automatické pipety v různém rozsahu objemu – Discovery (DE) a Biohit (DE)
- Soxtherm, SOX 412, Gerhardt (DE)
- Exsikátor, Kavalier (ČR)
- Rotační zvlákňovací přístroj
- CellCulture CO₂ Inkubátor, ESCO (SRN)
- Inverzní biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv (ČR)

4.2 Použité chemikálie

4.2.1 Chemikálie použité ke spektrometrickým stanovením

- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (ČR)
- Uhličitan sodný, Lach-Ner (ČR)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DE)
- ABTS - 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonoová kyselina), Sigma-Aldrich (DE)
- Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (SRN)
- Trolox, Sigma-Aldrich (SRN)
- Ethanol pro UV/VIS 99%, Lach-Ner (ČR)
- Hydroxid sodný, Lach-Ner (ČR)
- Azoalbumin, Sigma-Aldrich (UK)
- Kyselina trichloroctová, Lach-Ner (ČR)

4.2.2 Chemikálie použité na přípravu krytů

- Hexan, Lach-Ner (ČR)
- Chloroform, Lach-Ner (ČR)
- Polyhydroxybutyrát, Biomer (SRN)
- Tetraethylamonium bromide, Sigma Aldrich (UK)
- Alginát sodný, Sigma Aldrich (UK)
- Chitosan, Sigma Aldrich (UK)
- Chlorid vápenatý, Lachema (ČR)

- Trifosfát sodný, Sigma Aldrich (UK)
- Kyselina octová, Lach.Ner (ČR)
- Klotrimazol, Sigma-Aldrich (UK)
- Ampicilin, Sigma-Aldrich (UK)
- Lysozym, Sigma-Aldrich (UK)
- Papain – AppliChem (DE)
- Bromalein, Serva (SRN)
- Kolagenasa, Serva (SRN)

4.2.3 Chemikálie použité na kultivaci keratinocytů a MTT testy

- DMEM medium, Sigma-Aldrich (UK)
- Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)
- MTT, Duchefa Biochemie (NL)
- Trypsin, Versene EDTA, P-Lab (ČR)
- FBS fetální bovinné sérum, HyClone (USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
- Chlorid sodný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
- Antibiotic-Antomycotic 100X (Biosera), Biotech (SRN)

4.2.4 Chemikálie na kultivaci mikroorganismů

- Nutrient Broth (NB), Himedia (India)
- LB medium, Sigma-Aldrich (DE)
- BHI medium, Himedia (India)

4.3 Použité humánní buňky

Pro stanovení cytotoxicity krytů byly použity buňky HaCaT Human keratinocytes cell line, permanent cell line, které pocházely ze zdravého mužského dárce, ze sbírky buněčných kultur Cell Lines Service, Eppelheim (Německo).

4.4 Použité mikroorganismy

V experimentální části této práce byly používány na testování antimikrobiální aktivity kultury *Micrococcus luteus* CCM 1569, *Serratia marcescens* CCM 8587, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418. Všechny použité bakteriální kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.5 Použité byliny a koření

Kozinec (Valdemar Grešík – Natura s.r.o.), muškátový oříšek (Kotányi), pepř černý (Kotányi), tymián (Kotányi), zázvor mletý (Valdemar Grešík – Natura s.r.o.).

4.6 Příprava extraktů

Z vybraných rostlin byly připraveny dva typy extraktů, konkrétně extrakty vodné a olejové.

4.6.1 Příprava vodných extraktů

Na přípravu vodných extraktů byl použit vždy 1 g vzorku, ten byl zalit 10 ml vroucí destilované vody. Dále byly vzorky ponechány louhovat po dobu 30 minut na třepací plošině vyhřívané na

teplotu 30 °C. Následně byly vzorky zcentrifugovány po dobu 10 minut při otáčkách 9 000 rpm. Z každého vzorku byly poté odebrány 2 ml roztoku a uskladněny v Eppendorfově zkumavce na další použití.

4.6.2 Příprava olejových extraktů

Olejové extrakty byly připravovány pomocí přístroje Soxtherm, jako extrakční činidlo byl použit hexan. Pro přípravu bylo použito 10 g vzorku, ten byl navážen do patrony, která byla utěsněna vatou. Utěsněná patrona se vzorkem byla dána do skleněné nádoby a byla přelita 100 ml hexanu. Do skleněné nádoby byl dán varný kamínek a poté byla nádobka nasunuta do přístroje Soxtherm. Nastavení extrakčního programu naleznete v Tabulka 1. Po dokončení extrakce byl olej se zbytky hexanu přelit do předem zvážené odpařovací baňky. Hexan byl z oleje odpařen pomocí vakuové odparky. Po odpaření byla baňka s olejem ponechána přes noc v exsikátoru. Druhý den byl olej zvážen a uchováván v mrazicím boxu pro další použití.

Tabulka 1: Parametry nastavení extrakce

T-Klasifikace	200 °C
Extrakční teplota	170 °C
Redukční interval	3 min 3 s
Redukční puls	3 s
Horká extrakce	1 h 30 min
Evaporace A	5x interval
Extrakční čas	1 h
Evaporace B	2x interval
Evaporace C	10 min
Délka program	3 h 4 min

4.7 Charakterizace extraktů

Pro základní charakterizaci připravených extraktů bylo použito celkové stanovení koncentrace polyfenolů a stanovení antioxidační aktivity.

4.7.1 Stanovení celkové koncentrace polyfenolů

Stanovení celkového obsahu polyfenolů je spektrofotometrická metoda. Folin-Ciocalteauovo činidlo bylo zředěno vodou v poměru 1:9 a k 1 ml naředěného činidla byl přidán 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku. Pomocí vortexu byl roztok promíchán a po 5 minutách byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Roztok byl opět promíchán a ponechán stát 15 minut. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Jako blank byl použit roztok, do kterého bylo místo vzorku přidáno 50 µl destilované vody.

Pro vytvoření kalibrační závislosti byla jako standard použita kyselina gallová v koncentračním rozmezí od 0,1 do 0,7 mg/ml.

4.7.2 Stanovení antioxidační aktivity

Jedná se o spektrofotometrické stanovení, které využívá roztok ABTS^{•+}. ABTS byl rozpuštěný v destilované vodě na koncentraci $c = 7$ mmol/l. Radikálový ion ABTS^{•+} byl získán reakcí s 2,45 mmol/l peroxodisíranem draselným. Poté byl roztok ponechán nejméně 12 hodin ve tmě

při laboratorní teplotě. Vždy před použitím byl roztok ABTS^{·+} naředěn ethanolem na absorbanzi $A = 0,700 \pm 0,020$ při vlnové délce 734 nm proti ethanolu.

Při stanovování antioxidační aktivity vzorků byl napipetován 1 ml ABTS^{·+} do zúžené kyvety a bylo přidáno 10 μ l vzorku, poté byl změřen pokles absorbance v 10. minutě při vlnové délce 734 nm. Jako blank byl použit 1 ml ABTS^{·+}, ke kterému bylo přidáno 10 μ l destilované vody při měření vodných extraktů a 10 μ l ethanolu při měření olejových extraktů.

Pro stanovení kalibrační závislosti byl jako standard použit roztok Troloxu v koncentračním rozmezí od 50 do 400 μ g/ml.

4.8 Příprava nanovlákných krytů na bázi PHB

Nanovlákná z PHB byly připravovány dvěma metodami, elektrospinningem a forcespiningem. Pomocí obou metod byly připravovány vlákna z roztoků PHB o různých koncentracích. Zásobní roztoky PHB byly připravovány rozpuštěním navážky PHB v chloroformu za ohřevu ve vodní lázni na magnetické míchačce. Metody byly optimalizovány na přípravu vláken z roztoků PHB o koncentraci 2, 3 a 4%.

4.8.1 Metoda elektrospinning

Do stříkačky byl nasán roztok PHB, do kterého bylo přidáno 0,2 % tetraethylamonium bromidu. Stříkačka byla dána do pumpy, konec stříkačky byl obalen kouskem alobalu a elektrodou připojen ke zdroji vysoké napětí, kolektor byl také připojen ke zdroji. Byla upravena vzdálenost konce stříkačky a kolektoru na 15 cm a průtok pumpy byl nastaven na 5 až 9 ml/hod. Po dokončení nastavení byl spuštěn zdroj vysokého napětí (15 kV). Po dokončení zvlákňování byla vlákna opatrně sloupnuta z kolektoru a dána do Petriho misky, vzorky vláken byly uskladněny v suchu a tmě při laboratorní teplotě.

Při přípravě vláken s obsahem olejového extraktu byla do roztoku PHB přidána příslušná navážka extraktu, stejně byla připravena vlákna s obsahem klotrimazolu.

4.8.2 Metoda forcespining

Při produkci vláken touto metodou se využíval rotační zvlákňovací přístroj. Po zapnutí přístroje se připravený roztok PHB pomalu a opatrně přikapává na rotující střed přístroje. Vzniklá vlákna byla opatrně sundána ze středu a kolektorových tyčí přístroje, poté byla uchovávána v Petriho miskách v suchu a tmě při laboratorní teplotě.

Pro získání vláken s obsahem olejových extraktů byl extrakt přidán do chloroformového roztoku PHB. Stejným způsobem byly připraveny i vlákně kryty s obsahem klotrimazolu.

4.9 Příprava nevlákných krytů

Na výrobu krytů byly připraveny zásobní roztoky alginátu sodného, chitosanu, chloridu vápenatého a trifosfátu sodného. Při přípravě chitosanového roztoku bylo nutné upravovat pH roztoku pomocí kyseliny octové. Ze zásobních roztoků byly připraveny roztoky o koncentraci 1, 2 a 3%. Do malých Petriho misek (průměr 5 cm) bylo nalito přibližně 5 ml roztoků, aby byla vytvořena vrstva vysoká cca 3 mm. Tato vrstva byla následně přelita minimálně stejným množstvím polymerizačního roztoku o shodné koncentraci, jako měl použitý roztok alginátu nebo chitosanu. Následná polymerizace probíhala po dobu 20 minut. Jako polymerizační roztok pro alginát byl použit chlorid vápenatý a pro chitosan byl použit trifosfát sodný.

Tímto postupem byly připraveny alginátové a chitosanové kryty o koncentracích 1, 2 a 3 %. Do krytů byly rovněž přidány aktivní látky, konkrétně ampicilin, lysozym, kolagenasa, papain, bromelain a vodné extrakty z muškátového oříšku a zázvoru. Po přípravě byly kryty uchovávány v lednici.

4.10 Charakterizace krytů

U připravených nanovláčkových krytů byla stanovena antioxidační aktivita, krátkodobá a dlouhodobá stabilita a antimikrobiální aktivita. Připravené nevláčkové kryty s aktivními složkami byly charakterizovány podle povahy aktivní látky. Kryty, které obsahovaly vodné extrakty, ampicilin a lysozym byly podrobeny antimikrobiálním testům. Kryty s obsahem vodných extraktů byly zkoumány také pro svou antioxidační aktivitu a krátkodobou stabilitu. U krytů s obsahem kolagenasy, papainu a bromelainu byla stanovena enzymatická aktivita.

4.10.1 Stanovení antioxidační aktivity krytů

Pro stanovení antioxidační aktivity krytů byl použit postup popsáný v kapitole 4.7.2. Z připravených nanovláčků byl vystřižen kus o velikosti přibližně 1 cm², z nevláčkových krytů bylo vyříznuto kolečko o průměru přibližně 0,7 mm, charakterizovaný kus krytu byl vždy zvážěn. Ke krytu byly přidány 2 ml roztoku ABTS^{•+}, v 10. minutě při vlnové délce 734 nm byl změřen pokles absorbance.

4.10.2 Stanovení krátkodobé stability krytů

Při určení krátkodobé stability krytů bylo použito spektrofotometrické stanovení postupného uvolňování polyfenolů do prostředí. Jako modelová prostředí byly použity voda, 50% ethanol a čistý ethanol.

Z připravených nanovláčků byl vystřižen čtvereček o velikosti 1 cm², z nevláčkových krytů bylo vyříznuto kolečko o průměru cca 0,7 mm, kryt byl zvážěn a dán do zkumavky. Poté byly ke krytům přidány 2 ml modelového prostředí. Dále byla stanovována koncentrace uvolněných polyfenolů v časech 0, 5, 10, 20, 30, 60 minut a 12, 24 hodin u nanovláčkových krytů a v časech 0, 5, 10, 20, 30, 60 minut a 4 hodiny u nevláčkových krytů. Postup stanovení polyfenolů je popsán v bodě 4.7.1.

4.10.3 Stanovení dlouhodobé stability nanovláčkových krytů

Pro stanovení dlouhodobé stability byla změřena antioxidační aktivita vláčků po měsíci skladování v suchu a ve tmě při laboratorní teplotě. Postup byl stejný jako v bodě 4.10.1.

4.10.4 Stanovení proteolytické aktivity nevláčkových krytů

Pro určení proteolytické aktivity papainu a bromelainu a nespecifické proteolytické aktivity kolagenasy bylo použito spektrometrické stanovení, které jako substrát využívá modifikovaný protein azoalbumin. Dochází k enzymatické hydrolýze, díky které se uvolňují barevné peptidy, které se poté rozpouští v kyselině trichloroctové. Jednotka aktivity je poté stanovena jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu, která se projeví nárůstem absorbance o 0,001 za 1 minutu.

Z připravených nevláčkových krytů s obsahem proteolytických enzymů byly vyříznuty kolečka o průměru 0,7 mm, každý testovaný kus krytu byl zvážěn, objemově odpovídal přibližně 100 μl. Ke vzorku krytu bylo následně přidáno 100 μl roztoku azoalbuminu o

koncentraci 5 mg/ml. Vzorky byly ponechány inkubovat po dobu 60 minut v inkubačním boxu při 37 °C. Po uplynutí požadovaného času inkubace bylo přidáno 410 µl 10% kyseliny trichloroctové a tím došlo k zastavení enzymatické reakce. Vzorky byly poté zcentrifugovány po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách. Poté bylo odebráno 500 µl supernatantu, ke kterému bylo dále přidáno 700 µl 1 M NaOH. Na závěr byla změřena absorbance při vlnové délce 440 nm. Jako blank byl použit vzorek, do kterého byla přidána kyselina trichloroctová ještě před inkubací.

4.11 Kultivace mikroorganismů

Celkově bylo pracováno se čtyřmi druhy mikroorganismů, konkrétně *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*. Pro kultivace bylo vždy zvoleno a připraveno vhodné tekuté médium (Tabulka 2). Do 50 ml sterilního média bylo zaočkováno stěrem z pevného média pomocí kličky nebo napipetováním 1 ml kultury z tekutého média. Po zaočkování byly mikroorganismy kultivovány v inkubačním boxu s třepáním při teplotě 37 °C. Kultivace probíhala 24 hodin, poté byly mikroorganismy přeočkovány a zpracovány.

Tabulka 2: Použitá média pro vybrané mikroorganismy

Mikroorganismus	Použité médium	Navážka média na 100 ml [g]
<i>Micrococcus luteus</i>	NB medium	25
<i>Serratia marcescens</i>	NB medium	25
<i>Escherichia coli</i>	LB medium	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI medium	37

4.12 Antimikrobiální testy

U připravených vodných extraktů a nanovlákných i nevlákných krytů byly otestovány jejich antimikrobiální účinky na čtyřech vybraných bakteriálních kmenech, dva grampozitivní (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*) a dva gramnegativní (*Serratia marcescens*, *Escherichia coli*). Měření bylo provedeno pomocí bujónového dilučního testu na 96-jamkových nebo 24-jamkových mikrotitračních destičkách.

4.12.1 Bujónová diluční metoda

Před zahájením testu byla bakteriální kultura vhodně naředěna. Z 50 ml bakteriální kultury, která byla inkubována po dobu 24 hodin v Erlenmeyerově baňce byl odpipetován 1 ml kultury do 50 ml nového sterilního média. Takto naředěná kultura byla rozpipetována do jamek mikrotitračních destiček. Pro testování extraktů byly použity 96-jamkové destičky, do kterých bylo napipetováno 150 µl buněčné kultury a 50 µl vzorku. Jako blank byly použity jamky, do kterých bylo k 150 µl kultury přidáno 50 µl destilované vody. Testování krytů bylo prováděno na 24-jamkových destičkách, do jamek byly napipetovány 2 ml kultury, poté byly do jamek pomocí pinzety přidány předem zvážené kusy krytů, které byly vysterilovány UV světlem. Následně byly destičky ponechány 24 hodin v inkubačním boxu.

U vzorků v destičkách byla změřena absorbance při vlnové délce 630 nm v čase $t = 0$ a $t = 24$ hod. Ze získaných dat byla stanovena antimikrobiální aktivita testovaných vzorků a krytů.

4.13 Kultivace keratinocytů

Kultivace keratinocytů HaCaT byla prováděna ve sterilním inkubačním boxu, který byl nastaven na teplotu 37 °C, s 5% obsahem CO₂ a relativní vlhkostí 90 %. Jako kultivační médium bylo použito komerční DMEM médium, do kterého bylo přidáno 10% FBS a 1% antibiotikum. DMEM médium bylo uchováváno v lednici při teplotě 4 °C, před prací s ním bylo nutno médium ohřát na laboratorní teplotu. Během manipulace s keratinocyty byl kladen velký důkaz na sterilitu práce. Při kultivaci keratinocytů bylo potřeba buňky kontrolovat denně pod mikroskopem. Podle výsledku kontroly byl zvolen další postup.

4.13.1 Výměna živného média

Pokud byla při kontrole buněk pozorována barevná změna živného média z červené na oranžovou barvu, byla provedena výměna média. Z kultivační lahvičky bylo slito staré médium a napipetováno médium nové. Do velkých kultivačních lahviček bylo pipetováno 15 ml média, do malých 5 ml média.

4.13.2 Pasážování

Při kontrole buněk pod mikroskopem byla vždy zkoumána konfluencia buněk, což je míra zaplnění dna kultivační lahvičky. Pokud byla konfluencia nad 70 %, bylo třeba lahvičku zpasážovat, tedy převést buňky ze staré kultivační lahvičky do dvou nových.

Z lahvičky připravené na pasážování bylo nejprve slito médium. Poté byla lahvička nejméně dvakrát propláchnuta PBS puřem, aby došlo k vypláchnutí vápenatých iontů. Dále byl do lahviček napipetován trypsin, do velkých lahviček 1 ml, do malých 0,5 ml. Trypsin byl ponechán působit 10 minut v inkubačním boxu. Po uplynutí této doby byly lahvičky zkontrolovány pod mikroskopem, zda došlo k uvolnění buněk ze dna lahvičky. Pomocí úderů na stěny lahviček bylo možno napomoci uvolnění buněk. Pokud byly buňky stále přichyceny, byla použita sterilní škrabka a její pomocí byly buňky šetrně seškrábány ze dna lahvičky. Následně bylo do kultivační lahvičky napipetováno 5 ml PBS puřru, lahvička byla řádně opláchnuta a celý její obsah byl převeden do centrifugační zkumavky. Roztok byl centrifugován po dobu 5 minut při otáčkách 320-360 rcf při teplotě 25 °C. Po stočení byl slit supernatant a peletka buněk byla rozsuspendována v 5 ml DMEM média. Médium s buňkami bylo poté rozděleno do nových kultivačních lahviček. Na závěr byly lahvičky zkontrolovány pod mikroskopem a dány do inkubačního boxu.

4.14 Stanovení růstové křivky keratinocytů

Postup byl ze začátku totožný s postupem používaným během pasážování (viz. kapitola 4.13.2). Po centrifugaci byla po slití supernatantu rozsuspendována peletka v médiu a pomocí Bürkerovy komůrky byla určena koncentrace buněk. Podle jejich počtu byly buňky vhodně naředěny médiem a byly rozpipetovány do 6-jamkové destičky po 2 ml. Každý den byl spočítán počet živých buněk v jedné jamce destičky. Mezi měřením byla destička uchovávána v inkubačním boxu. Z počtu životaschopných buněk v jamkách byla sestavena růstová křivka používaných keratinocytů.

