



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 NANOČÁSTIC A NANOVLÁKEN S OBSAHEM ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK

PREPARATION OF NANOPARTICLES AND NANOFIBERS WITH ANTIMICROBIAL COMPONENTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Kubišová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Skoumalová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1642/2021

Akademický rok: 2021/22

Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie

Studentka: **Bc. Veronika Kubišová**

Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace

Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace

Vedoucí práce: **Ing. Petra Skoumalová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Příprava nanočástic a nanovláken s obsahem antimikrobiálních látek

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Veronika Kubišová
studentka

Ing. Petra Skoumalová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Tato diplomová práce pojednává o problému, kterým je nedostatečná současná terapie ran a představuje řešení v podobě krytů ran na bázi nanomateriálů. Konkrétně je zaměřena na vývoj a charakterizaci různých nanovlákných materiálů s integrovanými liposomovými částicemi, které by mohly sloužit jako zdroj terapeutických látek a být využitelné právě v oblasti terapie ran.

Rešerše v úvodní části práce byla nejprve zaměřena na zmíněný problém, kterým jsou nedostatky stávajících konvenčních obvazových materiálů. Nebyl opomenut ani popis lidské kůže z anatomického a funkčního hlediska, a ani samotný proces hojení ran. Představeny byly i různé typy krycích materiálů. Velká část však byla zaměřena na nanomateriály a jejich využití právě v oblasti terapie kožních poranění. Zmíněnými nanomateriály byly především liposomové částice a nanovlákná, neboť experimentální část práce byla zaměřena právě na tyto struktury. Popis se zabýval jak samotnou charakteristikou těchto struktur, tak i biopolymery použitelnými k jejich přípravě. Cílem však byla příprava nanovláken o obsahu liposomů, proto byl popsán způsob tvorby takového systému. Nedílnou součástí krycích materiálů jsou také různá terapeutika, zejména taková, která potlačí vznik infekce a sníží bolest v ráně, rešerše byla proto zaměřena na antibiotikum ampicilin a analgetikum ibuprofen.

Experimentální část byla věnována samotné problematice výroby nanovláken s liposomy a také kvalitativnímu prokázání přítomnosti liposomů v elektrostaticky připravovaných nanovláknách. Vybranými polymerními složkami těchto systémů byl polyhydroxybutyrát (PHB) a želatina. Nanovlákná a liposomové částice (i kombinované liposomy s PHB) byly však nejprve připraveny v samotné formě a charakterizovány zejména z hlediska postupného uvolňování léčivých látek. Získané výsledky byly pak porovnány s výsledky dodávání terapeutik prostřednictvím kombinovaných nanovlákných struktur s liposomy. U těchto kombinovaných struktur bylo cílem dosáhnout synergie v oblasti dodávání léčiv mezi těmito systémy. Snahou práce bylo vytvořit kryt z biomateriálů s řízeným uvolňováním léčiv. Léčivý obsahem v těchto materiálech byl již zmíněný ampicilin a ibuprofen. Důležitou součástí práce bylo pak stanovení bezpečnosti připravených materiálů, testovány byly z hlediska cytotoxicity, kdy provedeným testem byl MTT test a LDH test. A samotná schopnost nanovláken v oblasti hojení ran byla pak sledována v rámci scratch testu neboli testu „hojení ran“.

Na závěr práce jsou uvedena doporučení pro další práce, které na toto téma budou navazovat.

Klíčová slova

liposomy, nanovlákná, terapie ran, kryty ran, polyhydroxybutyrát, želatina, ampicilin, ibuprofen, keratinocyty

Abstract

This thesis addresses the problem of inadequate current wound therapy and presents a solution in the form of nanomaterial-based wound dressings (coverings). Specifically, it focuses on the development and characterization of various nanofibrous materials with integrated liposome particles that could serve as a source of therapeutic agents and be useful specifically in the field of a wound therapy.

The review in the introductory part of the thesis first focused on the mentioned problem, which describes the shortcomings of existing conventional dressing materials. A description of human skin from an anatomical and functional point of view was not omitted, nor was the wound healing process itself. Different types of covering materials were also presented. However, a large part was focused on nanomaterials and their use in the field of the skin wound therapy. The nanomaterials mentioned were mainly liposome particles and nanofibres, as the experimental part of the work was focused on these structures. The description dealt with the characterization of these structures as well as the biopolymers used for their preparation. However, the aim was to prepare nanofibers with liposome content, so the method of forming such systems was described. Various therapeutic agents are also an integral part of the covering materials, especially those that suppress the development of infection and reduce wound pain; therefore, the search focused on the antibiotic ampicillin and the analgesic ibuprofen.

The experimental part was devoted to the actual production of nanofibers with liposomes and also to the qualitative demonstration of the presence of liposomes in electrostatically prepared nanofibers. The selected polymeric components of these systems were polyhydroxybutyrate (PHB) and gelatine. However, the nanofibers and liposome particles (as well as combined liposomes with PHB) were first prepared in their own form and characterized mainly in terms of the gradual release of the drug substances. The results obtained were then compared with those of therapeutic drug delivery via combined nanofibrous structures with liposomes. For these combined structures, the aim was to achieve synergy in drug delivery between these systems. The aim of this work was to create a biomaterial covering with the controlled drug release. The drugs contained in these materials were the aforementioned ampicillin and ibuprofen. An important part of the work was then to determine the safety of the prepared materials which were tested for cytotoxicity, where the tests performed were MTT test and LDH test. And the actual wound healing ability of the nanofibers was then monitored in a scratch test or a "wound healing" test.

At the end of the paper, recommendations for future work on this topic are given.

Key words

liposomes, nanofibers, wound therapy, wound dressings, polyhydroxybutyrate, gelatin, ampicillin, ibuprofen, keratinocytes

KUBIŠOVÁ, Veronika. *Příprava nanočástic a nanovláken s obsahem antimikrobiálních látek*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138748>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Skoumalová.

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

Mé poděkování patří především vedoucí této diplomové práce Ing. Petře Skoumalové, Ph.D. za vstřícnost, odborné vedení a cenné rady, které mi poskytla při vypracování této práce. Na tomto místě bych chtěla také poděkovat Ing. Lucii Dzurické za její přátelský přístup, ochotu, pomoc a čas, který mi věnovala při řešení experimentální části. V neposlední řadě bych touto cestou poděkovala mé rodině za umožnění studia a velkou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Anatomie a fyziologie lidské kůže	10
2.1.1	Pokožka (epidermis)	10
2.1.2	Škára (dermis)	11
2.1.3	Podkožní vazivo (subcutis)	11
2.2	Kožní poranění	12
2.2.1	Typy ran	12
2.2.2	Hojení ran	12
2.3	Terapie ran	13
2.3.1	Klasifikace krytů na rány	14
2.4	Terapie ran s využitím nanomateriálů	14
2.4.1	Definice a klasifikace nanomateriálů	14
2.4.2	Kryty ran na bázi nanomateriálů	16
2.5	Nanočástice – liposomy	16
2.5.1	Klasifikace liposomů	18
2.5.2	Metody pro přípravu liposomů	18
2.5.3	Materiály pro přípravu liposomů	19
2.6	Nanovlákná	19
2.6.1	Metody pro přípravu nanovláken	19
2.6.2	Inkorporace léčivých látek do nanovláken	22
2.6.3	Materiály pro přípravu nanovláken	23
2.7	Nanovlákná s inkorporovanými liposomy	25
2.8	Aktivní látky v krycích materiálech na rány	26
2.8.1	Látky s antimikrobiálním účinkem	26
2.8.2	Látky tlumící bolest	26
2.9	Testy bezpečnosti krycích materiálů	27
2.9.1	Testy cytotoxicity <i>in vitro</i>	28
2.9.2	Test „hojení ran“ <i>in vitro</i>	29
3	CÍL PRÁCE	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	Použité mikroorganismy	32