4.15 MTT test cytotoxicity

Určení cytotoxicity vybraných látek a kryptů bylo stanovováno na lidských keratinocytech HaCaT.

Prvotní postup byl stejný jako při pasážování (viz. bod 4.13.2) až do centrifugace, slítí supernatantu a rozsuspendování peletky buněk v médiu. Poté byla stanovena koncentrace buněk pomocí Bürkerovy komůrky. Vhodně naředěná buněčná kultura byla napipetována do testovacích destiček. V případě použití 6-jamkové destičky bylo pipetování 2 ml kultury, do 24-jamkové destičky 500 μ l kultury, do 96-jamkové destičky 100 μ l kultury. Buněčná kultura v jamkách destičky byla ponechána růst v inkubačním boxu po dobu 24 hodin.

Druhý den bylo u 96-jamkových destiček odpipetováno médium z jamek a místo něho bylo přidáno 100 μ l vzorků naředěných médiem. Při přípravě vzorků bylo nutné prve vzorky naředit se sterilní destilovanou vodou v poměru 1 : 1. Dále byly vzorky zfiltróvány přes sterilní filtry, takto upravené vzorky byly poté naředěny médiem do škály koncentrací od 2 do 14 %. Při testování krytů byly používány 6-jamkové nebo 24-jamkové destičky. Z nanovláknenných krytů byly vystřiženy čtverečky o velikosti 1 cm², z nevláknenných krytů byly vyříznuty kolečka o průměru 0,7 mm. Kusy krytů byly uchovávány v Eppendorfových zkumavkách, byly předem zváženy a vysterilizovány UV zářením. Vzorky krytů byly přidány do jamek k buněčné kultuře. Destičky byly dány do inkubačního boxu na 24 hodin.

Třetí den bylo z jamek odpipetováno médium a do každé jamky bylo přidáno sterilní MTT, které bylo rozpuštěné v PBS pufru s výslednou koncentrací 2,5 mg/ml. Do 6-jamkové destičky bylo přidáno 400 μ l MTT, do 24-jamkové destičky bylo přidáno 100 μ l MTT a do 96-jamkové destičky bylo přidáno 20 μ l MTT. Destičky byly následně kultivovány po doby 3 hodin, poté bylo do každé jamky přidáno 10% SDS rozpuštěné v PBS pufru, které způsobilo zvýšení rozpustnosti tmavě fialových krystalů formazanu. Do 6-jamkové destičky byly přidány 2 ml SDS, do 24-jamkové destičky bylo přidáno 500 μ l SDS a do 96-jamkové destičky bylo přidáno 100 μ l SDS. Poté byly destičky uschovány do tmy na nejméně 24 hodin.

Stanovení cytotoxicity bylo změřeno spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm, jako kontrola byla použita absorbance čisté buněčné kultury. Pokud absorbance vzorku klesla pod 60 % absorbance kontroly, byl vzorek určen jako cytotoxický.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

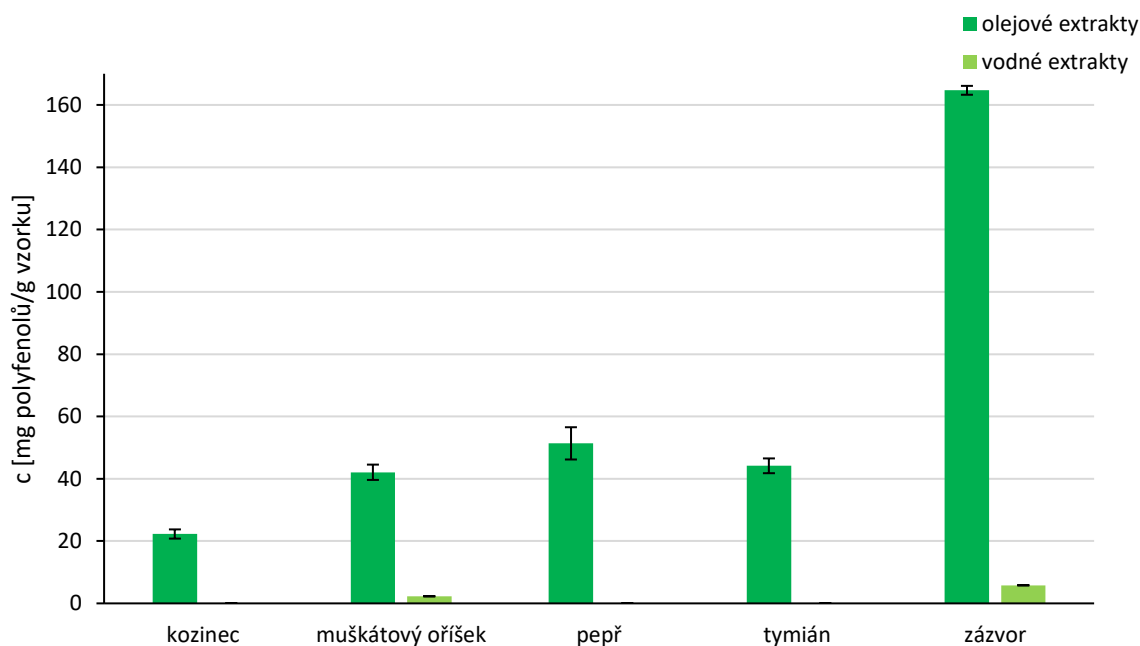
Tato diplomová práce byla zaměřená na přípravu a optimalizaci přípravy nových krytů ran s obsahem aktivních složek a testování jejich interakce s humánními buňkami. V práci byly připraveny nanovláknenné a nevláknenné kryty z přírodních polymerů. Dále byla prováděna funkcionalizace krytů pomocí bioaktivních složek. Nanovláknenné kryty byly funkcionalizovány rostlinnými olejovými extrakty a klotrimazole. Pro přípravu olejových extraktů byly vybrány kozinec, muškátový oříšek, pepř, tymián a zázvor. U nevláknenných krytů byla specifikována jejich aplikace přidáním rostlinných vodných extraktů z muškátového oříšku a zázvoru, ampicilinu, lysozymu a proteolytických enzymů (papain, bromalein a kolagenasa). Kryty s obsahem antimikrobiální složky byly podrobeny testování antibakteriální účinnosti. Na závěr bylo provedeno testování cytotoxicity připravených krytů na humánních buňkách.

5.1 Charakterizace rostlinných extraktů

V této práci byly ze všech vybraných bylin a koření připraveny olejové extrakty, z muškátového oříšku a zázvoru byly připraveny i vodné extrakty. Na přípravu olejových extraktů byla použita metoda extrakce pomocí Soxthermu, jejíž přesný postup je uveden v kapitole 4.6.2, vodné extrakty byly připraveny podle postupu popsaném v kapitole 4.6.1. Olejové i vodné extrakty byly zcharakterizovány pomocí určení celkového obsahu polyfenolů a stanovením jejich antioxidační aktivity.

5.1.1 Celkový obsah polyfenolů v extraktech

Obsah polyfenolů ve vzorcích byl určen podle postupu z kapitol 4.7.1. Jako první byla zhotovena kalibrační závislost, dále byla pomocí kalibrační rovnice $y = 1,5207x$ vypočítána koncentrace polyfenolů v extraktech.



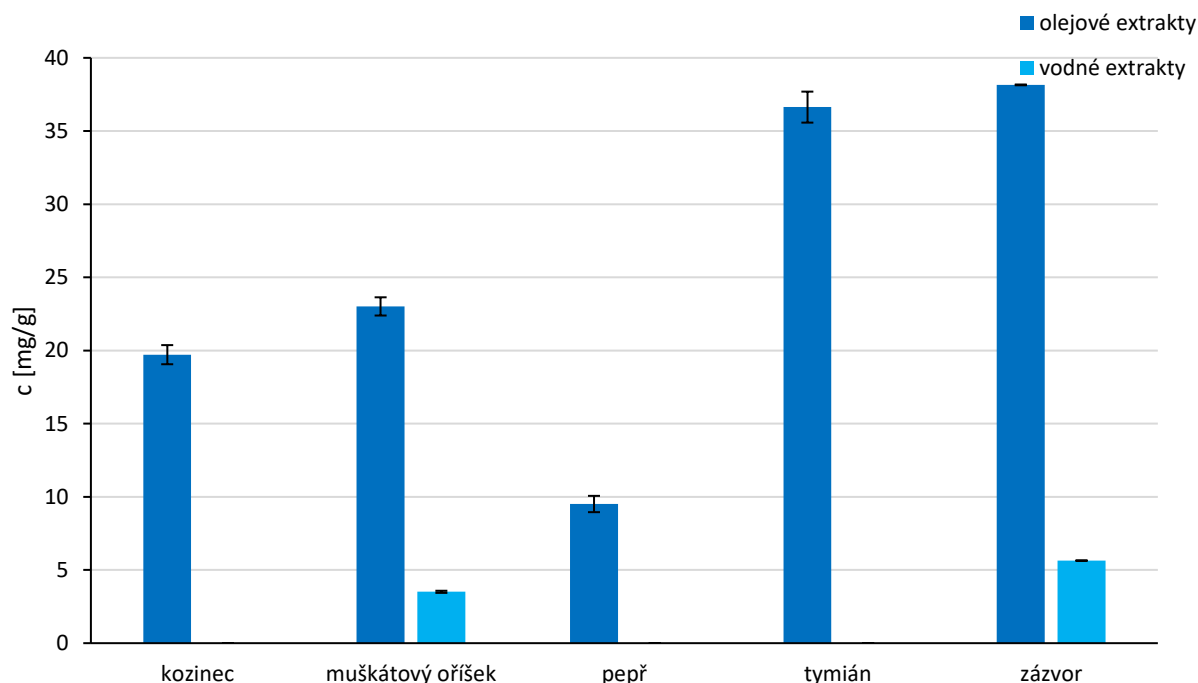
Obrázek 10: Obsah polyfenolů v olejových a vodných extraktech

Z výše uvedeného grafu (Obrázek 10) jsou patrné koncentrace polyfenolů na gram vzorku u olejových a vodných extraktů. Z olejových extraktů bylo nejvíce polyfenolů stanoveno v extraktu ze zázvoru, konkrétně $164,69 \pm 1,43$ mg/g, což je zároveň největší hodnota polyfenolů ze všech připravených extraktů, olejových i vodných. Nejmenší množství polyfenolů z olejových extraktů bylo zjištěno v extraktu z kozince ($22,27 \pm 1,48$ mg/g).

Vodné extrakty byly připraveny pouze z muškátového oříšku a zázvoru. Extrakt ze zázvoru obsahoval větší množství polyfenolů ($5,81 \pm 0,01$ mg/g) než extrakt z muškátového oříšku ($2,28 \pm 0,04$ mg/g). Ze srovnání obsahů polyfenolů v olejových a vodných extraktech je zřetelně patrné, že olejové extrakty obsahují mnohem více polyfenolů než extrakty vodné.

5.1.2 Antioxidační aktivita extraktů

Pro určení antioxidační aktivity extraktů byl použit postup uvedený v bodě 4.7.2. Hodnoty aktivity byly vztaženy na ekvivalent Troloxu v mg na gram vzorku z vytvořené kalibrační závislosti, jejíž kalibrační rovnice byla $y = 1,1835x$. V dále uvedeném grafu (Obrázek 11) jsou shrnuty antioxidační aktivity olejových i vodných extraktů.

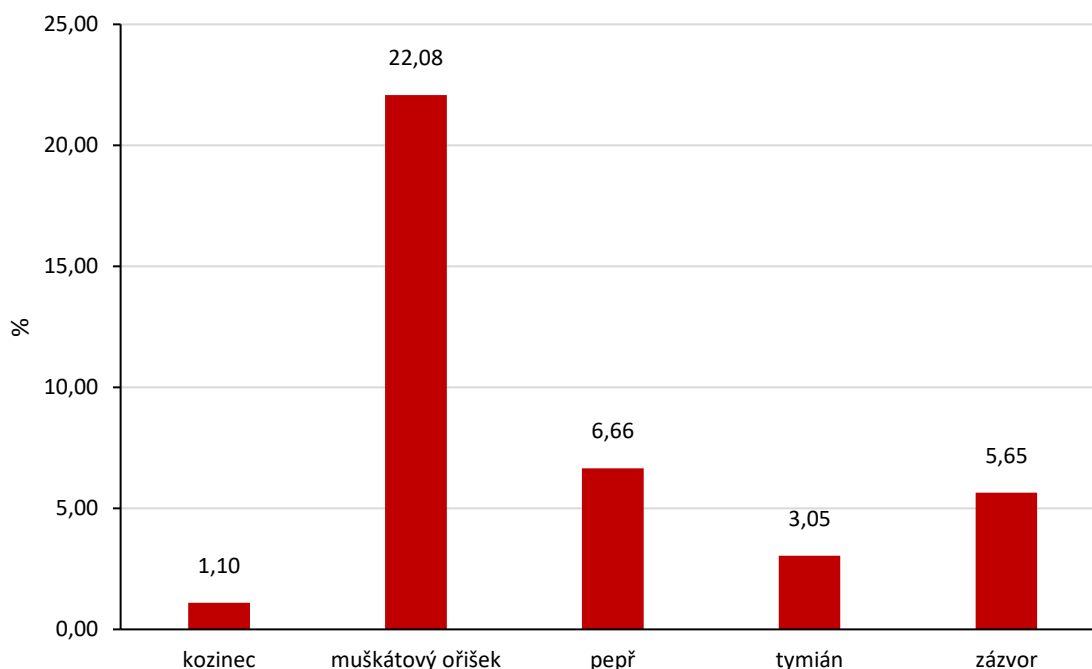


Obrázek 11: Antioxidační aktivita olejových a vodných extraktů

Při obecném porovnání antioxidační aktivity olejových a vodných extraktů vykazují všechny olejové extrakty vyšší aktivitu než vybrané extrakty vodné. Mezi olejovými extrakty nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly extrakty s obsahem zázvoru ($38,15 \pm 0,03$ mg/g) a tymiánu ($36,63 \pm 1,06$ mg/g), nejnižší aktivita byla určena u pepřového extraktu ($9,51 \pm 0,56$ mg/g). Z vodných extraktů byla vyšší antioxidační aktivita stanovena u extraktu ze zázvoru ($5,64 \pm 0,01$ mg/g), aktivita extraktu z muškátového oříšku byla určena na $3,51 \pm 0,07$ mg/g.

5.2 Výtěžnost olejových extraktů

Výtěžnost olejových extraktů byla vyjádřena jako procento hmotnosti získaného olejového extraktu z původní navážky vzorku, výsledky byly zpracovány do grafu (Obrázek 12).



Obrázek 12: Výtěžnost olejových extraktů

Získané extrakty měly hustou konzistenci a charakteristickou příjemnou vůni daného koření či byliny. Nejvyšší výtěžek byl získán z muškátového oříšku (22,08 %), tento vysoký výtěžek je dán vysokým obsahem lipidických látek. Výtěžnost dalších extraktů byla pro pepř 6,66 %, zázvor 5,65 % a tymián 3,05 %. Nejnižší výtěžek olejového extraktu byl stanoven u kozince, pouze 1,10 %.

5.3 Příprava a optimalizace přípravy nanovlákných krytů

PHB nanovlákná byla připravována pomocí metod elektrospinning a forcespinning, postupy těchto metod jsou popsány v bodech 4.8.1 a 4.8.2. Během měření této práce bylo připraveno přes 25 různých typů nanovláken, ta se mezi sebou lišila koncentrací PHB, metodou přípravy a přidavkem aktivní složky.

Pro optimalizaci přípravy byla vyrobena nanovlákná o různé koncentraci PHB (2, 3 a 4 %) oběma metodami, dále byla připravena nanovlákná s obsahem olejových extraktů a s různým obsahem klotrimazolu. V rámci optimalizace byla připravená nanovlákná s různou koncentrací PHB zkoumána z hlediska jejich antioxidační aktivity, krátkodobé stability a cytotoxicity. Jako nejvhodnější koncentrace PHB pro metodu elektrospinning byla určena koncentrace 2 %, pro metodu forcespinning pak koncentrace 4 %.

Z optimalizovaných koncentrací PHB byla poté oběma metodami připravena nanovlákná s obsahem olejových extraktů z muškátového oříšku, pepře, tymiánu a zázvoru. Nanovlákná s obsahem oleje z kozince nebyla připravována z důvodu nízké výtěžnosti extrakce, malého obsahu polyfenolů a nízké antioxidační aktivity. Po připravení byla všechna nanovlákná uchovávána v suchém prostředí ve tmě v Petriho miskách při laboratorní teplotě.



Obrázek 13: Porovnání 2% (vlevo) a 4% (vpravo) PHB nanovláken připravených forcespinningem

5.4 Charakterizace nanovláken s obsahem olejových extraktů

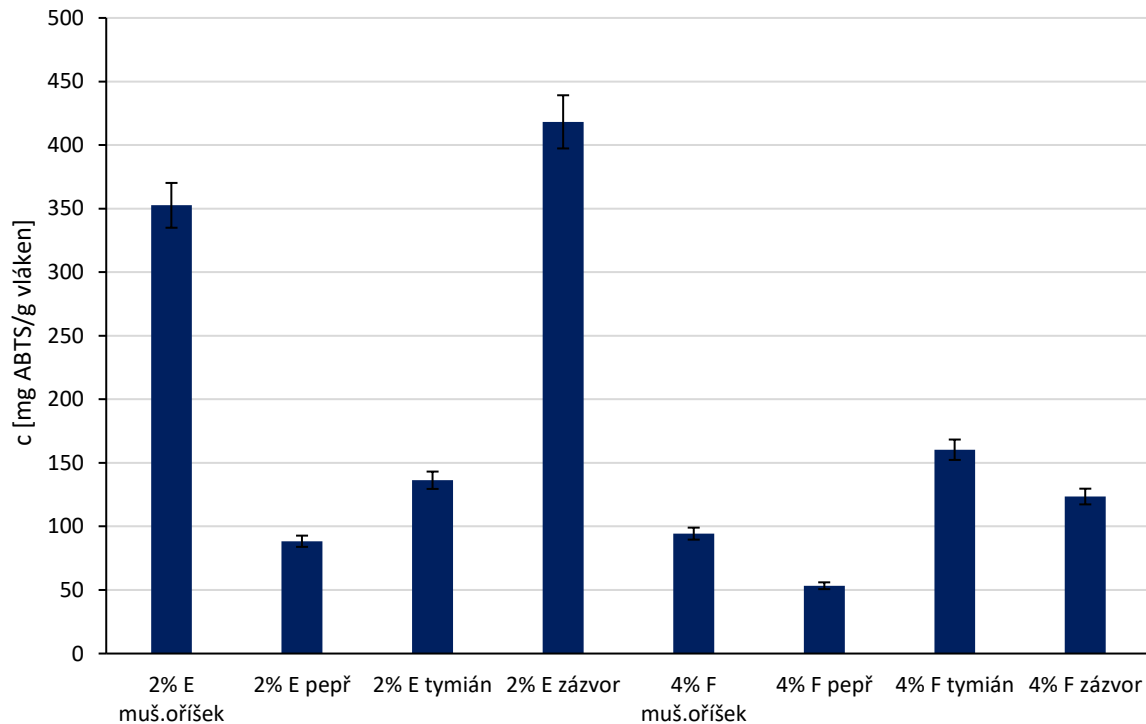
Připravená nanovláknina byla zkoumána pro své antioxidační a antimikrobiální účinky, byla sledována jejich krátkodobá i dlouhodobá stabilita. Na závěr byla nanovláknina podrobena testům cytotoxicity na lidských keratinocytech.

5.4.1 Antioxidační aktivita nanovláken

Antioxidační aktivita nanovláken byla určena metodou popsanou v bodě 4.10.1. Během měření byl porovnán rozdíl antioxidační aktivity prázdných PHB nanovláken a nanovláken s obsahem aktivní látky (Obrázek 14).



Obrázek 14: Vizuelní porovnání antioxidační aktivity vláken bez obsahu extraktu (vlevo) a vláken s obsahem olejového extraktu ze zázvoru (vpravo)



Obrázek 15: Antioxidační aktivita nanovláken

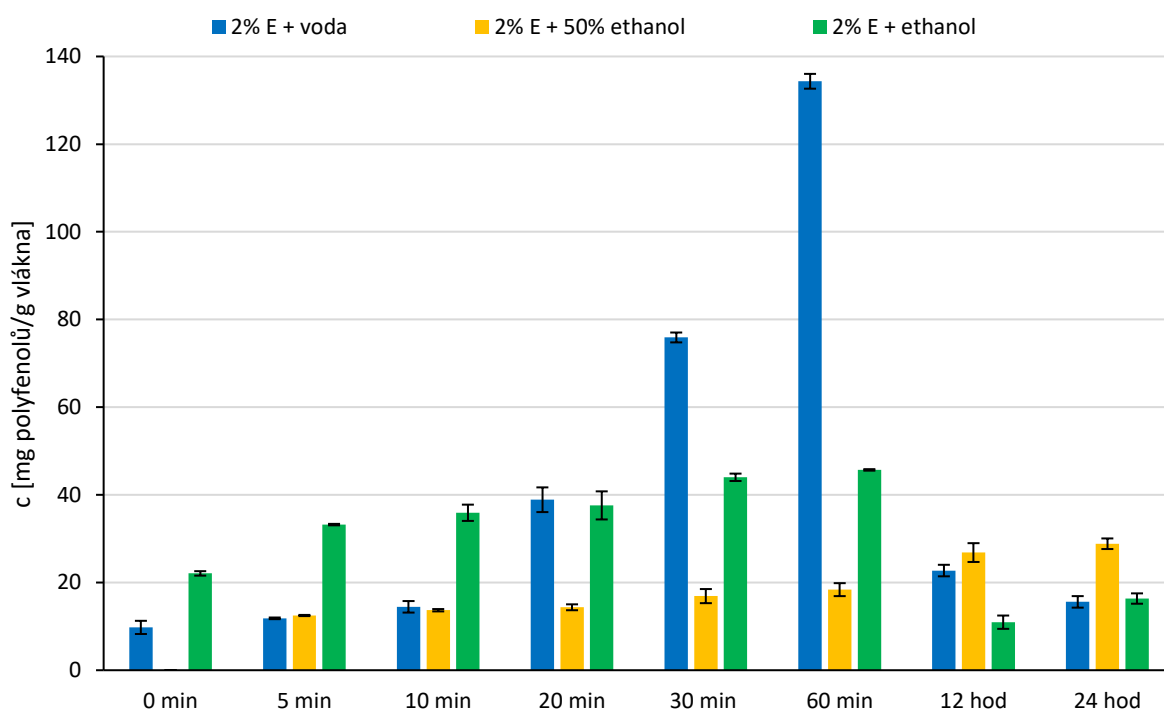
V uvedeném grafu (Obrázek 15) jsou zpracovány výsledky stanovení antioxidační aktivity nanovláken. Vzorky v grafu označené písmenem E byly připraveny metodou elektrospinningu, vzorky označené písmenem F byly připraveny metodou forcespinningu. Z grafu je vidět, že obecně vykazují nanovlákná připravené elektrospinningem vyšší antioxidační aktivitu než nanovlákná připravená forcespinningem. Roli může hrát použitá koncentrace PHB na přípravu nanovláken, která ovlivňuje například průměr připravených vláken. U nanovláken připravených forcespinningem z 4% roztoku tak může docházet k pomalejšímu uvolňování aktivních látek než

z nanovláken připravených elektrospinningem z 2% roztoku PHB z důvodu jejich větší velikosti. Charakter vláken je však ovlivněn i zvolenou metodou přípravy. Výjimkou v rychlosti uvolňování aktivní látky byla pouze nanovláknina s obsahem tymiánu, u těch vykazovala vyšší antioxidační aktivitu nanovláknina připravená forcespinningem.

Ze všech nanovláken byla určena nejvyšší antioxidační aktivita u elektrospinningových nanovláken s obsahem zázvoru (418,25 mg/g) a muškátového oříšku (352,58 mg/g). Nejmenší antioxidační účinnost byla stanovena u nanovláken s obsahem pepře, elektrospinningová vlákna 88,34 mg/g a forcespinningová vlákna 53,34 mg/g.

5.4.2 Krátkodobá stabilita nanovláken

Krátkodobá stabilita připravených nanovláken byla stanovena pomocí postupu uvedeném v kapitole 4.10.2.



Obrázek 16: Postupné uvolňování polyfenolů z elektrospinningových nanovláken s obsahem zázvoru

Ve výše uvedeném grafu (Obrázek 16) jsou pro ukázkou zpracovány výsledky stanovení krátkodobé stability nanovláken připravených metodou elektrospinningu s přidavkem olejového extraktu ze zázvoru. Na první pohled je patrné, že největší množství polyfenolů se do prostředí uvolnilo do 60 minut. Jednalo se o aktivní látky, které byly vázány na povrchu nanovláken, ty v prostředí poté degradovaly. Po 12 a 24 hodinách již poté došlo k uvolnění menšího množství látek, pomaleji se uvolňující polyfenoly byly pravděpodobně enkapsulovány uvnitř nanovláken, což zapříčinilo pomalejší uvolnění do prostředí. Ze tří zkoumaných prostředí, se do vodného prostředí do 60 minut uvolnilo největší množství polyfenolů. Nejmenší koncentrace uvolněných polyfenolů byla určena do prostředí 50% ethanolu.

V následujících tabulkách (Tabulka 3 a 4) jsou pro přesné porovnání zpracovány výsledky krátkodobé stability všech nanovláčkových krytů s obsahem olejových extraktů ve třech

zkoumaných prostředí. Z obecného hlediska došlo v uvolnění většího množství enkapsulované látky z vláken připravených metodou elektrospinning.

Tabulka 3: Výsledky krátkodobé stability elektrospinningových nanovláken

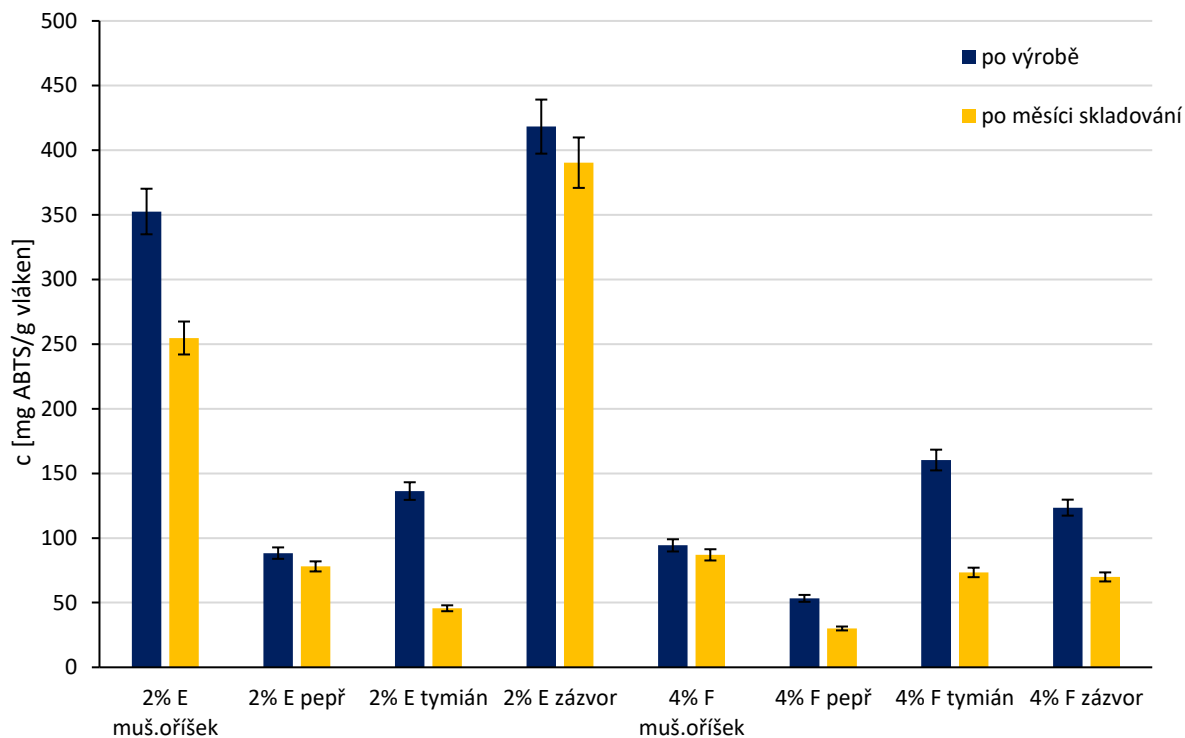
Typ krytu	čas měření	konzentrace uvolněných polyfenolu [mg/g] VODA	konzentrace uvolněných polyfenolu [mg/g] 50% ETHANOL	konzentrace uvolněných polyfenolu [mg/g] ETHANOL
2% E + muš. oříšek	0 min	0,00±0,00	11,33±1,10	0,00±0,00
	5 min	0,00±0,00	11,33±0,37	0,00±0,00
	10 min	0,00±0,00	24,84±1,46	0,00±0,00
	20 min	0,00±0,00	28,50±0,73	0,00±0,00
	30 min	0,00±0,00	32,51±3,29	0,00±0,00
	60 min	0,00±0,00	38,00±1,46	0,00±0,00
	12 hod	0,00±0,00	0,00±0,00	15,54±1,79
	24 hod	1,67±0,48	0,00±0,00	40,65±1,20
2% E + pepř	0 min	4,05±0,51	0,00±0,00	18,08±0,33
	5 min	7,08±1,01	0,00±0,00	19,73±0,66
	10 min	11,89±0,25	0,00±0,00	25,32±0,99
	20 min	17,20±0,51	0,00±0,00	30,91±0,66
	30 min	34,90±3,54	0,00±0,00	35,18±0,33
	60 min	113,81±7,59	2,63±0,53	39,78±1,64
	12 hod	3,79±1,26	3,95±0,26	0,00±0,00
	24 hod	10,62±1,52	43,40±1,84	7,23±0,66
2% E + tymián	0 min	0,00±0,00	0,00±0,00	6,12±0,31
	5 min	7,95±0,82	0,00±0,00	13,15±0,31
	10 min	12,06±0,55	0,00±0,00	14,99±0,61
	20 min	28,22±1,37	0,00±0,00	15,45±0,15
	30 min	38,91±3,29	0,00±0,00	19,88±1,53
	60 min	135,90±6,03	0,00±0,00	21,10±0,61
	12 hod	26,85±1,64	3,36±0,61	0,00±0,00
	24 hod	9,86±1,10	4,28±0,31	5,20±0,61
2% E + zázvor	0 min	9,77±1,50	0,00±0,00	22,09±0,51
	5 min	11,84±0,19	12,48±0,13	33,22±0,17
	10 min	14,47±1,32	13,69±0,27	35,91±1,85
	20 min	38,89±2,82	14,36±0,67	37,60±3,20
	30 min	75,90±1,13	16,91±1,61	44,01±0,84
	60 min	134,34±1,69	18,39±1,48	45,69±0,17
	12 hod	22,73±1,32	26,84±2,15	10,96±1,52
	24 hod	15,59±1,32	28,85±1,21	16,36±1,18

Tabulka 4: Výsledky krátkodobé stability forcespinningových nanovláken

Typ krytu	čas měření	koncentrace uvolněných polyfenolu [mg/g] VODA	koncentrace uvolněných polyfenolu [mg/g] 50% ETHANOL	koncentrace uvolněných polyfenolu [mg/g] ETHANOL
4% E + muš. oříšek	0 min	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	5 min	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	10 min	0,00±0,00	7,59±0,19	0,00±0,00
	20 min	0,00±0,00	8,80±0,09	0,00±0,00
	30 min	0,00±0,00	11,30±0,37	0,00±0,00
	60 min	0,00±0,00	18,52±0,37	0,00±0,00
	12 hod	0,00±0,00	0,00±0,00	4,51±0,28
	24 hod	1,50±0,38	0,00±0,00	7,41±0,28
4% E + pepř	0 min	1,14±0,013	0,00±0,00	8,02±0,64
	5 min	3,16±0,38	0,00±0,00	9,78±0,48
	10 min	4,55±0,25	0,00±0,00	13,00±0,16
	20 min	15,18±2,02	0,00±0,00	18,28±0,64
	30 min	20,49±0,25	0,68±0,08	31,28±0,80
	60 min	28,07±3,54	2,18±0,15	33,68±4,17
	12 hod	4,05±0,76	4,47±0,49	2,25±0,96
	24 hod	7,84±0,51	7,21±0,53	8,50±0,48
4% E + tymián	0 min	0,00±0,00	0,00±0,00	3,64±0,62
	5 min	0,29±0,17	0,00±0,00	6,04±0,18
	10 min	0,63±0,17	0,00±0,00	8,44±0,09
	20 min	3,17±0,75	0,00±0,00	9,15±0,44
	30 min	10,67±0,29	0,00±0,00	11,64±0,27
	60 min	15,11±1,04	0,13±0,04	16,08±0,98
	12 hod	3,52±0,17	0,54±0,27	0,00±0,00
	24 hod	5,60±0,75	4,34±0,13	11,91±0,53
4% E + zázvor	0 min	0,42±0,18	0,00±0,00	5,06±0,41
	5 min	1,99±0,54	0,00±0,00	15,28±0,33
	10 min	5,07±0,24	0,00±0,00	19,77±0,74
	20 min	5,61±0,90	10,04±0,72	20,91±0,33
	30 min	7,60±0,48	12,31±0,60	22,71±0,82
	60 min	19,85±0,90	13,63±0,24	24,26±0,98
	12 hod	3,38±0,12	17,93±0,48	15,81±0,94
	24 hod	3,98±0,97	26,18±0,84	20,79±0,61

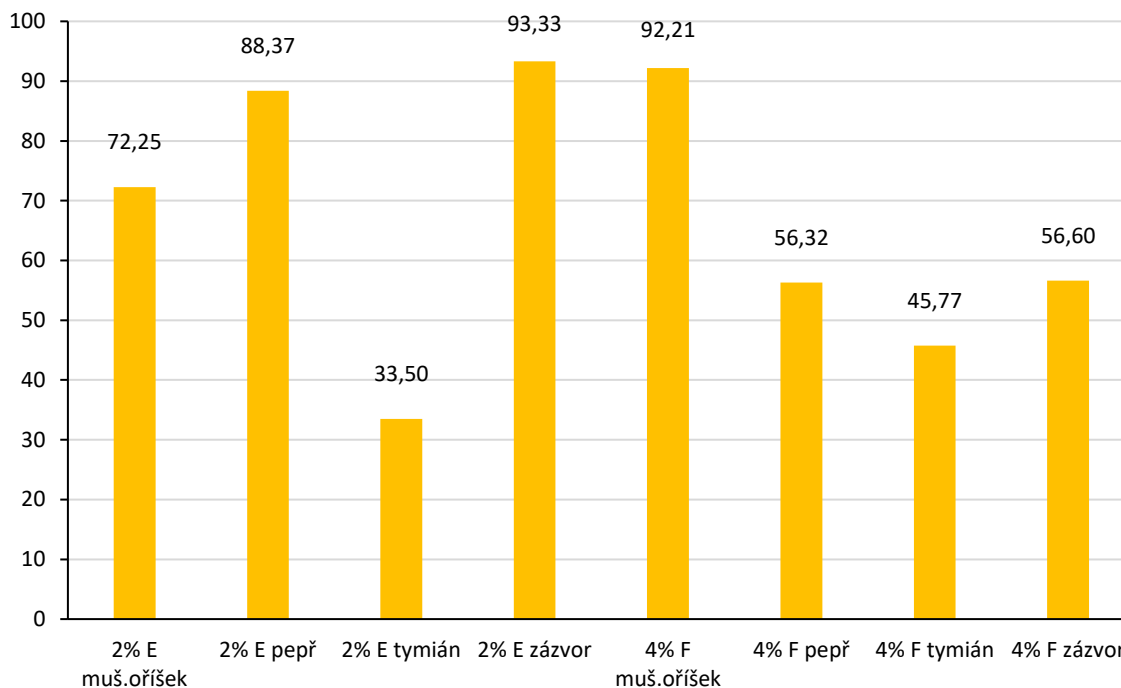
5.4.4 Dlouhodobá stabilita nanovláken

Dlouhodobá stabilita nanovláken byla určena za použití postupu, který byl popsán v bodě 4.10.3.



Obrázek 17: Dlouhodobá stabilita nanovláken

V grafu výše (Obrázek 17) je zpracováno porovnání antioxidačních aktivit změřených ihned po výrobě nanovláken a po měsíci skladování v suchu a tmě při laboratorní teplotě. Obecně došlo u všech vláken k jisté ztrátě antioxidační aktivity. Nejvyšší aktivitu stále vykazovaly elektrospinningové kryty s přidavkem zázvoru (390,35 mg/g) a muškátového oříšku (254,73 mg/g).



Obrázek 18: Zůstatek antioxidační aktivity po měsíci skladování

Do grafu (Obrázek 18) byl vyjádřen zůstatek aktivních látek s antioxidačními účinky po měsíci skladování v procentech. K nejmenší ztrátě aktivity došlo u elektrospinningových vláken s obsahem zázvoru (zůstatek 93,33 %) a forcespiningových vláken s muškátovým oříškem (zůstatek 92,21 %). Naopak největší úbytek aktivních látek byl zjištěn u tymiánových vláken připravených oběma metodami. Ostatní vlákna vykazovala zachování aktivních antioxidačních složek nad 50 %.

5.5 Příprava a optimalizace přípravy nevláknenných krytů

Nevláknenné kryty byly připravovány z dvou materiálů, alginátu a chitosanu. Jako součást optimalizace přípravy těchto krytů bylo připraveno více typů krytů, které se mezi sebou lišily koncentrací alginátu či chitosanu (1 až 4 %), dále se do krytů přidávaly různé aktivní látky podle zamýšlené aplikace. Byly připraveny kryty prázdné, s obsahem vodného extraktu z muškátového oříšku a zázvoru, s obsahem ampicilinu, lysozymu a proteolytických enzymů papainu, bromelainu a kolagenasy.

Po optimalizaci přípravy krytů byly jako nejvhodnější zvoleny 1% koncentrace alginátu a 3% koncentrace chitosanu.