4.2	Použité buněčné kultury.....	32
4.3	Použité přístroje a pomůcky	32
4.4	Použité chemikálie	32
4.4.1	Použité chemikálie pro přípravu a charakterizaci liposomových částic	32
4.4.2	Použité chemikálie pro přípravu a charakterizaci nanovláknenných krytů ..	32
4.4.3	Použité chemikálie pro kultivaci mikroorganismů	33
4.4.4	Použité chemikálie při testech na humánních buňkách	33
4.4.5	Použité aktivní látky	33
4.5	Příprava liposomových částic	33
4.6	Charakterizace liposomových částic	34
4.6.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	34
4.6.2	Stanovení velikosti a distribuce velikosti částic	36
4.6.3	Stanovení elektrokinetické stability částic.....	36
4.6.4	Stanovení postupného uvolňování aktivních látek z částic.....	36
4.7	Příprava a optimalizace přípravy nanovláknenných krytů.....	37
4.7.1	Optimalizace přípravy alginátových krytů.....	38
4.7.2	Optimalizace přípravy krytů na bázi PHB	39
4.7.3	Optimalizace přípravy želatinových krytů.....	40
4.8	Charakterizace připravených nanovláknenných krytů	41
4.8.1	Stanovení stability vláken	41
4.8.2	Stanovení postupného uvolňování aktivních látek z krytů	41
4.9	Příprava nanovláknenných krytů s inkorporovanými liposomy.....	42
4.9.1	Kryty na bázi PHB s obsahem liposomových částic	42
4.9.2	Želatinové kryty s obsahem částic	43
4.10	Charakterizace nanovláknenných krytů s inkorporovanými liposomy.....	43
4.10.1	Postupného uvolňování aktivních látek z krytů s obsahem liposomů	43
4.11	Antimikrobiální stanovení.....	44
4.11.1	Příprava živných médií a kultivace vybraných bakteriálních kmenů	44
4.11.2	Bujónová diluční metoda	44
4.12	Stanovení bezpečnosti připravených materiálů	44
4.12.1	Příprava materiálů pro testování bezpečnosti	45
4.12.2	Kultivace humánních keratinocytů	45
4.12.3	MTT test.....	45

4.12.4	LDH test	46
4.12.5	Scratch test neboli test „hojení ran“	47
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	48
5.1	Charakterizace připravených liposomových částic	48
5.1.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	48
5.1.2	Stanovení velikosti	50
5.1.3	Stanovení elektrokinetické stability	51
5.1.4	Kontrola uvolňování aktivních látek z částic	52
5.2	Příprava a optimalizace přípravy nanovláknenných krytů.....	59
5.2.1	Alginátové kryty	59
5.2.2	Kryty na bázi PHB	61
5.2.3	Želatinové kryty	63
5.3	Charakterizace nanovláknenných krytů	64
5.3.1	Stanovení stability nanovláknenných krytů	64
5.3.2	Kontrola uvolňování aktivních látek z nanovláknenných krytů	65
5.4	Příprava nanovláknenných krytů s inkorporovanými liposomy.....	69
5.4.1	Kryty na bázi PHB s obsahem liposomů	69
5.4.2	Želatinové kryty s obsahem liposomů	70
5.5	Charakterizace nanovláknenných krytů s inkorporovanými liposomy	71
5.5.1	Kvalitativní důkaz přítomnosti liposomů.....	71
5.5.2	Kontrola uvolňování aktivní látek z krytů s obsahem liposomů.....	72
5.6	Antimikrobiální aktivita.....	73
5.7	Stanovení bezpečnosti připravených materiálů	75
5.7.1	MTT test.....	75
5.7.2	LDH test.....	77
5.7.3	Scratch test (test „hojení ran“)	78
6	ZÁVĚR.....	81
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	84
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	92
9	PŘÍLOHY	93

1 ÚVOD

Nanotechnologie, využívající jedinečných vlastností materiálů v nanoměřítku, jsou tématem dnešní doby. Nalezly uplatnění v mnoha průmyslových oblastech. Obohatily jak kosmetický průmysl, medicínu, elektroniku, tak i spoustu dalších oblastí. Výhod nanotechnologií může tak využívat každý z nás. Zejména v oblasti zdravotní péče způsobily obrovský převrat. Díky nanotechnologiím jsou nám nabízeny pokročilejší způsoby léčby různých onemocnění, rozšířily se možnosti zobrazovacích metod a také došlo mimo jiné ke zlepšení farmakokinetických vlastností terapeutik. Zájem o nanomateriály stoupá i v kožním tkáňovém inženýrství, kde se zaměřují na vývoj a přípravu krytů ran. Důvod zájmu o tuto oblast tkví zejména v důležitosti této tkáně, a to jak z funkčního, tak i estetického hlediska. Kromě toho, dalším a velmi významným důvodem, proč je oblast terapie ran klíčovou oblastí výzkumu, je právě nedostatečná a zdaleka neuspokojivá současná terapie ran. Kožními poraněními trpí tisíce lidí ročně a každý z nás si během svého života způsobil nespočetná množství poranění, od lehkých oděrek až po ta těžká. Ale i bez ohledu na intenzitu rány, je důležité o ni rychle a pokud možno profesionálně pečovat. Současné terapie ran však neposkytují dobrý klinický výsledek, a to ani strukturálně a ani funkčně. Klasické obvazové materiály, které známe, působí pouze jako pasivní bariéra, jejich jedinou funkcí je kompenzace chybějící ochranné bariéry v místě rány. Proto je snahou nahradit je technologicky vyspělejšími, takovými, které jsou schopny vytvořit ochranné prostředí a zároveň umožňují přenos aktivních látek. Správný obvaz by měl totiž zajistit prostředí, které je udržováno vlhké, zamezí hromadění exsudátů z rány a mimo jiné stimuluje správné prokrvení. A právě jako technologicky vyspělejší mohou posloužit nanomateriály. Použití nanomateriálů v oblasti terapie ran se velmi rychle rozšiřuje. Hlavní důvod jejich zvýšeného požívání v této oblasti lze připsat především fyzikálně-chemickým vlastnostem nanomateriálů. Vyznačují se totiž velkým povrchem a vysokým poměrem plochy povrchu k objemu, navíc jejich velikost a tvar přispívá k jejich použití v terapii ran, neboť hrají roli v aktivním dodávání léčiv. Když dojde k narušení tkáně, bakterie mohou proniknout až do spodních tkání, což může vést k život ohrožujícím infekcím. K řešení takových patologických stavů je nezbytná účinná léčba v podobě antibiotik. Avšak shledáváme nevýhodu v konvenční antibiotické terapii, kterou je nedostatečné dodávání antibiotik do cílových buněk. Nanomateriály, jako jsou například nanočástice a nanovlákna, dokáží tento problém vyřešit.

Tato práce je inspirována snahou o tvorbu různých nanovlákných krytů s integrovanými liposomovými částicemi, které by mohly sloužit jako zdroj antimikrobiálních látek a být použitelné v oblasti terapie ran.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Anatomie a fyziologie lidské kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla a přibližně 16 % celkové tělesné hmotnosti člověka je tvořeno tímto orgánem. Kůže představuje primární rozhraní mezi vnitřním a vnějším prostředím, působí tedy jako počáteční bariéra chránící tělo před řadou stresových faktorů vnějšího prostředí. Chrání jej před chemikáliemi, podílí se na metabolických i imunologických procesech a je první obrannou linií proti patogenním mikroorganismům. Udržuje také homeostázu a to tím, že zabraňuje neregulované ztrátě vody i elektrolytů. Anatomie lidské kůže je dobře charakterizována a existuje jasný vztah mezi strukturou a funkcí kůže [1, 2].

Kůže se skládá ze tří hlavních zón: pokožky (epidermis), škáry (dermis) a podkožního vaziva (subcutis) [3].

2.1.1 Pokožka (epidermis)

Epidermis je stratifikovaný epitel tvořený převážně keratinocyty (95 % buněk). Zbývajících 5 % tvoří melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. Epidermis je rozdělena do čtyř hlavních vrstev: bazální, trnové, zrnité a zrohovatělé. Bazální vrstva spočívá na bazální membráně v dermoepidermální junkci (viz. kapitola 2.1.1.1). Skládá se z mitoticky aktivních buněk (jedné vrstvy keratinocytů), které proliferují, povrchově migrují a postupně se diferencují za vzniku stratifikované epidermis. Bazální vrstva je charakterizována expresí keratinu 14 a dceřiné buňky migrující směrem k povrchu prochází charakteristickým přechodem mezi keratinem 5/14 a keratinem 1/10. Při této cestě tyto buňky prochází rovněž řadou morfologických změn. Když se dceřiné buňky pohybují směrem nahoru a diferencují se na trnovou vrstvu, ztrácejí tyto buňky schopnost dělit se, zvětšovat se a navázat mezibuněčná spojení. Keratinocyty se prodlužují, zplošťují a vytváří granulovanou vrstvu, která je charakterizována přítomností keratohyalinu a lamelárních tělísek. Keratohyalinní granule obsahují proteinové složky, které jsou klíčové pro tvorbu zrohovatělé obálky. Keratinocyty jsou terminálně diferencovány na korneocyty, které pak tvoří *stratum corneum*. Jedná se o vrstvu o tloušťce 10 až 20 μm , která je složena z terminálně diferencovaných, zploštělých korneocytů oddělených lipidy (mastné kyseliny, steroly a ceramidy). A právě bariérová funkce kůže je připisována zejména *stratum corneum* [1, 3].

Dalšími buňkami nacházející se v epidermis jsou zmíněné melanocyty. Jedná se o dendritické buňky nacházející se rovněž v bazální vrstvě. Melanocyty syntetizují melanin, který je uložen v subcelulárních organelách zvaných melanosomy. Melanin je následně transportován do sousedních bazálních keratinocytů. Každý melanocyt dodává melanin přibližně 30–40 okolním keratinocytům. Melanin lokalizovaný v melanosomech chrání jádra bazálních keratinocytů před škodlivým UV zářením. Na základě počtu a velikosti melanosomů a také povahy melaninu je dáno zbarvení kůže [3].

V epidermis dále nalézáme buňky Langerhansovy a Merkelovy. Langerhansovy buňky jsou dendritické buňky pocházející z kostní dřeně a patří mezi antigen prezentující buňky. Tyto buňky nalézáme v celé epidermis. Merkelovy buňky v epidermis působí pak jako mechanoreceptory [3].

2.1.1.1 Dermoepidermální junkce

Dermoepidermální spojení, jak už název napovídá, nalézáme na rozhraní epidermis a dermis. Epidermis je od dermis oddělena bazální membránou a skládá se ze složité sítě makromolekul spojujících intermediární vlákna bazálních keratinocytů s kolagenovými vlákny dermis. Hlavní funkcí proteinů a glykoproteinů bazální membrány je zajištění adheze mezi epidermis a dermis. Vady těchto proteinů mají pak za následek křehkost kůže a tvorbu puchýřků. Takže zatímco bazální membrána poskytuje strukturální podporu epidermis, drží také pohromadě epidermis a dermis [3, 4].

2.1.2 Škára (dermis)

Dermis je vrstva pojivové tkáně mezenchymálního původu umístěná těsně pod bazální membránou a zasahuje až do podkožního vaziva (subcutis). Dermis má převážně vláknitou strukturu, obsahuje kolagenová i elastinová vlákna. Mezi vláknitými složkami nalézáme také glykosaminoglykany, jako je kyselina hyaluronová, proteoglykany a glykoproteiny [5, 6].

Dermis je rozdělena do dvou hlavních vrstev: papilární a retikulární. Papilární vrstva je horní částí dermis a zasahuje svými výběžky (papilami) do epidermis. Papilární dermis je tak v kontaktu s bazální membránou a je bohatě zásobena cévami. V oblasti papil se nacházejí totiž kapilární kličky zajišťující zásobování bezcévné epidermis. V této oblasti nalézáme také volná nervová zakončení, smyslové receptory a iniciální lymfatické cévy. Retikulární vrstva je hlavní částí dermis, jedná se o silnou vrstvu pojivové tkáně, která je v kontaktu s podkožím [3, 5, 6].

Hlavní složkou dermis je kolagen. Konkrétně je zde v hojné míře zastoupen kolagen typu I a typu III. Kromě kolagenu, hrají důležitou roli ve struktuře rovněž elastická vlákna, jejichž hlavními složkami jsou elastinové a fibrillinové mikrofibrily. Na rozdíl od kolagenu umožňuje biochemická konfigurace elastinu roztahování a zpětné odvíjení vláken. Silná elastická vlákna nalézáme v retikulární oblasti dermis. Za zmínku stojí i další podtypy elastických vláken: elauninová a oxytalanová vlákna. Elauninová vlákna jsou vlákna horizontálně uspořádána a nacházejí se poblíž spojení papilární a retikulární dermis. Oxytalanová vlákna jsou naopak kolmá elastická vlákna, která se vyskytují v papilární dermis [6].

V dermis začínají lymfatické cévy, vyskytují se zde senzitivní nervová zakončení s receptory: Merkelova tělíska, Meissnerova tělíska, Krauseho receptory, Ruffiniho tělíska, Vater-Paciniho tělíska a volná nervová zakončení. V dermis jsou také uloženy cévy, mazové žlázy, malé a velké potní žlázy a vlasové folikuly. V pojivové tkáni dermis se nachází mnoho typů buněk, včetně fibroblastů, makrofágů, adipocytů, žírných buněk, Schwannových buněk a buněk kmenových. Fibroblasty jsou hlavními buňkami dermis. Žírné buňky se typicky nacházejí v okolí dermálních kapilár [5, 6].

2.1.3 Podkožní vazivo (subcutis)

Podkoží je nejhlubší vrstvou kůže, která je složena z řídké vazivové tkáně a je mezenchymálního původu stejně jako dermis. Vazivová část tvoří závěsný aparát pro tukovou tkáň plnící funkci modelující, izolující a samozřejmě depotní. Hlavní součástí této nejvnitřnější vrstvy kůže jsou lipocyty a houbová pojivová tkáň. Lipocyty jsou uspořádány do tukových lalůček, které jsou od sebe odděleny vláknitými septy. Svazky vláken vycházející z dermis do podkoží pak posilují spojení mezi těmito dvěma oddíly. Lalůčky lipocytů tvoří vrstvu, která

funguje jako tlumič nárazů na vazivový obal svalů a na samotnou svalovou tkáň. Tuková tkáň je zásobena velkým množstvím krevních cév [3, 5].

2.2 Kožní poranění

Jak už bylo v předchozích kapitolách zmíněno, kůže jakožto největší orgán lidského těla plní řadu důležitých funkcí, je považována za tělesnou bariéru. A protože se jedná o nejsvrchnější vrstvu těla, je tak v neustálém kontaktu s vnějším prostředím, čímž se stává vysoce náchylnou k poškození. K poranění kůže může dojít různými způsoby. Obecně platí, že rány, obzvláště ty vážné, vyžadují zdravotní péči. Důležitost se klade především na správné ošetření rány a pravidelnou kontrolu, zejména pokud je rána krvácející, hluboká nebo infekční. Aplikace obvazů, resp. krytí ran hraje pak velmi zásadní roli při hojení ran a prevenci infekcí [7, 8].

2.2.1 Typy ran

Rány na kůži mohou vzniknout z různých příčin, jmenovitě operací, zraněním, vnějšími faktory (např. popálením nebo říznutím) nebo patologickými stavy, jako je cukrovka nebo cévní onemocnění. Uvedená poškození se pak dělí na akutní a chronická, a to v závislosti na jejich příčinách a následcích. Akutní rány, jako je lehká oděrka, poranění nožem, lehké opaření a porušení kůže, se hojí rychle. Tento typ ran totiž obvykle prochází organizovaným a vhodným regeneračním procesem, jehož výsledkem je trvalé obnovení anatomické i funkční integrity. Naopak u chronických ran, jako jsou ulcerózní rány, diabetický vřed, chronické defekty způsobené radiačním zářením, hluboké popáleniny nebo opaření, proces hojení trvá mnohem déle. Chronické rány nejsou schopny dosáhnout optimální anatomické a ani funkční integrity [8, 9].