Obrázek 19: Nevlákněných kryt z 1% alginátu (vlevo) a z 3% chitosanu (vpravo)

5.6 Charakterizace nevlákněných krytů

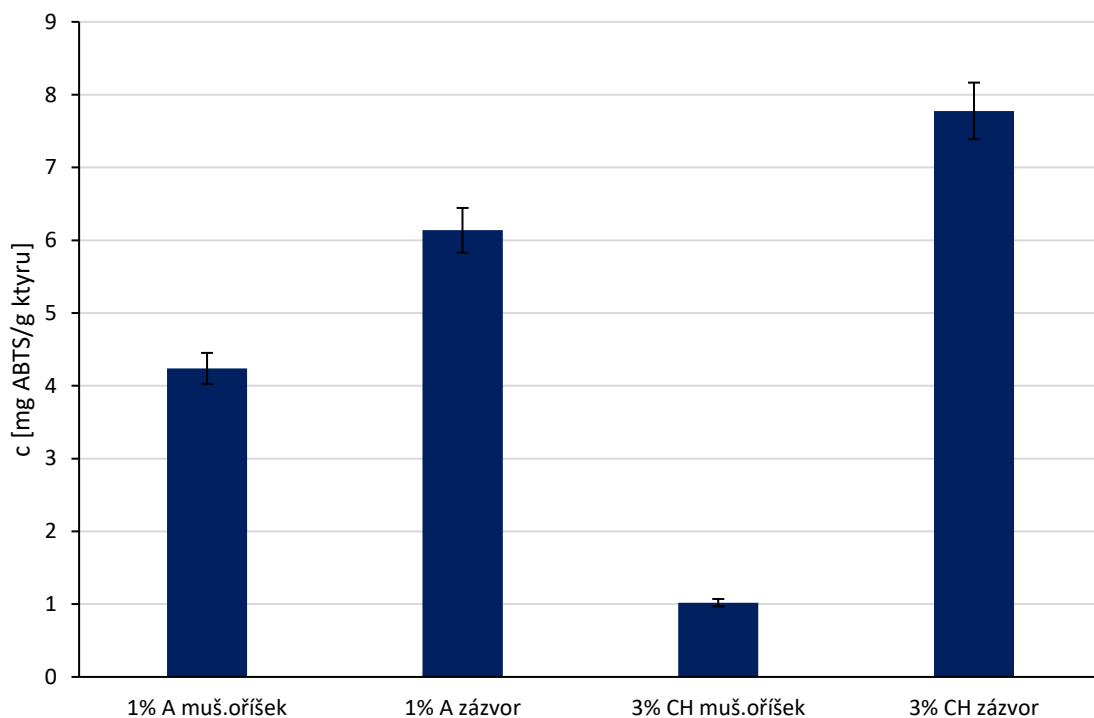
Připravené nevlákněné kryty byly zcharakterizovány dle typu aktivní složky, kterou obsahovaly. Kryty s obsahem vodných extraktů byly zkoumány z hlediska antioxidační aktivity a krátkodobé stability, spolu s kryty s přidavkem lysozymu a ampicilinu byly podrobeny antimikrobiálním testům. U krytů s obsahem papainu, bromelainu a kolagenasy byla otestována proteolytická aktivita. Všechny připravené kryty byly testovány na humánních buňkách.

5.6.1 Antioxidační aktivita nevlákněných krytů s obsahem vodných extraktů

Postup pro stanovení antioxidační aktivity nevlákněných krytů, do kterých byly přidány vodné extrakty z muškátového oříšku a ze zázvoru je uveden v kapitole 4.10.1. Ukázka antioxidačních účinků krytů je k vidění níže (Obrázek 20).



Obrázek 20: Vizuální porovnání antioxidační aktivity nevlákněných krytů

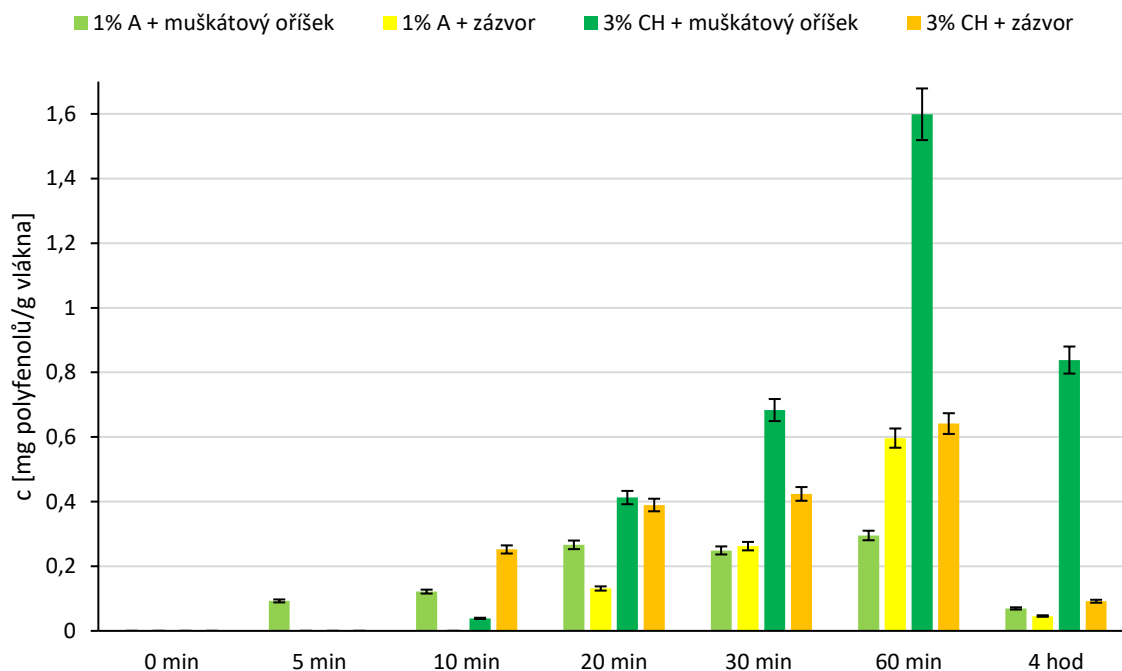


Obrázek 21: Antioxidační aktivita nevlákněných krytů

Ve vypracovaném grafu (Obrázek 21) je patrné, že obecně vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu kryty s obsahem vodného extraktu ze zázvoru. Největší aktivita byla stanovena u chitosanového krytu se zázvorem (7,77 mg/g), nejmenší antioxidační účinnost naopak vykazoval chitosanový kryt s přísadkou muškátového oříšku (1,02 mg/g).

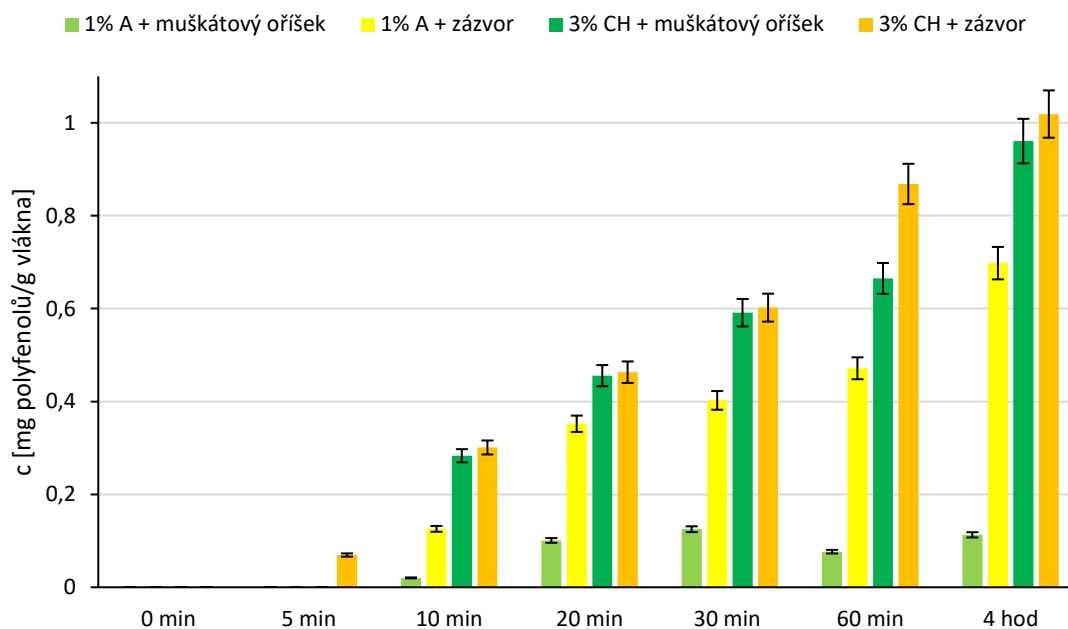
5.6.2 Krátkodobá stabilita nevlákněných krytů s obsahem vodných extraktů

Krátkodobá stabilita krytů byla určena jako postupné uvolňování polyfenolů do dvou typů prostředí, která měla simulovat prostředí kožní rány, přesný postup je popsán v bodě 4.10.2.



Obrázek 22: Krátkodobá stabilita krytů ve vodném prostředí

Graf (Obrázek 22) znázorňuje postupné uvolňování polyfenolických látek z nevlákněných krytů s obsahem vodných extraktů do vodného prostředí. Po dobu 60 minut docházelo k nárůstu množství uvolněných látek, poté již pravděpodobně nastala degradace polyfenolů uvolněných z povrchu krytu. Měřením v čase 4 hodiny bylo určeno množství uvolněných polyfenolů z vnitřní struktury krytu. Největší koncentrace polyfenolů byla uvolněna z chitosanového krytu s přidavkem vodného extraktu z muškátového oříšku.



Obrázek 23: Krátkodobá stabilita krytů v prostředí 50% ethanolu

V grafu (Obrázek 23) je zpracována krátkodobá stabilita nevlákněných krytů v prostředí 50% ethanolu. Na rozdíl od vodného prostředí nedocházelo zřejmě k degradaci, respektive k zastavení uvolňování aktivních látek z krytu po jedné hodině. Nejvyšší množství uvolněných polyfenolů bylo určeno u chitosanového krytu s obsahem extraktu ze zázvoru.

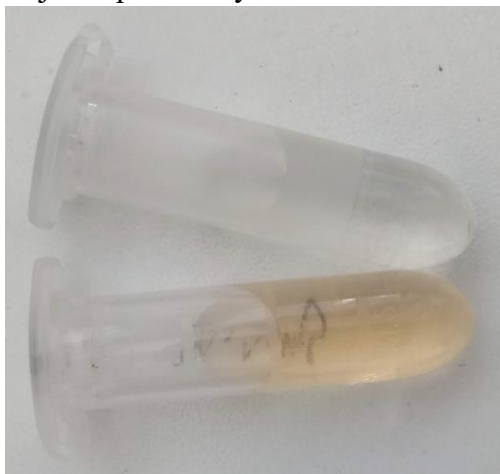
Přehled přesných výsledků stanovení krátkodobé stability nevlákněných krytů je uveden v Tabulka 5.

Tabulka 5: Výsledky stanovení krátkodobé stability nevlákněných krytů

Typ krytu	čas měření	konzentrace uvolněných polyfenolů [mg/g] VODA	konzentrace uvolněných polyfenolů [mg/g] 50% ETHANOL
1% A + muškátový oříšek	0 min	0,00±0,00	0,00±0,00
	5 min	0,09±0,03	0,00±0,00
	10 min	0,12±0,02	0,02±0,01
	20 min	0,27±0,05	0,10±0,03
	30 min	0,25±0,02	0,13±0,02
	60 min	0,30±0,01	0,08±0,01
	4 hod	0,07±0,02	0,11±0,02
1% A + zázvor	0 min	0,00±0,00	0,00±0,00
	5 min	0,00±0,00	0,00±0,00
	10 min	0,00±0,00	0,13±0,05
	20 min	0,13±0,03	0,35±0,06
	30 min	0,26±0,12	0,40±0,06
	60 min	0,60±0,22	0,47±0,03
	4 hod	0,05±0,01	0,70±0,18
3% CH + muškátový oříšek	0 min	0,00±0,00	0,00±0,00
	5 min	0,00±0,00	0,00±0,00
	10 min	0,04±0,01	0,28±0,04
	20 min	0,41±0,05	0,46±0,09
	30 min	0,68±0,04	0,59±0,10
	60 min	1,60±0,13	0,66±0,12
	4 hod	0,84±0,04	0,96±0,07
3% CH + zázvor	0 min	0,00±0,00	0,00±0,00
	5 min	0,00±0,00	0,07±0,02
	10 min	0,25±0,02	0,30±0,09
	20 min	0,40±0,02	0,46±0,02
	30 min	0,42±0,01	0,60±0,02
	60 min	0,64±0,14	0,86±0,03
	4 hod	0,09±0,05	1,02±0,05

5.6.4 Proteolytická aktivita nevlákenných krytů s obsahem enzymů

Proteolytická aktivita krytů byla testována podle pracovního postupu z kapitoly 4.10.4. Pro každý enzym byla stanovena hodnota referenční aktivity, následně byla hodnota aktivity vzorků vztažena na hodnotu aktivity reference, vyjádření bylo převedeno na procenta. Výsledky měření proteolytické aktivity krytů jsou zpracovány v Tabulka 6.

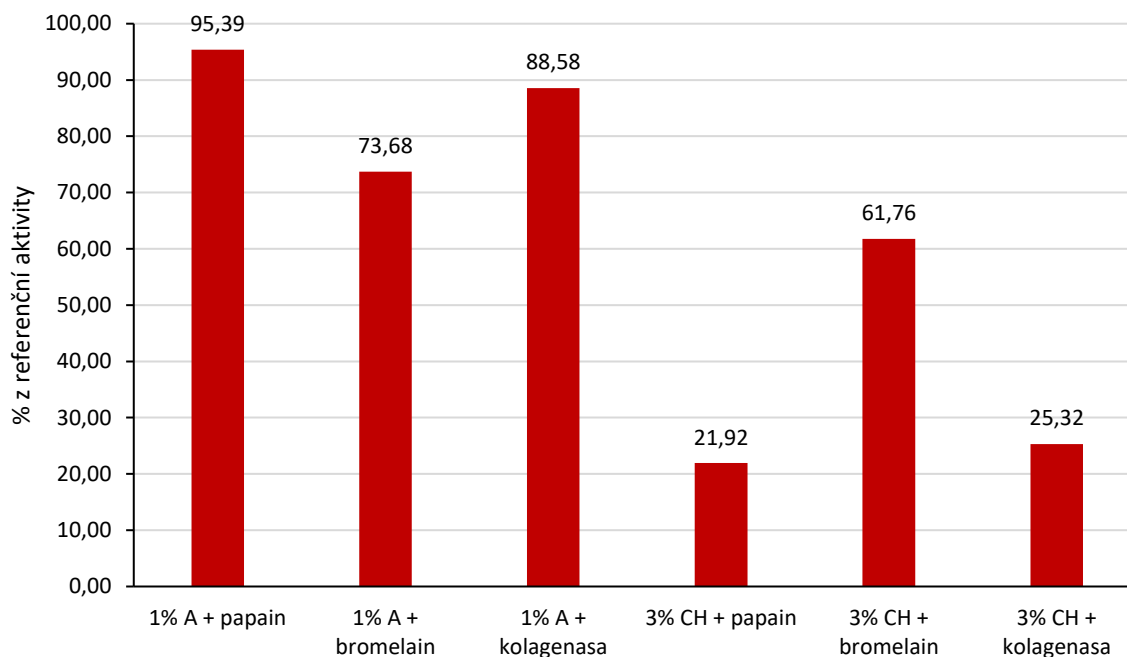


Obrázek 24: Vizuální porovnání stanovení proteolytické aktivity blanku (nahore) a vzorku (dole)

Tabulka 6: Výsledky stanovení proteolytické aktivity

Typ krytu	ΔA_{440} reference [-]	ΔA_{440} vzorků [-]	% z referenční aktivity
1% A + papain	0,217	0,207	95,39
1% A + bromelain	0,019	0,014	73,68
1% A + kolagenasa	0,394	0,349	88,58
3% CH + papain	0,26	0,057	21,92
3% CH + bromelain	0,136	0,084	61,76
3% CH + kolagenasa	0,154	0,039	25,32

Ze získaných výsledků stanovení proteolytické aktivity nevlákenných krytů byla potvrzena proteolytická aktivita připravených krytů s obsahem enzymů. Dále bylo zjištěno, že obecně vyšší enzymatickou aktivitu vykazovaly kryty vyrobené z 1% alginátu. Nižší proteolytická aktivita krytů z 3% chitosanu byla pravděpodobně způsobena vyšší koncentrací chitosanu, která zřejmě vedla k hustšímu zesílení gelu, což znesnadňovalo uvolnění imobilizovaných enzymů. Z testovaných krytů vykazoval nejvyšší proteolytickou aktivitu alginátový kryt s obsahem kolagenasy.



Obrázek 25: Proteolytická aktivita krytů vyjádřená pomocí referenční aktivity

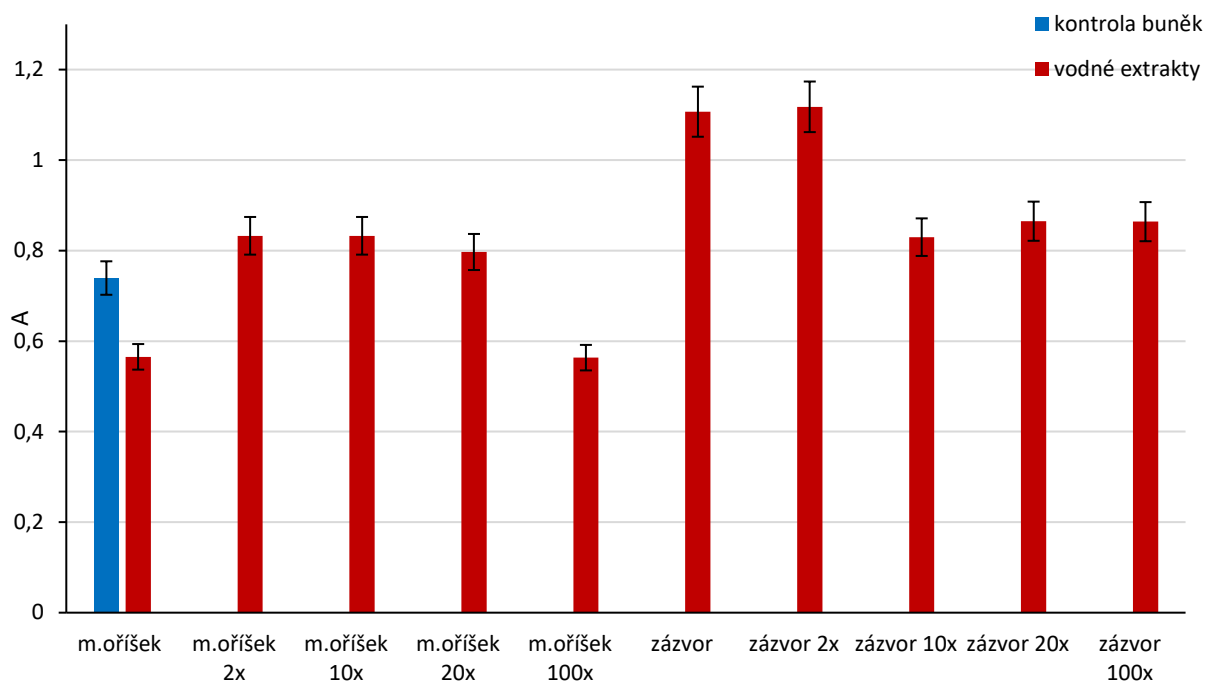
Ve výše uvedeném grafu (Obrázek 25) byla vyjádřena proteolytická aktivita krytů v procentech z hodnoty referenční aktivity. Opět byly zjištěny u alginátových krytů vyšší hodnoty než u krytů chitosanových. Proteolytická aktivita krytů z alginátu byla u všech nad 70 % z referenční aktivity. Z alginátových krytů tedy docházelo k dobrému uvolňování stanovovaných enzymů. Nejvyšší hodnota byla stanovena u alginátového krytu s obsahem papainu, 95,39 % z referenční aktivity.

5.7 Antimikrobiální testy připravených krytů

Antimikrobiální testy byly prováděny na 4 různých bakteriích, konkrétně *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*. Stanovení antimikrobiální účinnosti bylo provedeno u připravených vodných extraktů, nanovlákných i nevlákných krytů.