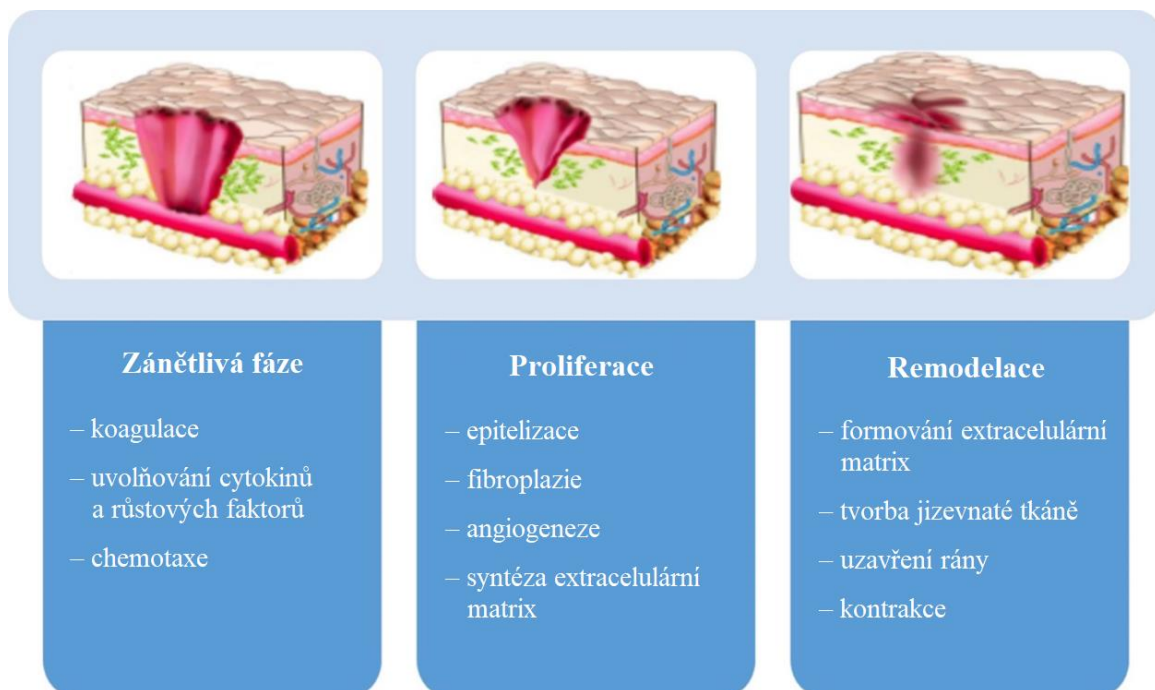
2.2.2 Hojení ran

Hojení ran je důležitým, avšak komplikovaným procesem s různými strategiemi při léčbě různých typů poranění. Je to jeden z nejsložitějších procesů, neboť zahrnuje časovou a prostorovou synchronizaci zánětlivé fáze s regenerací a remodelací tkáně (viz. Obrázek 1). Zánětlivá fáze následuje ihned po poranění kůže a zahrnuje koagulační kaskádu, zánětlivé reakce a účast imunitního systému. Všechny tyto události se odehrávají s cílem zabránit nadměrné ztrátě krve, tekutin a rozvoji infekcí, a usnadnit odstranění odumřelé a devitalizované tkáně. Hemostázy je dosaženo tvorbou krevních sraženin, následovanou tvorbou fibrinové matrice, která slouží jako lešení pro buněčnou infiltraci. V důsledku degranulace trombocytů, uvolnění chemotaktických signálů nekrotickými tkáněmi a produktů bakteriální degradace se aktivuje komplementární systém a neutrofilů se dostanou do léze. Neutrofilů, první buňky, které se objeví v místě poranění, odstraňují nečistoty, eliminují patogeny a poskytují dobré prostředí pro hojení ran. Následně dochází k hromadění makrofágů, které mají schopnost fagocytózy, ničí bakterie a buňky poškozené tkáně. Dokončení hemostázy a zánětlivé fáze často trvá 72 hodin. Když postižení zasáhne dermis, vytvoří se špatně diferencovaná a vysoce vaskularizovaná pojivová tkáň. Tato tkáň je nazývána jako tkáň granulační a je složena z buněčných fibrilárních složek integrovaných do zjevně amorfní matrice. Buňkami granulační tkáně jsou fibroblasty, zodpovědné za syntézu fibrilární složky, dále myofibroblasty, které se podílejí na mechanismu kontrakce rány a endoteliální buňky, zodpovědné za neoangiogenezi (tvorbu nových krevních cév) [8, 9, 10].

V dalším procesu dochází k proliferaci a migraci keratinocytů. Keratinocyty migrují k jádrové části léze. Tato fáze začíná, když je oblast mezi dnem a okraji vyplněna granulační tkání. Což pak představuje matrici, kde keratinocyty, sídlící na okraji léze, migrují a proliferují. Regenerace bazální vrstvy vede keratinocyty k proliferaci a vertikální diferenciaci, čímž se obnovují fyziologické rysy vícevrstvé epitelální tkáně [9].

Posledním krokem hojení ran je remodelace, která vyžaduje přesnou rovnováhu mezi apoptózou existujících buněk a produkcí buněk nových. Během této fáze makrofágy, izolované endoteliální buňky a myofibroblasty procházejí apoptózou a oblast bohatá na kolagen a další proteiny zůstává. V této fázi, která trvá až několik měsíců, je kolagen typu III postupně nahrazován kolagenem typu I [9, 10].

Dále je třeba zmínit, že proces hojení ran se odvíjí od různých systémových faktorů, jako je věk pacienta, přítomnost cévních, metabolických nebo autoimunitních onemocnění, jakož i probíhající medikamentózní terapie. Za ideálně zhojenou ránu se považuje oblast, která se po úrazu vrátí k normální anatomické struktuře, funkci a vzhledu. Minimálně zhojená rána je charakterizována obnovením anatomické kontinuity, avšak bez trvalých funkčních výsledků, rána se proto může znova objevit. S ohledem na tyto dva stavy, je pak přijatelně zhojená rána charakterizována obnovením trvalé funkční i anatomické kontinuity [9].



Obrázek 1 Hlavní fáze procesu hojení ran, převzato a upraveno z [11]

2.3 Terapie ran

Tisíce lidí ročně trpí různými druhy poškození kůže, a to jak lehkými, tak i těžkými poraněními (viz. 2.2.1). Ale i bez ohledu na intenzitu rány je důležité o ni rychle a nejlépe profesionálně pečovat. Je třeba podotknout, že už v roce 2 200 let př. n. l. vznikl lékařský spis o léčbě ran, který uvádí jednotlivé kroky v péči o poškozenou tkáň. V tomto archeologickém nálezu je

hojení ran uvedeno jako tři krokový postup zahrnující: čištění rány, použití obkladových materiálů a obvazování rány. Ačkoli se základní věda o hojení ran zdá být stejná, znatelně pokročila. Louis Pasteur a Joseph Lister našli důvod vzniku infekce a způsob, jak jí předcházet. Pasteur uvedl, že bakterie jsou do rány zavlečeny cizím zdrojem. Eliminace patogenních bakterií pomocí aseptických technik je tedy zásadním krokem v procesu hojení ran. Historicky byly jako obklady ran používány materiály, jako je živočišný tuk, med nebo různé bylinné směsi. V obvazech na rány došlo tedy k určitým pokrokům, avšak omezeným, což pokračovalo až po celý středověk. Největší pokroky v této oblasti nastaly až v 19. století, a to jak technologicky, tak i klinicky [11].