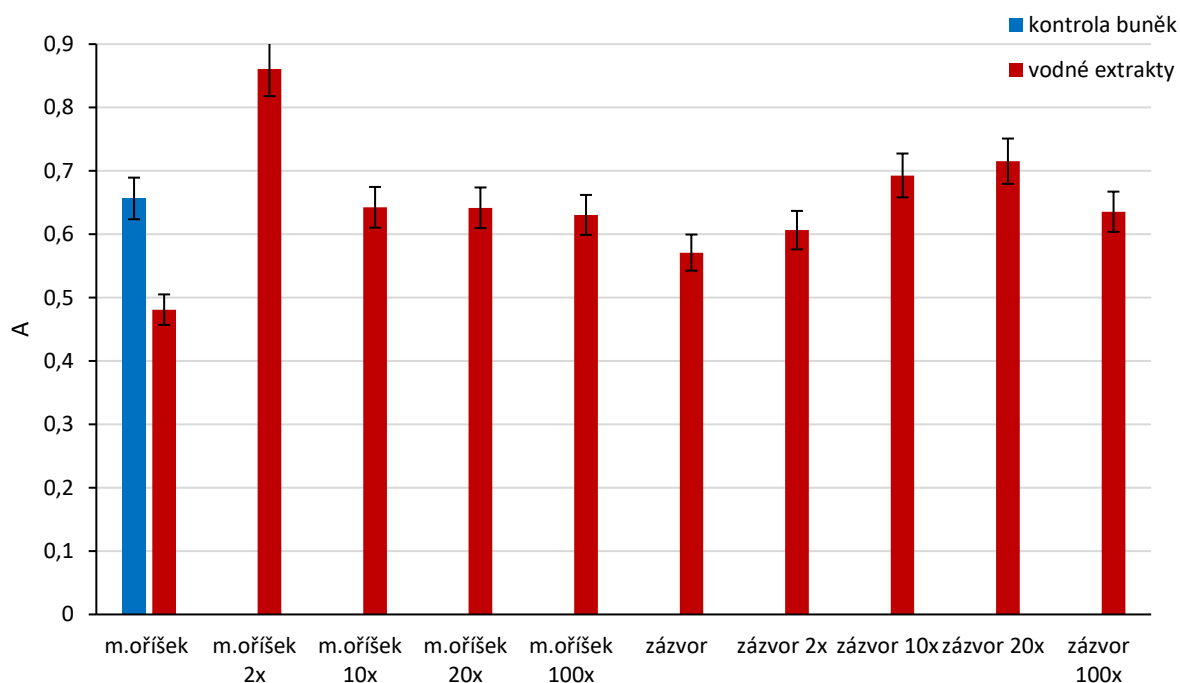
5.7.1 Antimikrobiální aktivita vodných extraktů

Účinnost vodných extraktů z muškátového oříšku a zázvoru proti bakteriím byla změřena pomocí postupu sepsaném v bodě 4.12.1. Připravené extrakty měly koncentraci 0,1 g/ml, ty se dále vhodně naředily, aby byla vytvořena koncentrační škála, u které byla antimikrobiální aktivita zkoumána. Na testy byly použity neředěné extrakty, dále byly extrakty naředěny dvakrát, desetkrát, dvacetkrát a stokrát.



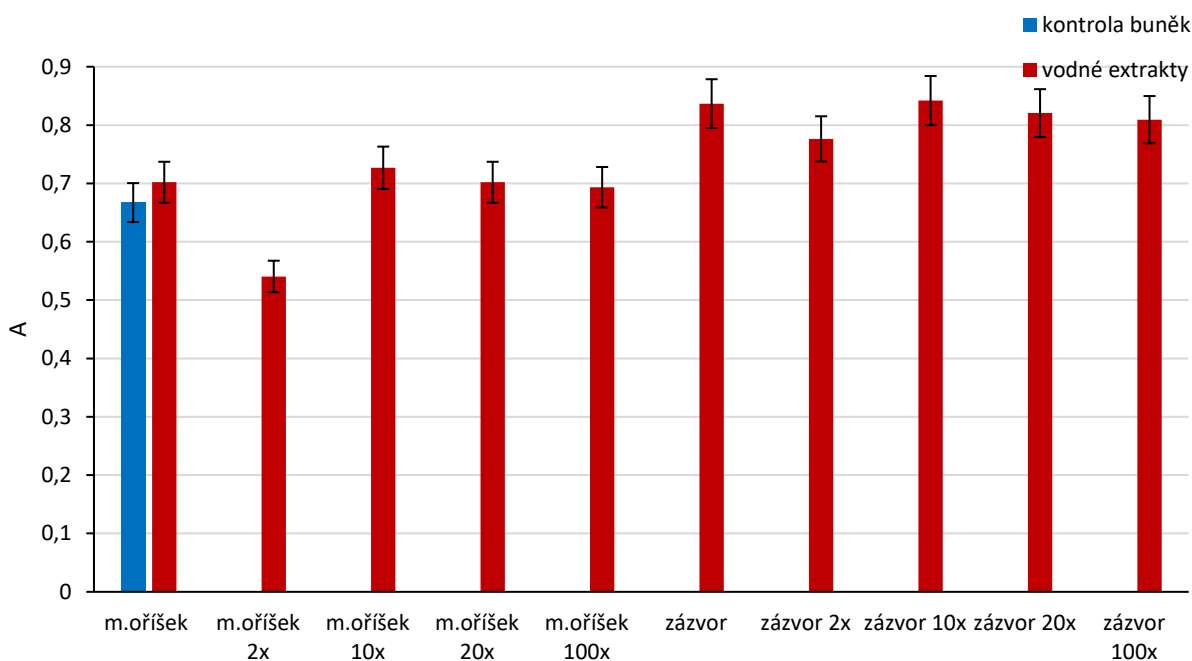
Obrázek 26: Antimikrobiální test vodných extraktů – *Micrococcus luteus*

V grafu (Obrázek 26) je zpracována antimikrobiální účinnost vodných extraktů na bakterii *Micrococcus luteus*. Testy bylo zjištěno, že vodný extrakt ze zázvoru nevykazoval antimikrobiální aktivitu na testovanou bakterii. Nejvyšší účinnost byla stanovena u nezředěného vodného extraktu z muškátového oříšku.



Obrázek 27: Antimikrobiální test vodných extraktů – *Serratia marcescens*

Ve výše uvedeném grafu (Obrázek 27) je patrné, že připravené vodné extrakty nevykazovaly velkou antimikrobiální aktivitu vůči bakterii *Serratia marcescens*. Nejvyšší aktivita byla stanovena u nezředěného extraktu z muškátového oříšku, poté u nezředěného extraktu ze zázvoru.



Obrázek 28: Antimikrobiální test vodných extraktů – *Staphylococcus epidermidis*

Graf (Obrázek 28) ukazuje, že vodné extrakty neměly antimikrobiální účinnost proti bakterii *Staphylococcus epidermidis*.



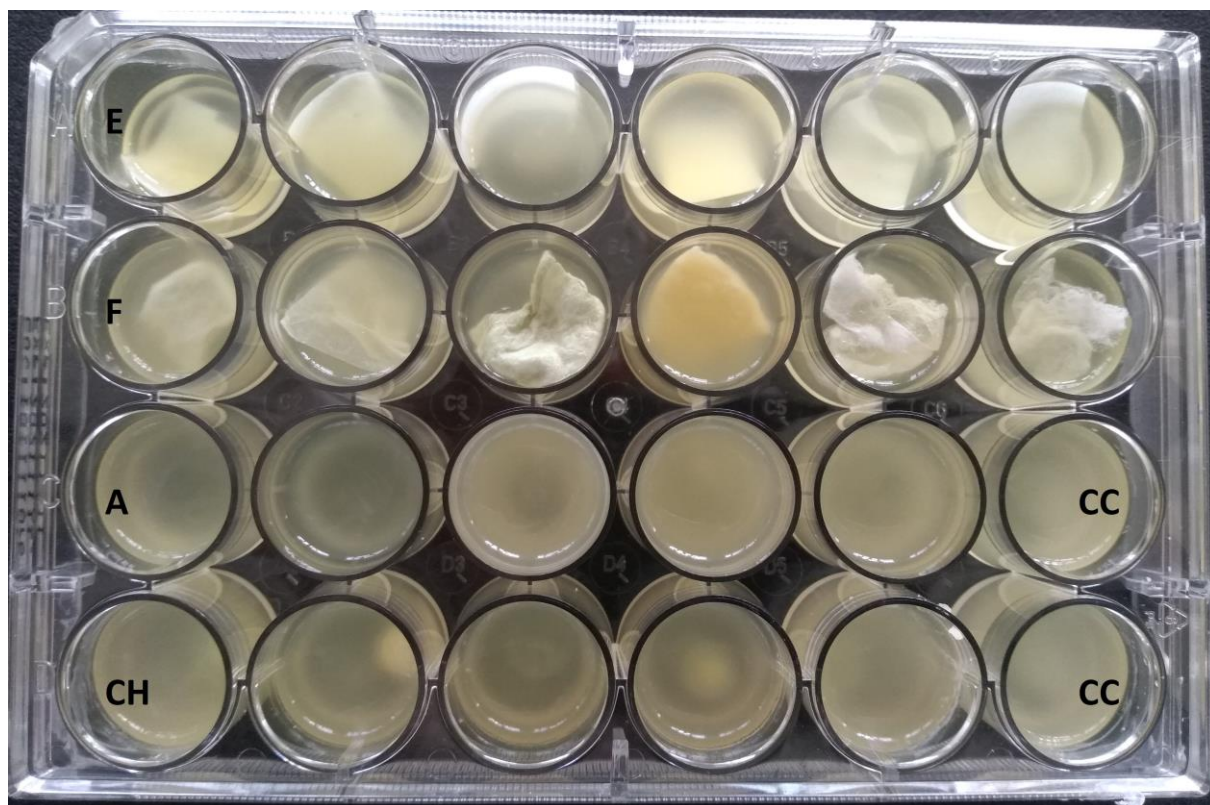
Obrázek 29: Antimikrobiální test vodných extraktů – *Escherichia coli*

Z vypracovaného grafu výše (Obrázek 29) lze konstatovat, že připravené vodné extrakty nevykazovaly účinnost ani proti bakterii *Escherichia coli*.

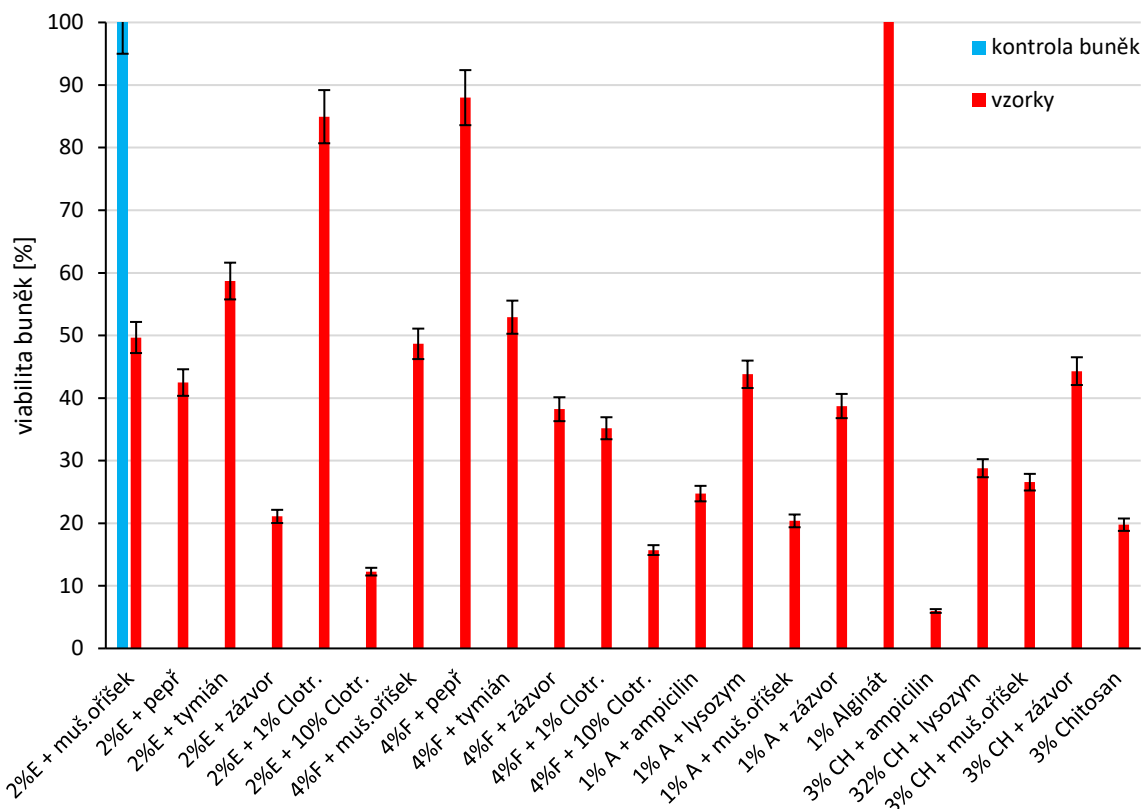
5.7.2 Antimikrobiální aktivita krytů

Testům na antimikrobiální aktivitu proti vybraným druhům bakterií byly podrobeny všechny připravené nanovláknenné kryty s obsahem olejových extraktů a vlákna s přísadkou klotrimazolu ve dvou koncentracích, které sloužily jako srovnávací. Z nevláknenných krytů byly testovány kryty, které obsahovaly vodné extrakty, lysozym a ampicilin. Ampicilinové kryty opět sloužily jako srovnávací. Dále byly zkoumány i účinky samotných alginátových a chitosanových krytů bez obsahu aktivních látek. Postup antimikrobiálních testů je uveden v bodě 4.12.1.

Testy byly prováděny v 24-jamkových destičkách, ukázka výsledku testu je k vidění níže (Obrázek 30). Výsledky byly vyjádřeny jako procento absorbance z absorbance v kontrolní jamce. Vyhodnocení bylo zpracováno do grafů, ve kterých kontrola buněk má hodnotu 100 %.

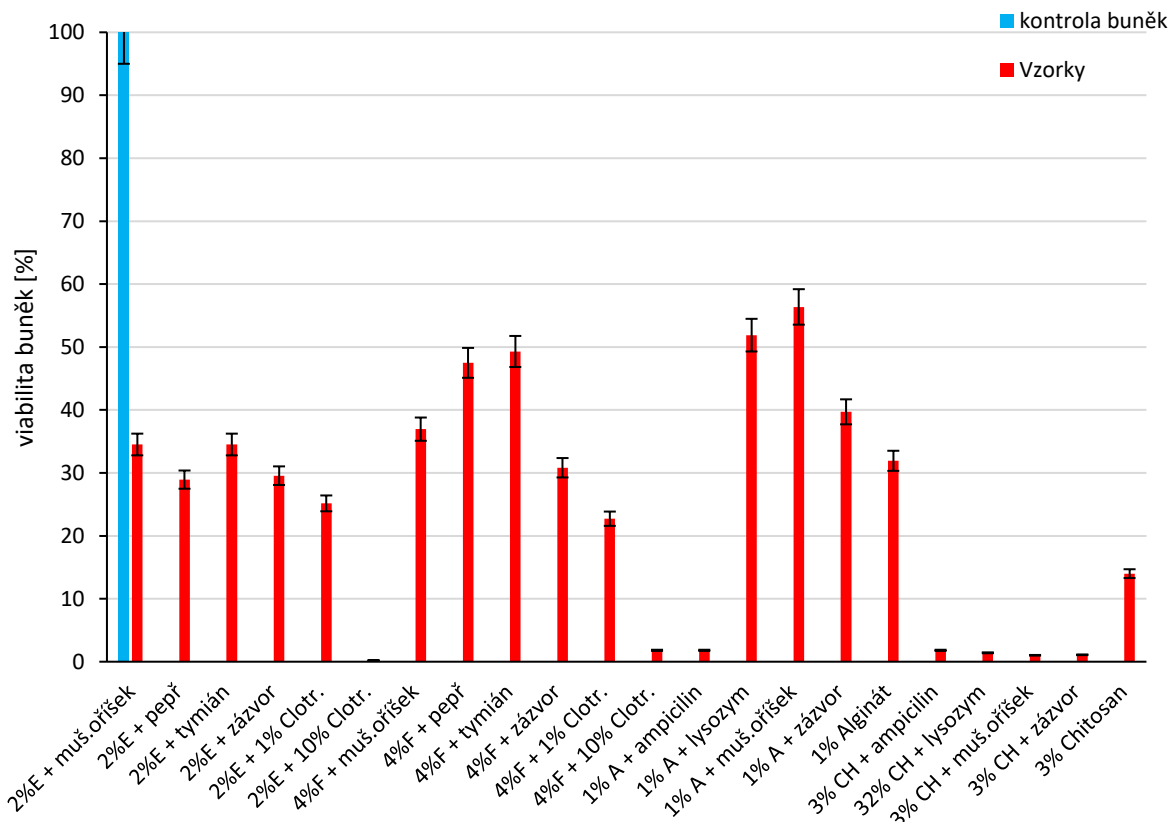


Obrázek 30: Mikrotitrační destička po ukončení antimikrobiálního testu krytů proti *Staphylococcus epidermidis*; CC – kontrola buněk, E – řada elektrospinningových vláken, F – řada forcespinningových vláken, A – řada alginátových krytů, CH – řada chitosanových krytů



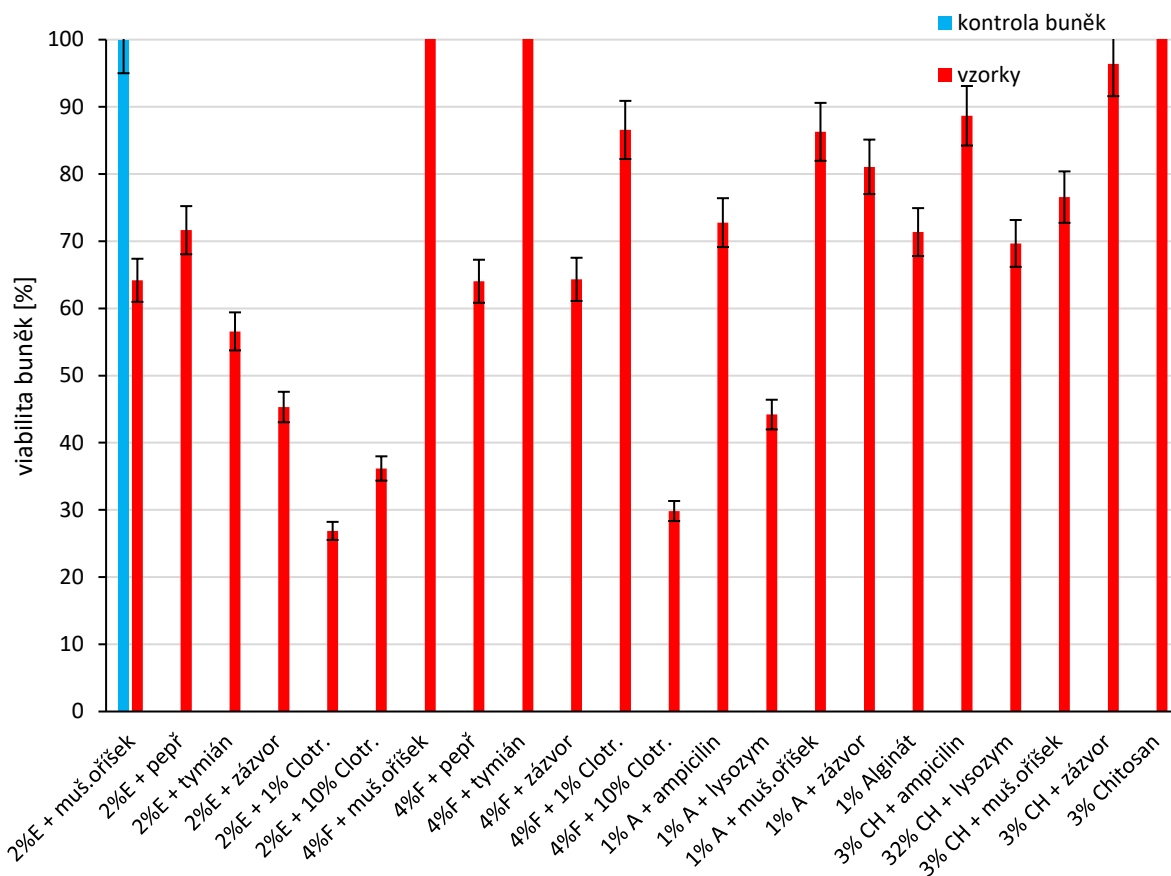
Obrázek 31: Antimikrobiální test krytů – *Micrococcus luteus*

Všechny připravené kryty s obsahem aktivních složek vykazovaly antibakteriální aktivitu proti bakteriálnímu kmeni *Micrococcus luteus* (Obrázek 31). Pouze alginátový kryt neobsahující aktivní složky byl bez antimikrobiálního účinku. Nejvyšší antimikrobiální účinnost pak měly vzorové kryty s obsahem ampicilinu a 10% klotrimazolu. Z nanovláknenných krytů vykazovaly největší aktivitu kryty s přidavkem olejového extraktu ze zázvoru u obou metod přípravy (viabilita buněk u elektrospinningu 21,08 % a u forcespinningu 38,22 %). U nevláknenných krytů byla zjištěna nejvyšší účinnost u krytu s obsahem muškátového oříšku (alginátový kryt 20,38 %, chitosanový kryt 26,56 %).