Obvazy na rány se tradičně aplikovaly, aby kompenzovaly chybějící ochrannou bariéru v místě rány, a tak ji chránily před vnější kontaminací. Tyto obvazy na rány (bavlněné obvazy a gázy) působí jako pasivní bariéra, absorbují velkou část vlhkosti obsažené v ráně, což intenzivně vysušuje povrch rány a vede ke snížení rychlosti hojení. Proto jsou nyní tyto klasické obvazové materiály nahrazovány technologicky vyspělejšími obvazy, které jsou schopny vytvořit ochranné prostředí a zároveň umožňují přenos aktivních látek. V důsledku toho byly vyvinuty různé kombinace syntetických i přírodních materiálů, např.: hydrogely, filmy nebo hydrokoloidy [11, 12].

Co se týče ideálního obvazu na rány, měl by mít takové vlastnosti, aby zajistil vlhké prostředí a zároveň zamezil hromadění exsudátu z rány. Vlhké krytí je upřednostňováno před suchým, neboť poskytuje rychlejší průběh hojení. Dalšími klíčovými vlastnostmi ideálního obvazu jsou: ochrana rány před infekcemi a mikroorganismy, redukce nekrózy rány a zajištění mechanické ochrany. Samozřejmostí ideálního obvazu je také jeho biokompatibilita, biologická odbouratelnost, elasticita a nesmí být toxický. Kromě toho by měl podporovat procesy obnovy tkáně a musí být snadno vyměnitelný a odstranitelný. Cenová přijatelnost hraje rovněž obrovskou roli [11, 12].

Obvazy na rány jsou pak vybírány na základě typu, hloubky, lokalizace a rozsahu rány, také množství výtoku, infekce a adheze rány [11]. K terapii ran mohou být využívány různé typy krycích prostředků, níže jsou pak uvedeny některé způsoby jejich klasifikace.

2.3.1 Klasifikace krytů na rány

Pro hojení ran jsou používány různé typy obvazů, které lze klasifikovat na základě různých faktorů. Např. na základě klinického výkonu se dělí na antimikrobiální, absorbující, okluzivní a adhezivní. Podle původu materiálu se dělí to tři skupin, konkrétně na: živočišné, rostlinné a syntetické [11, 13]. Lze je také dělit na obvazy primární a sekundární. Primární obvazy jsou aplikovány přímo na poškozenou pokožku, sekundární pak slouží k překrytí primárního obvazu. Dalším příkladem je klasifikace na základě interakce s biologickou tkání nebo na základě toho, zda se jedná o obvazy tradiční (gázy, kompozity gáza/bavlna) či obvazy typu pěna, gel, film, membrána aj. [13].

2.4 Terapie ran s využitím nanomateriálů

2.4.1 Definice a klasifikace nanomateriálů

Nanověda je označení pro studium jedinečných vlastností materiálů v rozsahu velikostí 1 až 100 nm, nanotechnologie se zabývají aplikací této vědy k vytváření nebo úpravám nových

objektů. Schopnost manipulace se strukturami v atomovém měřítku dává pak možnost pro tvorbu nanomateriálů [14]. Nanomateriály se ukázaly jako velmi významná třída materiálů, které jsou žádané pro spoustu praktických aplikací. Vyznačují se unikátními optickými, elektrickými anebo magnetickými vlastnostmi a lze je mimo jiné uplatnit v oblasti elektroniky či medicíny. Jejich jedinečnost je dána zejména tím, že poskytují velký poměr plochy povrchu k objemu. Vlastnosti nanomateriálů lze však libovolně ladit pomocí přesného řízení velikosti, tvaru, podmínek jejich syntézy a vhodné funkcionalizace [14, 15].

Nanotechnologie mají obrovský dopad téměř ve všech průmyslových odvětvích a oblastech společnosti, nabízejí lépe postavené, bezpečnější, čistší, dlouhodobější a chytřejší produkty pro lékařství, zemědělství, také každodenní život a další spoustu průmyslových odvětví. Použití nanomateriálů v produktech každodenní potřeby můžeme obecně rozdělit na dva typy. Za prvé, na nanomateriály, které mohou být sloučeny či přidány k již existujícímu produktu, čímž vylepší celkový výkon kompozitních objektů, a to na základě propůjčení některých ze svých jedinečných vlastností. Druhý typ nanomateriálů, jako jsou např. nanočástice, lze použít přímo k vytvoření pokročilých a výkonných zařízení. Výhody nanomateriálů by mohly potenciálně ovlivnit budoucnost téměř všech průmyslových odvětví [14].

Příkladem oblasti, kde nanomateriály již našly své uplatnění a jsou považovány za velmi prosperující, je oblast kosmetiky. Zde výrobci kosmetických přípravků používají přísady o velikosti nano k zajištění lepší ochrany proti UV záření, hlubšího proniknutí do pokožky, dlouhotrvajících účinků, kvality povrchové úpravy a mnoha dalších [14, 16]. Obrovský převrat způsobily nanotechnologie také v oblasti zdravotní péče, konkrétně v diagnostice, monitoringu a systémů pro dodávání léčivých přípravků (nano-DDS). Využití nano-DDS lze uplatnit např. v oblasti související s regenerací pokožky, tedy léčbou ran. Stávající terapie ran se ukázaly jako nedostatečné a zdaleka neuspokojivé, na což už bylo výše upozorněno. A právě nanotechnologie nabízí bezprecedentní příležitost k revoluci a vynalézání nových terapií nebo ke zvýšení účinnosti současných léčebných postupů. Nano-DDS totiž umožňují ukotvení bioaktivní molekuly přímo do aplikované oblasti, podporují uvolňování léčiva a explicitně zvyšují terapeutickou účinnost léčiv, čímž jsou relevantní právě pro regeneraci pokožky [14, 17]. Protože předmětem této práce je příprava krytů ran na bázi nanomateriálů, které by mohly sloužit k terapii ran, je regeneraci kůže prostřednictvím nanotechnologií věnována následující kapitola.

Co se týče samotné klasifikace nanomateriálů, lze je klasifikovat do různých skupin na základě různých kritérií. Obecně jsou kategorizovány podle jejich rozměrů, morfologie a chemického složení. Na základě jejich rozměrů a celkového tvaru těchto materiálů lze je rozdělit do čtyř tříd. Bezrozměrné nanomateriály (0D) mají všechny své rozměry v nanoměřítku (tj. velikost pod 100 nm), patří sem např. sférické nanomateriály a kvantové tečky. Jednorozměrné nanomateriály (1D) jsou materiály, kde jeden z rozměrů není v nanoměřítku, zatímco ostatní jsou o velikosti nano. Mezi 1D materiály řadíme např. nanodráty, nanotrubky a nanovlákná. Dvourozměrné nanomateriály (2D) mají pouze jeden rozměr v nanoměřítku, zahrnujeme sem např. tenké vrstvy a deskovité nanokrystaly. Trojrozměrné nanomateriály (3D) kombinují více nanokrystalů v různých směrech, patří sem materiály, jako jsou např. pěny, uhlíkové nanotrubky a fullereny. Z hlediska složení nanomateriálů, lze nanomateriály rozdělit do různých kategorií, jako jednosložkové nanomateriály a nanokompozity [18].

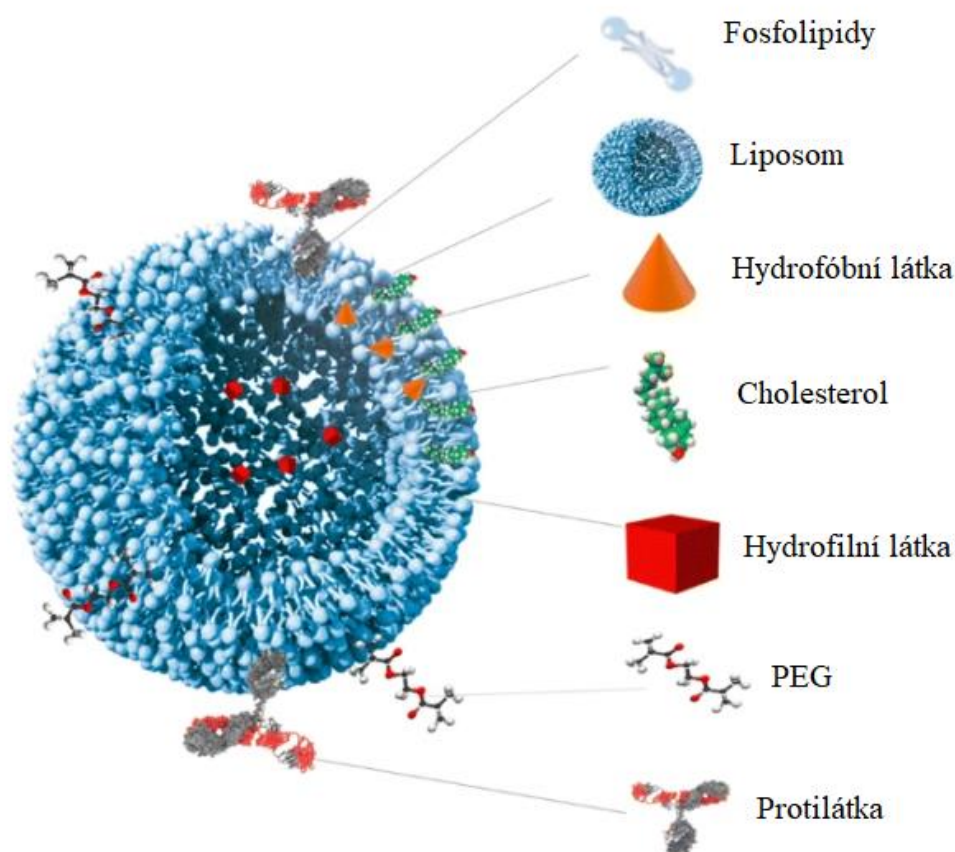
2.4.2 Kryty ran na bázi nanomateriálů

Jak už bylo výše uvedeno, běžné obvazové materiály mohou způsobit dehydrataci rány. Mohou se mechanicky přichytit na povrch rány, což může pak při jeho výměně způsobit velmi nepříjemný a až bolestivý stav. A právě terapie ran založená na využití nanomateriálů poskytla nové možnosti, přístupy a zejména výhody v této oblasti. Účinky různých nanomateriálů a jejich schopnost hojení ran se liší a většinou závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech nanomateriálů. Některé charakteristiky nanomateriálů, které mohou ovlivnit účinek procesu hojení rány, jsou biokompatibilita a biodegradabilita, stabilita, velikost a povrchový náboj. Kromě toho, důležité jsou také aktivní složky, které jsou součástí nanomateriálů [13]. Nanomateriály mohou sloužit totiž jako nosiče různých terapeutik. Hlavní nevýhodou konvenční antibiotické terapie u nehojících se chronických ran je nedostatečné dodávání antibiotik do cílových buněk. Dodávání terapeutických činidel zprostředkované nanomateriály zvyšuje antibakteriální aktivitu vzhledem k antibiotiku samotnému, neboť dochází k uvolňování antibiotika kontrolovaným způsobem s optimální koncentrací. Takové nanonosiče, které vykazují antibakteriální, protizánětlivé, proangiogenní a proliferativní vlastnosti, mohou pak ovlivnit každou fázi hojení ran. Hlavními typy nanomateriálů použitelnými k terapii ran jsou nanočástice, nanokompozity a scaffoldy [13, 19]. Níže jsou popsány dva typy nanomateriálů, nanočástice (konkrétně liposomy) a nanovlákna, které lze využít léčbě ran a jsou předmětem této práce.

2.5 Nanočástice – liposomy

Nanočástice jsou drobné materiály, jejichž velikost se pohybuje od 1 do 100 nm. Nanočástice jsou rozděleny do různých kategorií v závislosti na jejich morfologii, velikosti a fyzikálně-chemických vlastnostech. Na základě fyzikálních a chemických charakteristik existují různé třídy nanočástic, jako jsou nanočástice na bázi uhlíku, kovové nanočástice, keramické nanočástice, polovodičové nanočástice, polymerní nanočástice a nanočástice na bázi lipidů [20]. Nanomateriály na bázi lipidů, jako jsou pevné lipidické nanočástice, nanostrukturní lipidické nosiče a liposomy, jsou hojně využívány v biomedicínských aplikacích, používají se pro dodávání léčiv, protože jsou schopny transportovat jak hydrofilní, tak i hydrofobní molekuly [18, 20].

Liposomy jsou dvouvrstvé sférické vezikuly tvořené amfifilními molekulami, jako jsou fosfolipidy, které jsou považovány za jeden ze slibných nanonosičů pro topické podávání léčiv. Jsou netoxické, biologicky odbouratelné a biokompatibilní [17]. Další složkou liposomů je cholesterol, který spolu s fosfolipidy vytváří ve vodném prostředí alespoň jednu lipidovou dvojrůzstvu obklopující vodné jádro. Liposomy mohou tak pojmout hydrofilní i hydrofobní léčiva [21]. Struktura liposomální částice je znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2 Schématická struktura liposomální částice zapouzdřující látky hydrofobní i hydrofilní povahy, převzato a upraveno z [21]

A co se týče samotné struktury fosfolipidů, fosfolipidy sestávají z molekuly glycerolu, kde glycerol je vázán na fosfátovou skupinu a na dva řetězce mastných kyselin, které mohou být nasycené nebo nenasycené. Prostřednictvím esterové vazby je na fosfát vázána další molekula, např. cholin nebo ethanolamin. Fosfolipidy jsou tedy klíčovými složkami poskytující liposomům specifické vlastnosti, tj. způsob zapouzdření sloučenin a funkcionalizaci. A protože fosfolipidy jsou hlavními složkami buněčných membrán, mohou tak liposomální membrány během procesu uvolňování koexistovat s membránami buněčnými [21].

Cholesterol jakožto další složka liposomů hraje důležitou roli při přípravě a ve výsledných vlastnostech liposomů. Tato molekula se spolu s fosfolipidovým řetězcem, hydroxylovou skupinou, která je blízka hydrofilní oblasti, a jejími aromatickými kruhy paralelními s řetězcem mastné kyseliny ve dvojrstvě, přizpůsobuje, a to v důsledku hydrofobních interakcí. Dochází tak ke snížení fluidity a propustnosti vody a také ke zvýšení rigidity. Cholesterol je tedy důležitou složkou zajišťující stabilitu membrán, jak buněčných, tak i liposomálních [21].

Vlastnosti liposomů mohou být ovlivněny nejenom jejich složením, ale i velikostí, povrchovým nábojem, počtem lamel, povrchovou úpravou a samotným způsobem jejich přípravy [21].

2.5.1 Klasifikace liposomů

Liposomy jsou obecně klasifikovány dle velikosti a počtu vrstev. Strukturně se velikost liposomů může lišit, a to od velmi malých (25 nm) až po velké vezikuly. Kromě toho mohou liposomy obsahovat jednu nebo více dvojvrstevných membrán. Na základě velikosti a počtu dvojvrstev lze liposomy rozdělit do dvou základních kategorií:

1. Multilamelární vezikuly (MLV): MLV se vyznačují přítomností více lipidových dvojvrstev.
2. Unilamelární vezikuly (ULV): ULV lze také dále dělit do dalších kategorií:
 - a. Velké unilamelární vezikuly, což je typ ULV obsahující jednu lipidovou dvojvrstvu o průměru 1 000 nm.
 - b. Malé unilamelární vezikuly, typ ULV s velikostí vezikul v rozmezí 20–200 nm.
 - c. Multivezikulární částice, což jsou částice, které spadají do kategorie ULV a obsahují několik vezikul o velikosti pod 1 000 nm [22].