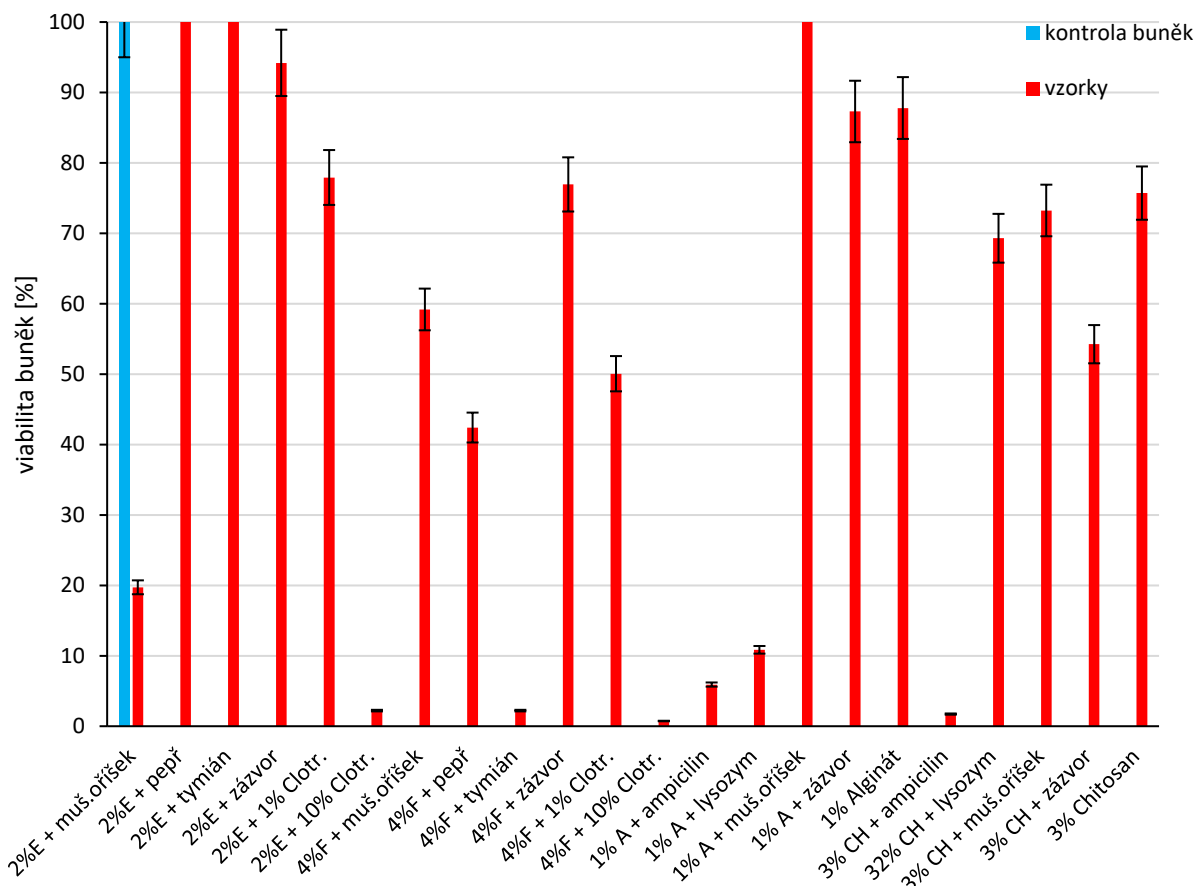
Obrázek 32: Antimikrobiální test krytů – *Serratia marcescens*

Z vypracovaného grafu (Obrázek 32) lze tvrdit, že všechny připravené kryty měly antimikrobiální účinky proti bakterii *Serratia marcescens*, viabilita se pohybovala pod 60 %. Vzorové kryty s ampicilinem a 10% klotrimazolem vykazovaly viabilitu buněk od 0,20 % do 1,81 %. Z elektrospinningových vláken měl nejlepší účinnost kryt s přidavkem extraktu z pepře (viabilita 28,93 %), u vláken připravených pomocí forcespinningu to byla vlákna s přidavkem zázvoru (30,82 %). Antimikrobiální aktivita alginátových krytů byla všeobecně nejslabší. Naopak u chitosanových krytů byla stanovena velké antimikrobiální aktivita a to i u prázdného chitosanového krytu. Tato účinnost se dá zdůvodnit obecně známými antimikrobiálními účinky chitosanu, které byly podpořeny přidávanými aktivními látkami. Buňky po působení chitosanových krytů s obsahem extraktu z muškátového oříšku měly viabilitu pouze 1,02 % a s extraktem ze zázvoru 1,10 %.



Obrázek 33: Antimikrobiální test krytů – *Staphylococcus epidermidis*

V grafu (Obrázek 33) je zpracována antibakteriální účinnost připravených krytů proti kmenu *Staphylococcus epidermidis*. Ze vzorových krytů byla stanovena vyšší účinnost proti růstu bakterie u nanovláken s obsahem klorimazolu než u krytů s přidavkem ampicilinu. Nejvyšší hodnotu aktivity, tedy nejnižší hodnotu viability bakteriálních buněk byla zjištěna u alginátového krytu s lysozymem (44,19 % viability buněk), jako druhý nejúčinnější byl určen elektrospinningový kryt s obsahem zázvoru (45,32 % viability buněk). Z obecného hlediska vykazovaly nejlepší antibakteriální účinky nanovláknna připravena elektrospinningovou metodou.



Obrázek 34: Antimikrobiální test krytů – *Escherichia coli*

Výsledky antimikrobiálního testu (Obrázek 34) proti *Escherichia coli* stanovily jako nejvíce aktivní kryt s obsahem tymiánu připravený metodou forcespinning (viabilita 2,22 %), dále elektrospinningový kryt s muškátovým oříškem (viabilita 19,73 %). Naopak žádná antimikrobiální aktivita byla zjištěna u elektrospinningových vláken s pepřem a tymiánem a u alginátového krytu s muškátovým oříškem.

Kompletní shrnutí výsledků antimikrobiálních účinků krytů byla zpracována do Tabulka 7. Připravené kryty měly obecně nejvyšší účinky proti gramnegativní bakterii *Serratia marcescens*. Dále většina krytů vykazovala antimikrobiální aktivitu nad 50 % (viabilita pod 50 %) proti grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus*. Proti *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli* byly z obecného pohledu kryty neúčinné. Z hlediska použitého materiálu krytů byly zjištěny nejlepší antimikrobiální účinky u chitosanových krytů.

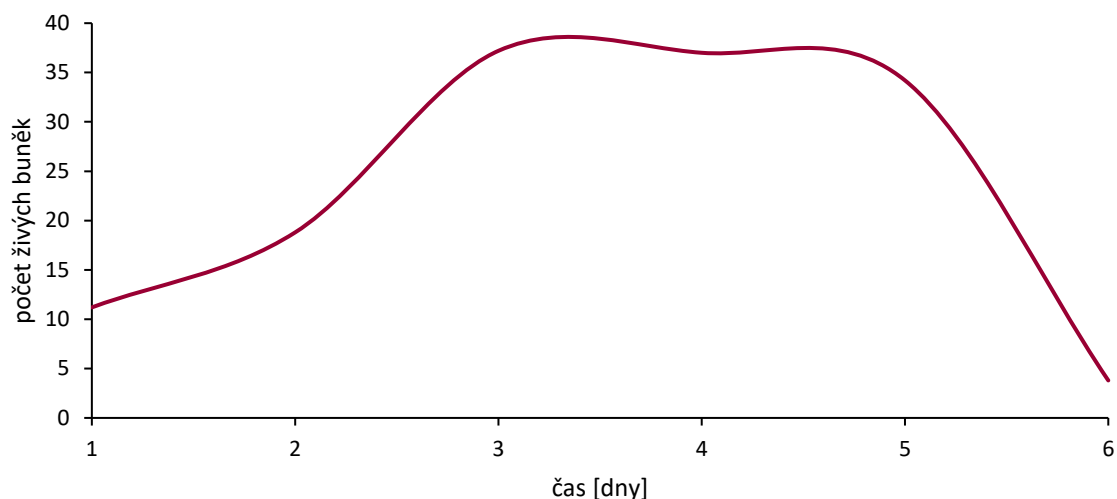
Tabulka 7: Shrnutí výsledků antimikrobiálních testů krytů

Typ krytu	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>
2% E + muš. oříšek	+	+	–	+++
2% E + pepř	+	++	–	--
2% E + tymián	–	+	–	--
2% E + zázvor	++	++	+	–
2% E + 1% Clotr.	–	++	++	–
2% E + 10% Clotr.	+++	+++	+	+++
4% F + muš. oříšek	+	+	--	–
4% F + pepř	–	+	–	+
4% F + tymián	–	+	--	+++
4% F + zázvor	+	+	–	–
4% F + 1% Clotr.	+	++	–	–
4% F + 10% Clotr.	+++	+++	++	+++
1% A + ampicilin	++	+++	–	+++
1% A + lysozym	+	–	+	+++
1% A + muš. oříšek	++	–	–	--
1% A + zázvor	+	+	–	–
1% Alginát	--	+	–	–
3% CH + ampicilin	+++	+++	–	+++
32% CH + lysozym	++	+++	–	–
3% CH + muš. oříšek	++	+++	–	–
3% CH + zázvor	+	+++	–	–
3% Chitosan	+++	+++	--	–

+++ - viabilita pod 20 %; ++ - viabilita mezi 20 a 30 %; + - viabilita mezi 30 a 50 %; -- - viabilita nad 50 %; --- - viabilita nad 100 %

5.8 Růstová křivka keratinocytů

Pomocí růstové křivky keratinocytů bylo ověřeno chování buněk v průběhu testů cytotoxicity, které ke svému správnému zhotovení potřebují životaschopné buňky v prostředí mikrotitračních destiček po dobu 3 dnů. Postup stanovení růstové křivky je uveden v kapitole 4.14.

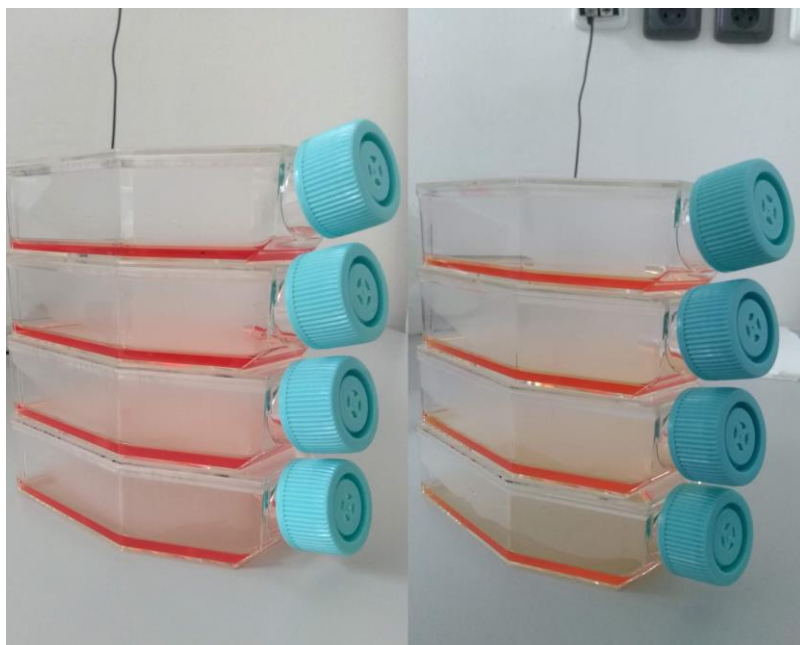


Obrázek 35: Růstová křivka keratinocytů HaCaT

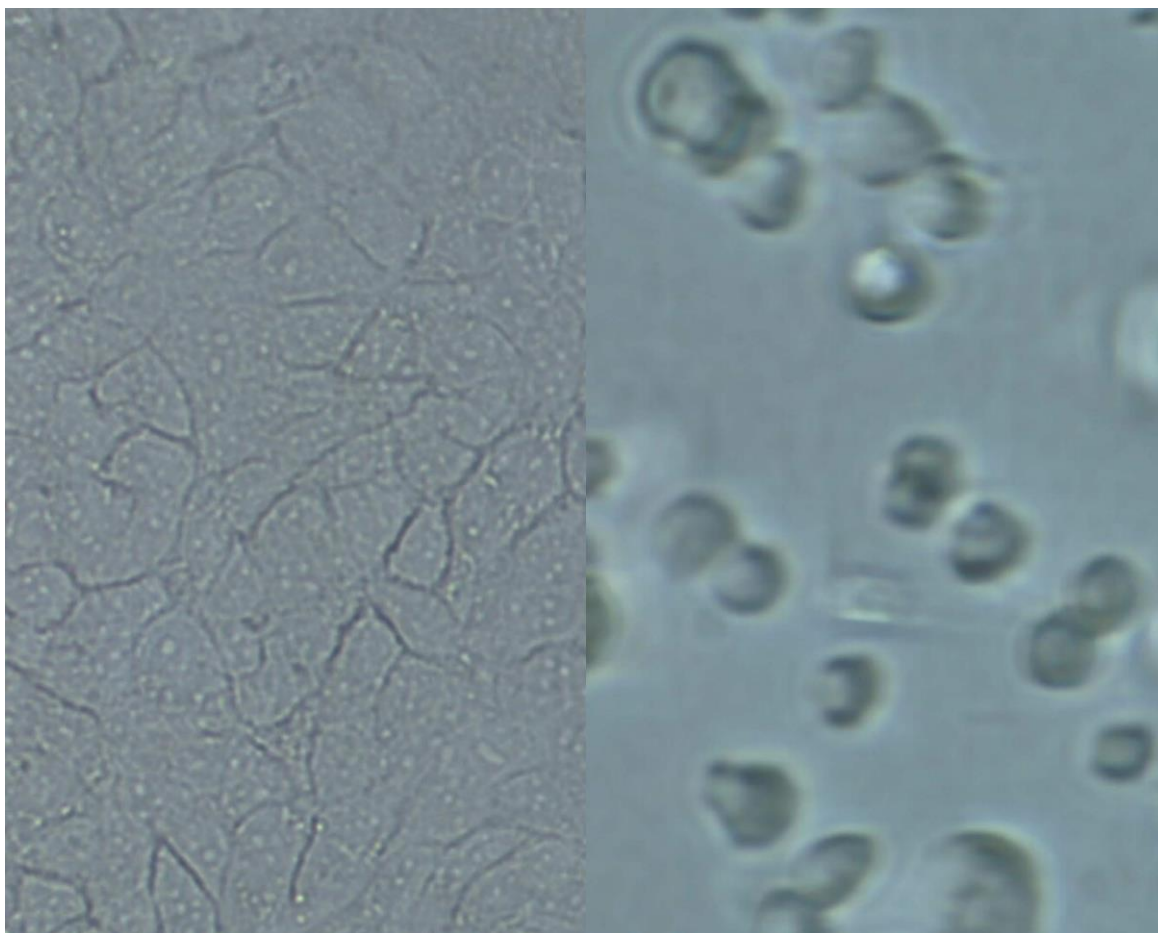
Z grafu růstové křivky keratinocytů (Obrázek 35) je viditelné, že do třetího dne se testované buňky nacházely ve fázi exponencionálního růstu. Mezi třetím až pátým dnem byly buňky ve stacionární fázi. Poté nastalo odumírání buněk. Testované buňky tedy vykazovaly ideální chování v době provedení MTT testu cytotoxicity.

5.9 MTT testy cytotoxicity

Testům cytotoxicity byly podrobeny vodné extrakty z muškátového oříšku a zázvoru a také nanovláknenné i nevláknenné kryty. Postupy, které byly ke zhotovení testů použity, jsou popsány v bodě 4.15. Obecně platí, že vzorky nejsou brány jako cytotoxické, pokud viabilita buněk neklesla pod hranici 60 %.



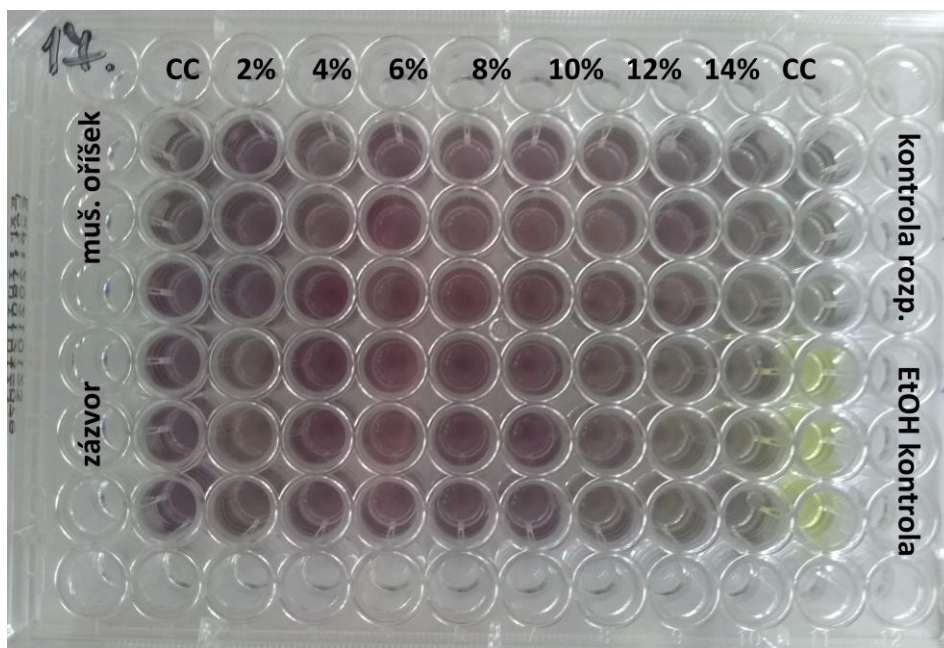
Obrázek 36: Srovnání barevné změny živného média – kultivační lahve s čerstvým médiem (vlevo), kultivační lahve s médiem po 2 dnech kultivace (vpravo)



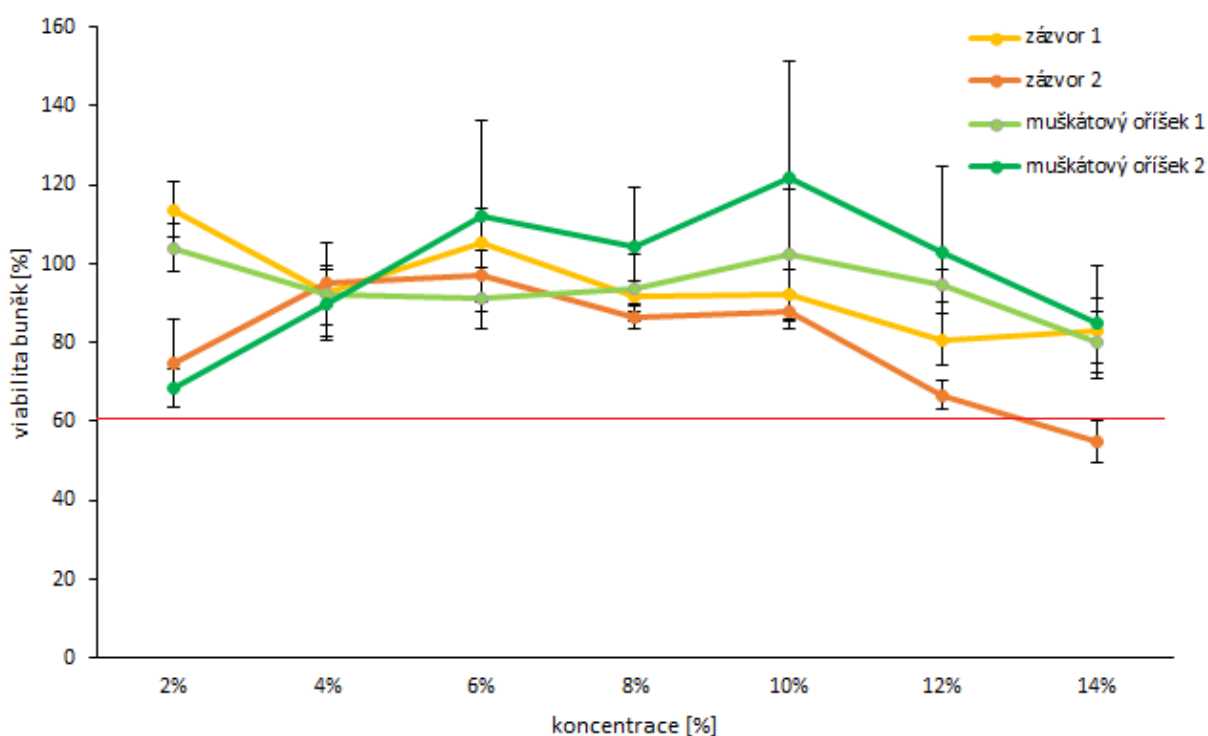
Obrázek 37: Lidské keratinocyty (vlevo, zvětšení 200x), keratinocyty po působení trypsinu (vpravo, zvětšení 400x)

5.9.1 Stanovení cytotoxicity vodných extraktů

Určení cytotoxicity vodných extraktů z muškátového oříšku a zázvoru bylo provedeno dle postupu v bodě 4.15. Stanovení bylo provedeno ve dvou opakování, výsledky testů byly zpracovány do grafu (Obrázek 39) a shrnuty do Tabulka 8.