2.5.2 Metody pro přípravu liposomů

Obecně veškeré způsoby přípravy liposomových částic zahrnují tyto čtyři základní fáze: vysušení lipidů (odpaření organického rozpouštědla), dispergace lipidů ve vodném médiu, purifikace připravených liposomů a nakonec analýza konečného produktu [23, 24].

Liposomy lze připravit pomocí několika konvenčních a nových technik. Různé konvenční techniky přípravy liposomů, jako je technika odpařování s reverzní fází, injekční techniky, hydratační metody, mikrofluidní metoda, hydratace tenkých vrstev (Banghamova metoda), membránová extruze atd., jsou dobře známy a zaznamenány. Mezi nové techniky přípravy řadíme metody jako je ultrazvuková metoda, která byla použita v rámci experimentální části práce, a superkritická fluidní metoda. Mezi techniky přípravy na bázi technologie superkritických tekutin se řadí metoda superkritického antirozpouštědla (SAS) a superkritického odpařování v reverzní fází (SRPE) [22, 23].

2.5.2.1 Příprava liposomů pomocí ultrazvuku

Sonikace je jednoduchou a široce využívanou metodou pro přípravu liposomů. Využívá se akustické energie ultrazvuku k oddělení velkých, multilamelárních vezikul a agregátů na menší unilamelární částice. Doba působení a intenzita tlakových vln jsou klíčovými parametry určujícími velikost připravených vezikul. Efekt zmenšení velikosti je zprostředkován kavitačními jevy, které zahrnují tvorbu, růst a implozivní kolaps mikrobublinek v médiu. Malé bublinky rostou, dosahují maximální možné velikosti a následně rychle kolabují, čímž dojde k uvolnění vysoké energie. Uvolněná energie generuje vysokotlaké a vysokorychlostní proudy kapaliny. A právě tyto jevy vznikající v kapalině jsou zodpovědné za srážky mezi částicemi [22].

Existují dvě sonikační metody: sonikace sondou a sonikace typu lázně. Obě tyto sonikační metody generují liposomy s podobnými vlastnostmi. Sonikace sondou funguje na principu přenosu zvukové energie prostřednictvím kovové sondy (nejčastěji sonda z titanu). V procesu sonikace je hrot sondy ponořen do disperze liposomů, kdy vložená energie do lipidové disperze je u této metody vysoká. Pro zmírnění horkosti v sondě, důsledek vyšší energie, musí být nádoba obsahující disperzi lipidů umístěna do vodní lázně. U sonikace typu lázně je řízení teploty obvykle snazší [22, 24].

2.5.3 Materiály pro přípravu liposomů

Výše již byly uvedeny hlavní stavební složky liposomů, fosfolipidy a cholesterol. Hlavní fosfolipidy používané v liposomech jsou sójový lecitin, vaječní lecitin a mléčný fosfolipid. Cholesterol je důležitou složkou zajišťující stabilitu liposomové membrány [22]. Liposomy jsou tedy plně biokompatibilní, avšak jejich nevýhodou bývá nižší stabilita a postupné uvolňování enkapsulovaných látek během dlouhodobého skladování. Možností, jak zvýšit stabilitu liposomů, je kombinace s jinými složkami, především s biodegradovatelnými polymerními sloučeninami. A takovým materiálem, pozitivně ovlivňujícím stabilitu, je poly(3-hydroxybutyrát) (PHB). Kombinované PHB-liposomy mohou ovlivnit adhezi částic nosiče ke kůži a řídit uvolňování aktivních látek po určitou dobu [25].

2.6 Nanovlákná

Nanovlákná jsou charakterizována jako jednorozměrné nanomateriály a definována jako vlákna s minimálním poměrem délky k tloušťce. Jedná se o významné materiály pro širokou škálu výzkumných i komerčních aplikací. Vyznačují se totiž několika zajímavými vlastnostmi, jako je malý průměr (1 000krát menší než průměr lidského vlasu), vysoký poměr plochy povrchu k objemu, nastavitelná pórovitost, flexibilní povrchové funkce a lepší mechanické vlastnosti, tj. tuhost a pevnost v tahu, ve srovnání s běžně používanými základními materiály [26, 27]. Významný dopad technologie nanovláken je způsoben dostupností široké škály materiálů, které lze pro výrobu nanovláken použít, včetně přírodních a syntetických polymerů, kovů a oxidů kovů, uhlíkových a kompozitních nanomateriálů [27].

Nanovlákná jsou vynikajícím kandidátem zejména pro biomedicínské aplikace, vzhledem k jejich vysokému poměru stran a schopnosti tvořit 3D-sítované struktury. Jsou vhodné pro dodávání léčiv, hojení ran a tkáňové inženýrství [27].

2.6.1 Metody pro přípravu nanovláken

Pro přípravu nanovláken jsou využívány různé výrobní techniky, v literatuře bývají uváděny pod různými názvy a klasifikacemi. Syntéza nanovláken zahrnuje různé chemické, mechanické a optické metody [27, 28]. Techniky výroby nanovláken lze například klasifikovat jako přístupy „bottom-up“ (zvětšování) a „top-down“ (zmenšování). Přístup bottom-up zahrnuje metody syntézy, jako je mechanické mletí, vyfukování roztoku, technika tažení, lyofilizace, fyzikální depozice par (PVD), chemická depozice par (CVD), samoskládání (self-assembly), polymerizace a zvlákňování. Přístup top-down zahrnuje metody jako je broušení, rafinace nebo řezání [27].

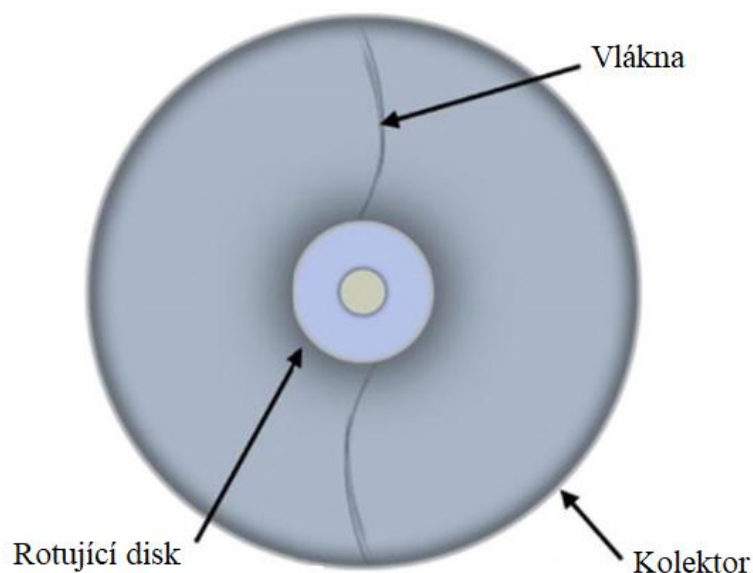
Zvlákňovací techniky, použité v rámci experimentální části práce, lze pak dělit na techniky elektrostatického zvlákňování, které využívají elektrického napětí k řízení morfologie vláken, a další sprádací postupy, které používají jiné síly, jako je stlačený vzduch nebo odstředivé síly [27].

2.6.1.1 Odstředivé zvlákňování neboli forcespinning

Forcespinning je metoda, která k výrobě nanovláken využívá mechanické síly jakožto hnací síly k roztažení taveniny nebo roztoku na vlákna. Odstředivé zvlákňování je známo pod mnoha názvy, včetně tryskového nebo silového otáčení [29]. Tato metoda je silným kandidátem pro

hromadnou výrobu polymerních mikro- i nanovláken, kdy mezi výhody odstředivého zvlákňování spadá vysoká rychlost výroby, nákladová efektivita a není potřeba napětí [30].

Základní zařízení pro odstředivé zvlákňování se skládá ze dvou základních částí, zvlákňovací trysky udržované v rotátoru, kde hnací síla pochází z odstředivé síly, a kolektoru (viz. Obrázek 3) [29].