Obrázek 38: Mikrotitrační destička se vzorky po ukončení MTT testu



Obrázek 39: Závislost viability buněk na koncentraci vodného extraktu

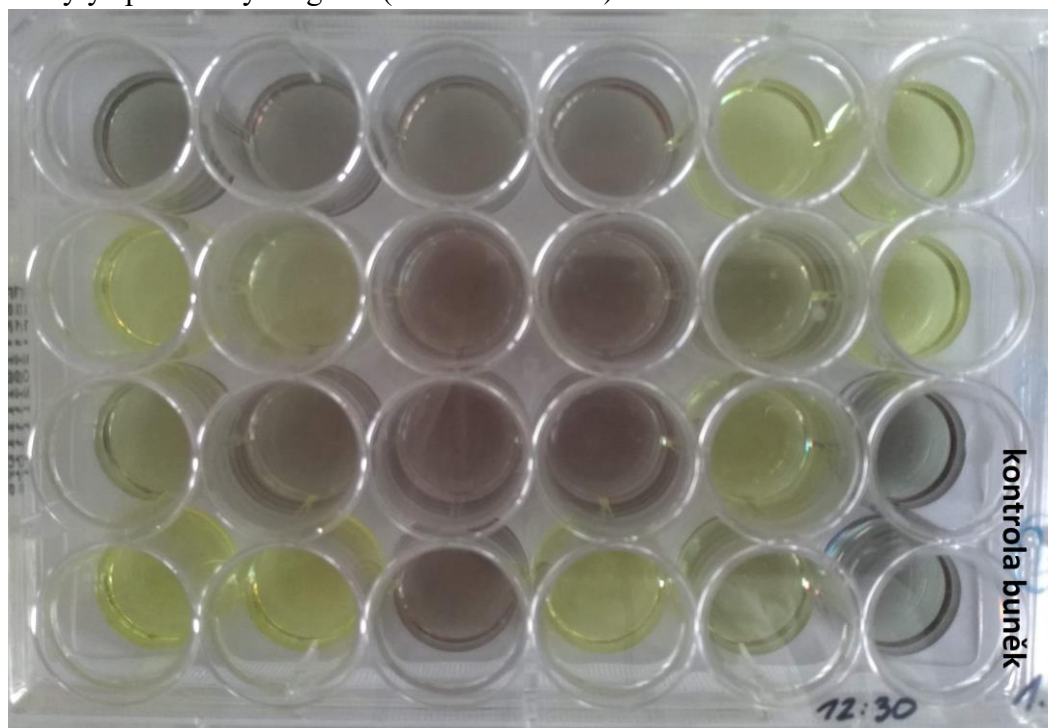
Z grafu (Obrázek 39) je viditelné, že pouze 14% zázvorový extrakt ve druhém opakování testu vykazoval hodnotu viability buněk pod 60 %, působil tedy cytotoxicky na buňky keratinocytů. U prvního MTT testu viabilita u všech vzorků nad 60 %. Rozdíly mezi testy je možné odůvodnit odchylkami v koncentraci buněk v jamkách, pomalejším růstem buněk během testu či nepřesnostmi při měření. Přesné hodnoty viability a obsah polyfenolických látek ve vzorcích jsou uvedeny v Tabulka 8.

Tabulka 8: Výsledky MTT testů cytotoxicity vodných extraktů

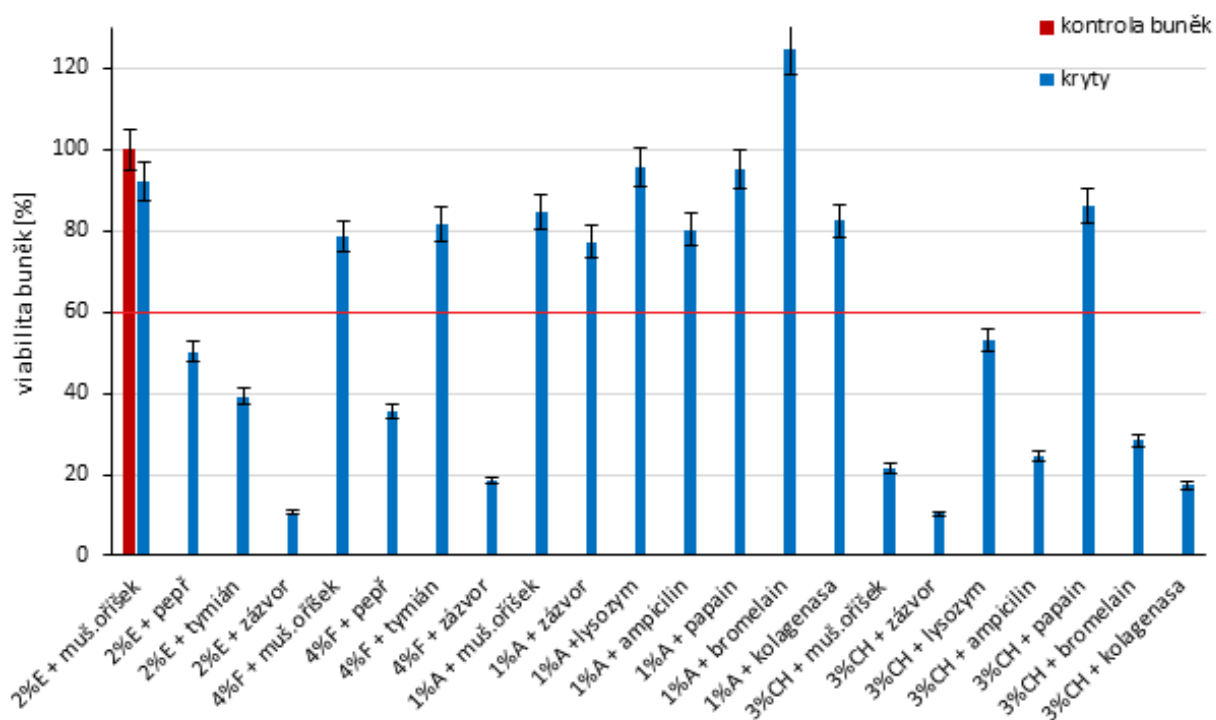
Vodný extrakt	koncentrace vzorku [%]	koncentrace polyfenolů [µg/g]	viabilita test č. 1 [%]	viabilita test č. 2 [%]
Zázvor	2	116,13±0,13	113,77±6,91	74,64±11,23
	4	232,26±0,26	92,92±12,39	95,31±3,38
	6	348,39±0,39	105,36±8,64	96,83±6,55
	8	464,53±0,53	91,84±3,81	86,41±3,11
	10	580,65±0,66	92,07±6,40	88,05±4,78
	12	696,78±0,79	80,69±6,48	66,68±3,62
	14	812,92±0,92	82,96±8,39	54,79±5,40
Muškátový oříšek	2	45,57±0,72	104,07±6,06	68,44±4,86
	4	91,14±1,45	92,13±7,49	90,00±8,30
	6	136,71±2,17	91,41±7,81	112,05±24,18
	8	182,28±2,89	93,80±8,51	104,49±14,72
	10	227,86±3,61	102,55±16,38	121,86±29,49
	12	273,43±4,34	94,56±4,06	102,74±21,94
	14	319,00±5,06	80,19±7,68	85,06±14,27

5.9.2 Stanovení cytotoxicity krytů

Stanovení cytotoxicity připravených krytů bylo provedeno podle postup z bodu 4.15. Testování bylo provedeno ve dvou opakováních. Ukázka hotového MTT testu krytů je k vidění v Obrázek 40. Výsledky jednotlivých testů byly vyjádřeny jako procento z absorbance kontroly buněk a byly zpracovány do grafů (Obrázek 41 a 42).

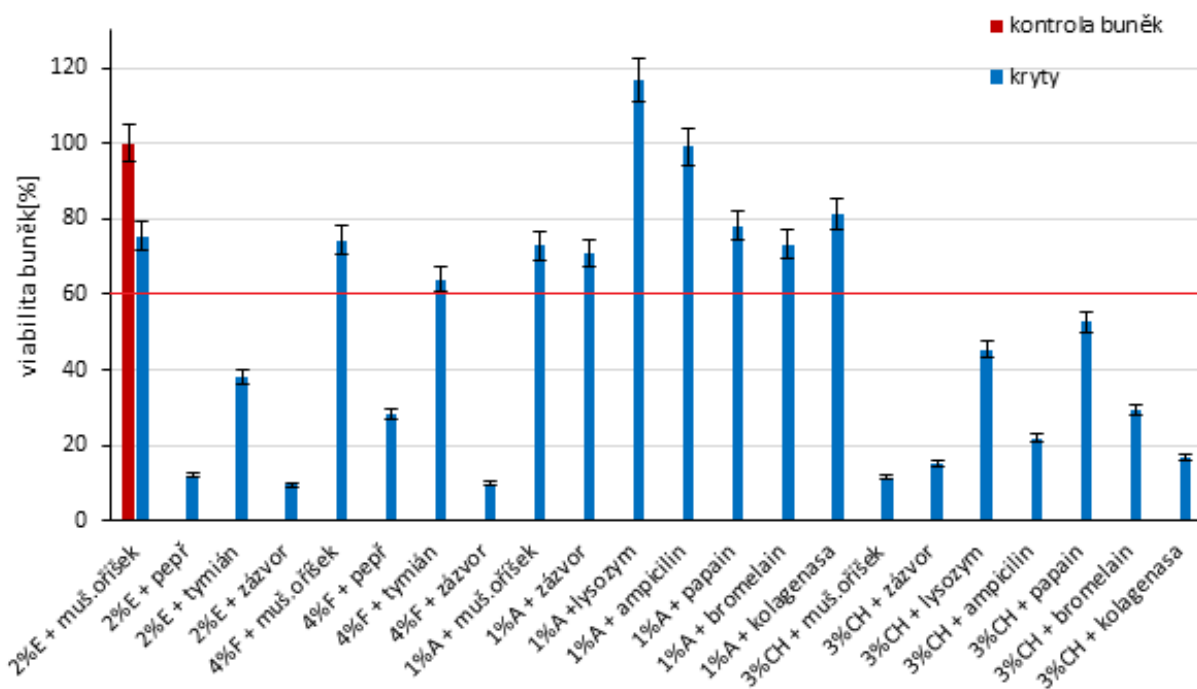


Obrázek 40: Mikrotitrační destička po ukončení MTT testu krytů



Obrázek 41: Výsledky MTT testu krytů č. 1

Na první pohled je z grafu (Obrázek 41) zřejmé, že velká část krytů nedosáhla hranici viability 60 % a tedy se chovala cytotoxicky. Nejvíce cytotoxické byly elektrospinnigové, forcespinnigové a chitosanové kryty s obsahem zázvoru. U žádného alginátového krytu nebyla zjištěna cytotoxicita, nejlepší výsledky pak byly stanoveny u krytu s přísadkou bromelainu.



Obrázek 42: Výsledek MTT testu krytů č. 2

U druhého opakování MTT testu cytotoxicity byly potvrzeny výsledky z prvního testování. Jedinou výjimkou byl chitosanový kryt s obsahem papainu, ten byl podle prvního testu vyhodnocen jako necytotoxický, v druhém testu ovšem už vykazoval cytotoxické chování.

Podrobné výsledky obou MTT testu jsou zpracovány v Tabulka 9.

Tabulka 9: Výsledky MTT testů cytotoxicity krytů

Typ krytu	Test 1		Test 2	
	m [mg]	viabilita [%]	m [mg]	viabilita [%]
2% E + muš. oříšek	2,60	92,16	2,40	75,49
2% E + pepř	3,20	50,09	3,90	12,14
2% E + tymián	2,30	39,18	2,50	38,04
2% E + zázvor	5,40	10,56	8,00	9,66
4% F + muš. oříšek	7,30	78,71	6,20	74,32
4% F + pepř	6,90	35,43	5,90	28,09
4% F + tymián	9,30	81,60	8,70	63,94
4% F + zázvor	7,20	18,57	15,50	9,95
1% A + muš. oříšek	59,60	84,84	60,10	72,86
1% A + zázvor	51,10	77,34	68,90	71,10
1% A + lysozym	70,00	95,57	48,70	116,61
1% A + ampicilin	34,30	80,24	54,90	99,20
1% A + papain	67,30	95,06	48,80	78,13
1% A + bromelain	60,50	124,87	52,70	73,30
1% A + kolagenasa	51,70	82,45	33,40	81,05
3% CH + muš. oříšek	101,10	21,47	119,50	11,41
3% CH + zázvor	131,20	10,39	91,50	15,36
3% CH + lysozym	48,70	52,98	45,60	45,35
3% CH + ampicilin	73,00	24,53	65,30	21,95
3% CH + papain	63,20	86,20	26,30	52,67
3% CH + bromelain	41,50	28,45	43,90	29,26
3% CH + kolagenasa	79,50	17,38	107,70	16,68

Výsledky MTT testů cytotoxicity připravených krytů byly zobecněny a shrnuty do Tabulka 10. Z krytů připravených metodou elektrospinning byla jako necytotoxická vyhodnocena pouze vlákna s obsahem extraktu z muškátového oříšku, ostatní vlákna byla cytotoxická. U vláken vyrobených forcespiningovou metodou byla jako necytotoxická stanovena ta s přídatkem muškátového oříšku a tymiánu. Cytotoxicita nanovlákných krytů s obsahem olejových extraktů může být způsobena vysokou koncentrací antimikrobiálně aktivních látek, které mohou v této koncentraci buňkám škodit. Všechny alginátové kryty vykazovaly necytotoxické chování, nejlepší výsledky byly určeny u krytů s lysozymem a bromelainem. Chitosanové kryty v obou testech vykazovaly cytotoxicitu a u krytu s obsahem papainu nedošlo ke shodě výsledků testů. Cytotoxické chování chitosanových krytů může být způsobeno antimikrobiální aktivitou chitosanu obecně, dalším možným vysvětlením je bobtnání chitosanu v médiu během testování.

Tabulka 10: Shrnutí výsledků MTT testů cytotoxicity krytů

Typ krytu	Test 1	Test 2	Shrnutí
2% E + muš. oříšek	+++	+	++
2% E + pepř	–	– –	– –
2% E + tymián	– –	– –	– –
2% E + zázvor	– –	– –	– –
4% F + muš. oříšek	+	+	+
4% F + pepř	– –	– –	– –
4% F + tymián	++	+	+
4% F + zázvor	– –	– –	– –
1% A + muš. oříšek	++	+	+
1% A + zázvor	+	+	+
1% A + lysozym	+++	+++	+++
1% A + ampicilin	++	+++	++
1% A + papain	+++	+	++
1% A + bromelain	+++	+	+++
1% A + kolagenasa	++	++	++
3% CH + muš. oříšek	– –	– –	– –
3% CH + zázvor	– –	– –	– –
3% CH + lysozym	–	– –	– –
3% CH + ampicilin	– –	– –	– –
3% CH + papain	++	–	+
3% CH + bromelain	– –	– –	– –
3% CH + kolagenasa	– –	–	– –

+++ - viabilita nad 90 %; ++ - viabilita mezi 90 a 80 %; + - viabilita 80 a 60 %; – - viabilita mezi 60 a 50 %; – – - viabilita pod 50 %

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na přípravu a optimalizaci přípravy bioaktivních krytů z nových materiálů a jejich vliv na humánní buňky. V práci byly připraveny nanovláknenné kryty na bázi PHB a nevláknenné kryty z alginátu a chitosanu. Kožní kryty byly funkcionalizovány přidavkem antibiotik (klotrimazol, ampicilin), proteolytických enzymů (papain, bromelain a kolagenasa), lysozymu a olejových nebo vodných extraktů z rostlin. Vybranými rostlinami byly kozinec, muškátový oříšek, pepř, tymián a zázvor.

Rostlinné extrakty byly charakterizovány z hlediska obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity. U krytů, které obsahovaly rostlinné extrakty, byla určena antioxidační aktivita, krátkodobá a dlouhodobá stabilita a antimikrobiální aktivita proti *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli*. U nevláknenných krytů s obsahem enzymů byla stanovena jejich proteolytická aktivita. Na závěr byly všechny připravené kryty otestovány na lidských keratinocytech a byla určena jejich cytotoxicita.

U připravených vodných i olejových extraktů bylo zjištěno nejvyšší množství polyfenolů u extraktů připravených ze zázvoru, koncentrace u vodného extraktu $5,81 \pm 0,01$ mg/g a u olejového extraktu $164,69 \pm 1,43$ mg/g. Největší antioxidační aktivitu opět vykazovaly extrakty ze zázvoru (vodný extrakt $5,64 \pm 0,01$ mg/g, olejový extrakt $38,15 \pm 0,03$ mg/g). Vodné extrakty byly otestovány pro své antimikrobiální účinky proti vybraným bakteriálním kmenům. Samotné extrakty nevykazovaly vysokou antimikrobiální aktivitu. Dále byly vodné extrakty podrobeny testům cytotoxicity, dle výsledků MTT testů nebyly připravené vodné extrakty určeny jako cytotoxické.

Po optimalizaci metod přípravy nanovláknenných krytů byla vybrána jako nejvhodnější koncentrace PHB pro metodu elektrospinningu koncentrace 2 % a pro metodu forcespinningu koncentrace 4 %. Připravená nanovláknna byla charakterizována z hlediska antioxidační aktivity. Nejvyšší antioxidační účinky byly určeny u vláken připravených elektrospinningem s obsahem zázvoru (418,25 mg/g) a s obsahem muškátového oříšku (352,58 mg/g). Krátkodobá stabilita vláken byla stanovena pomocí postupného uvolňování polyfenolů do modelových prostředí (voda, 50% ethanol, ethanol). V časovém rozmezí došlo k uvolnění největšího množství sledovaných látek obecně z nanovláken vyrobených elektrospinningovou metodou. Pomocí měření dlouhodobé stability byly jako nejvíce stabilní určeny elektrospinningová nanovláknna s obsahem zázvoru, u kterých byl stanoven zůstatek antioxidační aktivity po měsíci skladování na 93,33 % a forcespinningová nanovláknna s přidavkem muškátového oříšku, jejichž zůstatek antioxidační aktivity činil 92,21 %.

Na přípravu nevláknenných krytů byly po optimalizaci jako nejvhodnější koncentrace zvoleny 1% koncentrace alginátu a 3% koncentrace chitosanu. Nevláknenné kryty s obsahem vodných extraktů byly zcharakterizovány na antioxidační aktivitu a krátkodobou stabilitu. Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity byla zjištěna u chitosanových krytů s přidavkem zázvoru (7,77 mg/g). Krátkodobá stabilita byla sledována ve dvou modelových prostředích (voda, 50% ethanol) a byla stanovena jako množství postupně se uvolňujících polyfenolů. Do vodného prostředí došlo k největšímu uvolnění polyfenolů z chitosanového kryty s obsahem muškátového oříšku, do prostředí 50% ethanolu se uvolnilo nejvíce polyfenolů z chitosanového krytu s přidavkem extraktu ze zázvoru. U krytů s obsahem enzymů byla úspěšně určena proteolytická aktivita enkapsulovaných enzymů. Obecně vykazovaly vyšší proteolytickou

aktivitu kryty vyrobené z alginátu. Nejvyšší aktivita byla zjištěna u alginátového krytu s obsahem kolagenasy.

Součástí práce bylo dále určení antimikrobiální aktivity připravených krytů proti vybraným bakteriím. Připravené kryty měly nejvyšší účinnost proti gramnegativní bakterii *Serratia marcescens*. Dále vykazovala antimikrobiální aktivitu nad 50 % (viabilita buněk pod 50 %) proti grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus*. Proti bakteriím *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli* byly kryty neúčinné. Z obecného hlediska byly určeny jako nejvíce antimikrobiálně aktivní chitosanové kryty.

Závěrem této práce bylo podrobení připravených krytů testům cytotoxicity na humánních keratinocytech HaCaT. Z 8 nanovláknenných krytů funkcionalizovanými olejovými extrakty byly jako necytotoxické určeny pouze elektrospinningové kryty s obsahem muškátového oříšku a forcespiningové kryty s obsahem muškátového oříšku a tymiánu. Cytotoxicita zbylých nanovláken byla pravděpodobně zapříčiněna vysokou koncentrací antimikrobiálně aktivních složek. Alginátové kryty byly všechny stanoveny jako necytotoxické. Chitosanové kryty byly zjištěny jako cytotoxické, důvodem mohl být opět obecný antimikrobiální charakter chitosanu nebo značné bobtnání krytů v živném médium v průběhu testu.

Možným praktickým uplatněním poznatků této práce by mohli být nové kožní kryty pro otevřené i již uzavřené kožní rány. Nanovláknenné kryty by mohly napomáhat konečnému hojení uzavřených ran, zamezovat druhotným bakteriálním infekcím a zabraňovat tvorbám jizev. Nevláknenné kryty by mohly najít uplatnění při léčbě otevřených ran, kde by napomáhaly udržovat vhodné vlhké prostředí. Po další optimalizaci by mohly sloužit kryty jako systémy s postupným uvolňováním aktivních složek. Další výzkum v této oblasti by mohl být zaměřen na optimalizaci koncentrací a rozložení aktivních složek ve strukturách krytů, aby byla eliminována jejich cytotoxicita. Dále by mohly být zkoumány možnosti kombinací aktivních složek, které byly v této práci testovány samostatně. Také by mohly být zkoumány kryty s přídavkem proteolytických enzymů, které by byly imobilizovány na povrchu krytu, což by mohlo vést ke zvýšení aktivity enzymů.

Další možné uplatnění připravených krytů by mohlo být směřováno do kosmetického průmyslu, například na přípravu pleťových masek, kde by mohly být uplatněny antioxidační účinky krytů proti stárnutí pleti.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009, 532 s. : il. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [2] TAKEO, Makoto, Wendy LEE, Mayumi ITO a Makoto TAKEO. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* [online]. 2015, **5**(1), a023267-a023267 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1101/cshperspect.a023267. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/1658416469/>
- [3] HRABÁLEK, Alexander, et al. Akceleranty transdermální penetrace. *Chem. Listy*, 1999, 93.2: 107-119.
- [4] BOLZINGER, Marie-alexandrine, Stéphanie BRIANÇON, Jocelyne PELLETIER a Yves CHEVALIER. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. Elsevier, 2012, **17**(3), 156-165 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.02.001. ISSN 1359-0294. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1359029412000234>
- [5] MEHTA, Ratna. Topical and Transdermal Drug Delivery: What a Pharmacist Needs to Know. [online]. [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://inetce.com/articles/pdf/221-146-04-054-H01.pdf>
- [6] PANG, Calver, Amel IBRAHIM, Neil w BULSTRODE a Patrizia FERRETTI. An overview of the therapeutic potential of regenerative medicine in cutaneous wound healing. *International Wound Journal* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2017, **14**(3), 450-459 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1111/iwj.12735. ISSN 1742-4801. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/iwj.12735>
- [7] FAROKHI, Mehdi, Fatemeh MOTTAGHITALAB, Yousef FATAHI, Ali KHADEMHOSEINI a David I. KAPLAN. Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings. *Trends in Biotechnology* [online]. Elsevier, 2018, **36**(9), 907-922 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.04.004. ISSN 0167-7799. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0167779918301173>
- [8] RAJENDRAN, Subbiyan (ed.). *Advanced textiles for wound care*. Woodhead Publishing, 2018.
- [9] BHATIA, Saurabh. *Natural polymer drug delivery systems*. Springer international publishing, 2016.
- [10] GÓRECKA, Elżbieta, Magdalena JASTRZEBSKA. Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science* [online]. 2011 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: www.bfs.p.lodz.pl/get_file.php?fileId=10
- [11] PAUL, Willi; SHARMA, Chandra P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs*, 2004, 18.1: 18-23.

- [12] ZDRAVEVA, E., J. FANG, B. MIJOVIC a T. LIN. Electrospun nanofibers. *Structure and Properties of High-Performance Fibers*. 2017, **2017**(11), 267–300.
- [13] FRYCZKOWSKI, R., T. KOWALCZYK, E. LOING, et al. Nanofibres from polyaniline/polyhydroxybutyrate blends. *Synthetic Metals*. 2009, **159**(21): 2266-2268. DOI: 10.1016/j.synthmet.2009.09.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677909004809>
- [14] GUADALUPE, Eross, Daisy RAMOS, Namdev B. SHELKE, Roshan JAMES, Christian GIBNEY a Sangamesh G. KUMBAR. Bioactive polymeric nanofiber matrices for skin regeneration. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2015, **132**(16), n/a-n/a [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1002/app.41879. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/full/10.1002/app.41879>
- [15] MORSYA, R., M. HOSNYB, F. REICHAB a T. ELNIMRA. Developing a potential antibacterial long-term degradable electrospun gelatin-based composites mats for wound dressing applications. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2017, **2017**(114), 8–12 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381514817300354>
- [16] PEÑA, C., T. CASTILLO, A. GARCÍA, M. MILLÁN a D. SEGURA. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microbial Biotechnology* [online]. 2014, **7**(4), 278-293 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1111/1751-7915.12129. ISSN 1751-7915. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4241722/>
- [17] CHENG, Jie, Yesl JUN, Jianhua QIN a Sang-Hoon LEE. Electrospinning versus microfluidic spinning of functional fibers for biomedical applications. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2017, **2017**(114), 121-143 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.040. ISSN 0142-9612. Dostupné z: [https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0142961216305890](https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0142961216305890)
- [18] HOMAYONI, Homa, Seyed Abdolkarim Hosseini RAVANDI a Masoumeh VALIZADEH. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2009, vol. 77, issue 3, 656-661. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.02.008. ISSN 01448617.
- [19] RIAHI, Daniel N. Modeling and computation of nonlinear rotating polymeric jets during forcespinning process. *International Journal of Non-Linear Mechanics* [online]. Elsevier, 2017, **2017**(92), 1-7 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.ijnonlinmec.2017.03.004. ISSN 0020-7462. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0020746217301294>
- [20] ADÁMKOVÁ, Šárka. Hudba medicínské budoucnosti? Nanovlákná budou diagnostikovat i léčit. [online]. 11.1.2017. Dostupné z: <https://forum24.cz/lifestyle/2017/01/11/hudba-medicinske-budoucnosti-nanovlakna-budou-diagnostikovat-i-lecit/>

- [21] DRAHOŠ, Denis. S nanovlákný chce česká firma proniknout i do kosmetiky. [online]. 10.4.2018. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/denni-zpravy/z-domova/s-nanovlakny-chce-ceska-firma-proniknout-i-do-kosmetiky-486582>
- [22] VENUGOPAL, J. a S. RAMAKRISHNA. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. Totowa: Humana Press, 2005, **125**(3), 147-157 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1385/ABAB:125:3:147. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <https://link-springer-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1385/ABAB%3A125%3A3%3A147>
- [23] PEREIRA, Rúben, Anabela CARVALHO, Daniela C. VAZ, M.H. GIL, Ausenda MENDES a Paulo BÁRTOLO. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2013, vol. 52, s. 221-230 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.09.031. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813012003856>.
- [24] PEREIRA, Rúben, Ausenda MENDES a Paulo BÁRTOLO. Alginate/Aloe Vera Hydrogel Films for Biomedical Applications. *Procedia CIRP* [online]. 2013, vol. 5, s. 210-215 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.procir.2013.01.042. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212827113000437>
- [25] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy* [online]. 2009, č. 103 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf
- [26] CÁRDENAS, Galo, Gustavo CABRERA, Edelio TABOADA a Marguerite RINAUDO. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN ALKYL PHOSPHATE. *Journal of the Chilean Chemical Society* [online]. Sociedad Chilena de Química, 2006, **51**(1), 815-820 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.4067/S0717-97072006000100011. ISSN 0717-9707. Dostupné z: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-97072006000100011&lng=en&tlng=en
- [27] CALÓ, Enrica a Vitaliy v. KHUTORYANSKIY. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal* [online]. Elsevier, 2015, **65**(C), 252-267 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024. ISSN 0014-3057. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0014305714004091>
- [28] VALENTOVÁ, Eva. Co jsou antioxidanty?. [online]. [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/co-jsou-to-antioxidanty>
- [29] TIWARI, Brijesh K., Vasilis P. VALDRAMIDIS, Colm P. O'DONNELL, Kasiviswanathan MUTHUKUMARAPPAN, Paula BOURKE a P.J. CULLEN. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2009, **57**(14), 5987-6000 [cit. 2019-05-11]. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/full/10.1021/jf900668n>

- [30] ZHANG, Xiao-Xiao, Qian-Qian SHI, Duo JI, Li-Xin NIU a Yan-Long ZHANG. Determination of the phenolic content, profile, and antioxidant activity of seeds from nine tree peony (*Paeonia* section Moutan DC.) species native to China. *Food Research International* [online]. 2017, **2017**(97), 141–148 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917301072>
- [31] CURIN Y., Andriantsitohaina R: Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol Rep*, **57**(Suppl), 2005, s. 97-107.
- [32] COWAN, M. M. Plant products as microbial agents. *Clin. Microbiol. Reviews*. 1999, **12**(4), 564 – 582.
- [33] MORAVCOVÁ, J.: Biologicky aktivní přírodní látky, VŠCHT Praha 2003, s. 11-91.
- [34] Atlas rostlin.cz. [online]. 2010 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://listnatestromy.atlasrostlin.cz>
- [35] GUPTA, Ashish deep, Vipin kumar BANSAL, Vikash BABU a Nishi MAITHIL. Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans*Houtt). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* [online]. Elsevier B.V, 2013, **11**(1), 25-31 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.jgeb.2012.12.001. ISSN 1687-157X. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1687157X12000571>
- [36] MORDEN, Darryl. Pepper. *Hollywood Reporter* [online]. Hollywood: Prometheus Global Media, 2005, **388**(11), 37 [cit. 2019-05-11]. ISSN 00183660. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.chroma.2015.09.065>
- [37] UMAR, Muhammad Ihtisham, Aqeel JAVEED, Muhammad ASHRAF, Amjad RIAZ, Muhammad Mahmood MUKHTAR, Sheryar AFZAL a Rabia ALTAF. Polarity-Based Solvents Extraction of *Opuntia dillenii* and *Zingiber officinale* for In Vitro Antimicrobial Activities. *International Journal of Food Properties* [online]. Taylor, 2013, **16**(1), 114-124 [cit. 2017-03-11]. DOI: 10.1080/10942912.2010.517886. ISSN 10942912. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1080/10942912.2010.517886>
- [38] Klotrimazol. *BioLib* [online]. 2014 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z:<http://www.biolib.cz/cz/glossaryterm/dir0/id3938/?elang=SK>
- [39] BARRETT, Fred F., et al. Ampicillin in the treatment of acute suppurative meningitis. *The Journal of pediatrics*, 1966, 69.3: 343-353.
- [40] Chemická struktura ampicilinu. In: wikipedia [online] 2019 [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Ampicillin#/media/File:Ampicillin_structure.svg
- [41] K VELLARD, Michel. The enzyme as drug: application of enzymes aspharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2003, vol. 14, issue 4, s. 444-450 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00092-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166903000922>
- [42] RAMANDEEP, Kaur a Singh Sekhon BHUPINDER. Enzymes as drugs: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education and Research* [online]. 2012 [cit. 2019-05-11].

Dostupné z: <http://www.pcte.edu.in/jper/issues/2012-december-volume-3-issue-2/paper-6.pdf>

- [43] CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, Renata, Jacek KIJOWSKI a Grzegorz LEŚNIEWSKI. PROPERTIES AND APPLICATION OF EGG WHITE LYSOZYME AND ITS MODIFIED PREPARATIONS – A REVIEW. *Polish journal of food and nutrition sciences* [online]. 2008 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://journal.pan.olsztyn.pl/fd.php?f=930>
- [44] BENKERROUM, Noredine. Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2008 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/59680/47966>
- [45] SALAS, Carlos E., Marco T.R. GOMES, Martha HERNANDEZ a Miriam T.P.LOPES. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry* [online]. 2008, č. 69 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942208002331>
- [46] MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. [online]. 2001 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://www.volopharm.de/daten/Bromelain-%20biochemistry,%20pharmacology%20and%20medical%20use.pdf>
- [47] AMRI, Ezekiel a Florence MAMBOYA. PAPAINE, A PLANT ENZYME OF BIOLOGICAL IMPORTANCE: A REVIEW. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2012 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://core.kmi.open.ac.uk/download/pdf/9288275.pdf>
- [48] Collagenases for Tissue Dissociation. In: SERVA Electrophoresis GmbH [online]. [cit.2019-05-11]. Dostupné z: http://www.serva.de/servaWeb/www_root/documents/Collagenases%20for%20Tissue%20Dissociation_1.pdf
- [49] LIM, Daniel V., Rosalinde J. JACKSON, My Lien DAO. Cell-associated collagenolytic activity by group B streptococci. *Infection And Immunity*[online]. 1994 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://iai.asm.org/content/62/12/5647.full.pdf+html>
- [50] Collagenase. In: Worthington Biochemical Corporation: Worthington Enzyme Manual [online]. [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://www.worthington-biochem.com/cls/default.html>
- [51] NILGHAZ, Azadeh, Siew HOO, Wei SHEN, Xiaonan LU a Peggy P.Y. CHAN. Multilayer cell culture system supported by thread. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2018, 257, 650-657 [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.snb.2017.10.186. ISBN 10.1016/j.snb.2017.10.186. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400517321020>
- [52] VEJRAŽKA, M. Buněčné kultury. Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy [online]. Praha [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>

- [53] OSHIO, Tomoyuki, Mayumi KOMINE, Hidetoshi TSUDA, Shin-ichi TOMINAGA, Hirohisa SAITO, Susumu NAKAE a Mamitaro OHTSUKI. Nuclear expression of IL-33 in epidermal keratinocytes promotes wound healing in mice [online]. [cit. 2019-05-11]. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.10.008. ISBN 10.1016/j.jdermsci.2016.10.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181116308805>
- [54] RIEBELING, Christian, Jean-Pascal PIRET, Bénédicte TROUILLER, Inge NELISSEN, Christelle SAOUT, Olivier TOUSSAINT a Andrea HAASE. A guide to nanosafety testing: Considerations on cytotoxicity testing in different cell models. *NanoImpact* [online]. 2018, 10, 1-10 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1016/j.impact.2017.11.004. ISBN 10.1016/j.impact.2017.11.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452074817301180>
- [55] BONCLER, Magdalena, Marek RÓŻALSKI, Urszula KRAJEWSKA, Anna PODSEDEK a Cezary WATALA. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. 2014, 69(1), 9-16 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1016/j.vascn.2013.09.003. ISBN 10.1016/j.vascn.2013.09.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871913003006>
- [56] Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. *BioTek* [online]. Vermont USA, 2009 [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: https://www.biotek.com/assets/tech_resources/Quantification%20of%20Cell%20Viability%20App%20Note.pdf
- [57] LOWY, Franklin D.; HAMMER, Scott M. Staphylococcus epidermidis infections. *Annals of Internal Medicine*, 1983, 99.6: 834-839.
- [58] KUN, Lee Yuan (ed.). *Microbial biotechnology: principles and applications*. World Scientific Publishing Company, 2003
- [59] TROGL. NÁVODY PRO CVIČENÍ Z MIKROBIOLOGIE. 2008. Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/~trogl/NavodyMikrobiologie.pdf>. Skriptum. UJEP
- [60] JULÁK, Jaroslav. Úvod do lékařské bakteriologie. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 8024612704.
- [61] VOET, Donald a Judith G. VOET. Biochemie. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 8085605449
- [62] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 8020006001
- [63] LEIPOLD, F.: Inactivation of microorganisms by means of low temperature atmospheric pressure plasma. In 28th ICPIG, Praha, 15. – 20. července 2007 [online]. 2007 [cit. 2019-03-30].

- [64] Gramovo barvení. In: Skripta ke cvičení [online]. [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/gramovo_barveni.html
- [65] Micrococcus: Pathogen safety data sheet -infectious substances. 2011. *Public health agency of Canada* [online]. [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/micrococcus-eng.php>
- [66] Serratia spp.: Pathogen safety data sheet -infectious substances. 2011. *Public health agency of Canada* [online]. [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/serratia-spp-eng.php>
- [67] HAHN, Helmut, et al. (ed.). *Medizinische mikrobiologie und infektologie*. Springer-Verlag, 2009.
- [68] Biotechnology learning hub. *Biotechnology learning hub* [online]. 2014, 25.3.2014 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: http://biotechlearn.org.nz/themes/bacteria_in_biotech/e_coli_the_biotech_bacterium
- [69] TENOVER, F C, J M SWENSON, C M O'HARA a S A STOCKER. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *Journal of clinical microbiology* [online]. 9506, **33**(6), 1524 [cit. 2019-03-12]. ISSN 00951137. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228208/>
- [70] Antimicrobial susceptibility testing protocols. *Scitech Book News* [online]. Portland: Ringgold, 2007, *31*(3), 414 [cit. 2019-03-12]. ISSN 01966006. Dostupné z: http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/200147135?rfr_id=info%3Axri%2Fsid%3Aprim

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Alginát
ABTS	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CC	Cell control (kontrola buněk)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E	Elektrospinning
F	Forcespinning
FBS	Fetální bovinné sérum
HaCaT	Human keratinocytes cell line
CH	Chitosan
LB	Lysogeny broth
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NAD(P)H	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NB	Nutrient Broth
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
PHB	Polyhydroxybutyrát
ROS	Reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
SDS	Dodecylsulfát sodný
UV	Ultrafialové