Obrázek 3 Schématické znázornění základního zařízení pro odstředivé zvlákňování, převzato a upraveno z [29]

Principem odstředivého zvlákňování je přivádění polymeru ve formě taveniny nebo roztoku z extrudéru nebo injekční pumpy do rotující komory o dvou nebo více otvorech. Když odstředivá síla překoná povrchové napětí v centrální rotační trysce, proudy polymerního roztoku (tzv. trysky) vystupují z otvorů, prodlužují se za doprovodu odpařování rozpouštědla, až dokud vytvořená nanovlákná nedosáhnou roviny kolektoru, kde se usadí [27, 29, 31].

Na průměr nanovláken mají vliv různé parametry. Viskoelasticita kapaliny a rychlost rotace hrají důležitou roli v morfologii získaných nanovláken. Důležité pro řízení průměrů nanovláken jsou parametry trysky, jako je její průměr, délka a struktura. Vlákna s malými průměry lze získat tím, že je dána větší vzdálenost mezi tryskou a kolektory. Mezi další parametry ovlivňující velikost vláken patří: úhlová rychlost komory, konfigurace a poloměr otvorů a také rychlost odpařování rozpouštědla [27, 29].

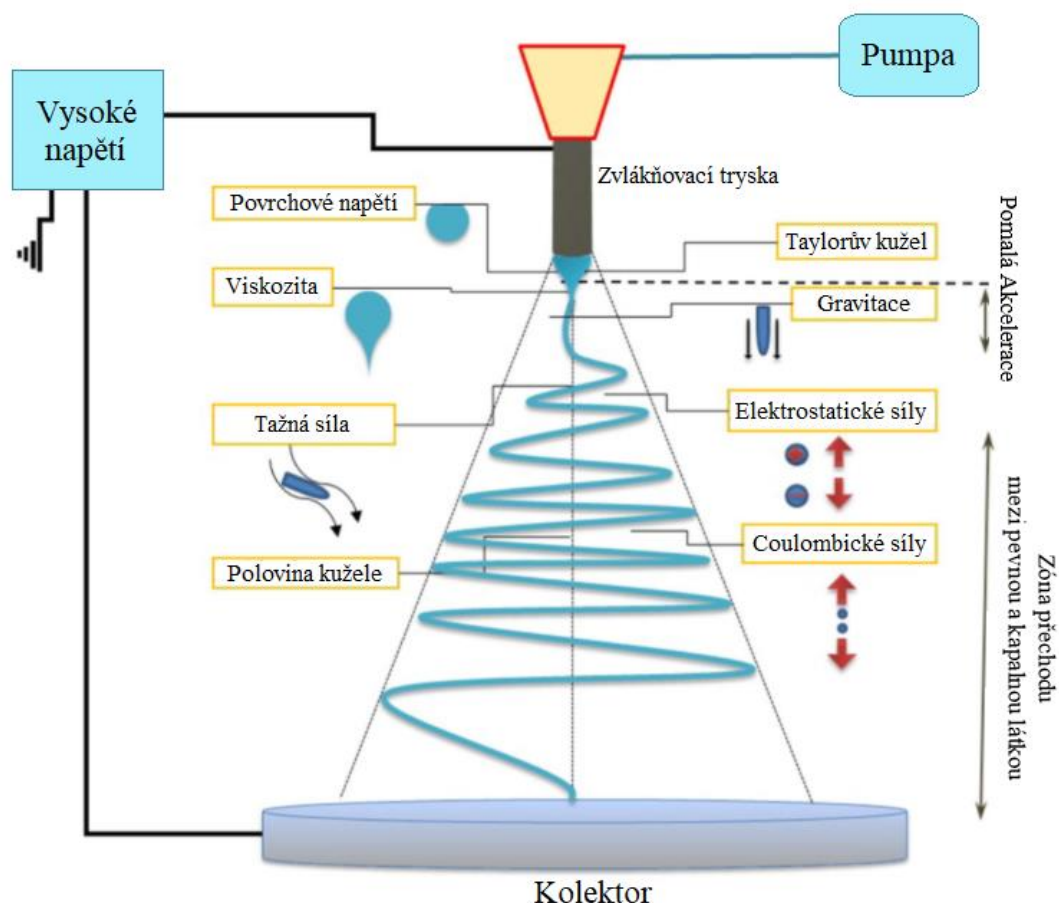
Metodou forcespinning lze tedy dosáhnout vynikající produktivity vláken, a to díky vysoké účinnosti vysokorychlostní odstředivé síly. Snadno se vytváří vlákna vyrovnaná, neboť je paprsek odstředivou silou natažen v jednom směru. Avšak odstředivým zvlákňováním získáváme vlákna s vyššími průměry, ve srovnání se zvlákňováním elektrostatickým [29].

2.6.1.2 Elektrostatické zvlákňování neboli electrospinning

Elektrostatické zvlákňování využívá k vytváření velmi jemných vláken elektrostatický potenciál charakterizovaný vysokým napětím a nízkým proudem. Konvenční zařízení pro

elektrostatické zvlákňování sestává z vysokonapěťového napájecího zdroje, vodivého sběrače, injekční stříkačky s kapilární jehlou nebo zvlákňovací tryskou a pumpy. Nastavení lze uspořádat do vertikální či horizontální polohy. Součástí vybavení může být i vysokorozlišovací kamera pro vizualizaci vypuzení polymeru zvlákňovací tryskou. Kolektorem, tedy vodivým sběračem, může být jednoduchá kovová deska [32, 33].

Celkový proces se provádí za použití roztoku nebo taveniny polymeru. Polymer je čerpán zvlákňovací tryskou, která je připojena k vysokému elektrickému napětí, kdy kladně nabitý roztok je přitahován ke kolektorové desce účinkem elektrického pole. Elektrická síla je generována mezi dvěma elektrodami, přičemž jedna je připojena k trysce vytlačující roztok polymeru a druhá k vodivému kolektoru [34]. Polymer v trysce, na kterou je aplikováno napětí, se přesouvá přesnou rychlostí, tak aby se na špičce vytvořila kulová kapka. Kdy aplikované napětí indukuje tvorbu přebytečného náboje na povrchu kapičky polymeru, přebytečný náboj je pak výsledkem migrace iontů přítomných v polymeru. Pohyb iontů v kapalině tedy zapříčiní roztažení tvaru závěsné kapičky (obvykle koule vytvořené povrchovým napětím). Se zvyšujícím napětím na zvlákňovací trysce roste také elektrostatické odpuzování nábojů akumulujících se na povrchu kapičky, které soutěží s povrchovým napětím. Jakmile elektrostatické odpuzování překoná povrchové napětí kapičky, dojde k protažení kapičky a vytvoří se kónický tvar známý jako Taylorův kužel. Iniciace paprsku začíná od špičky kužele. Síly, které vyvolávají tvorbu Taylorova kužele, jsou nepřímo řízeny průtokem a aplikovaným napětím. Rovnováha mezi těmito dvěma parametry je důležitá, neboť podporuje tvorbu stabilního proudu. Pokud existuje dostatečná kohezní síla v polymerní kapalině, z Taylorova kužele jde stabilní proud, který umožní, aby se polymerní řetězce vzájemně protáhly a vytvořily tak jednotné vlákno. K ukládání vytvořených vláken dochází na uzemněném kovovém kolektoru (viz. Obrázek 4). Proces je samozřejmě doprovázen odpařováním rozpouštědla [32, 33].



Obrázek 4 Schéma sestavy zařízení pro elektrostatické zvlákňování. Tvorba Taylorova kužele na špičce zvlákňovací trysky, převzato a upraveno z [34]

Proces elektrostatického zvlákňování může ovlivnit mnoho parametrů, včetně vlastností roztoku (např. koncentrace, viskozita, elektrická vodivost, povrchové napětí a dielektrické vlastnosti), řídicích proměnných (např. síla elektrického pole, průtok polymerního roztoku a vzdálenost od trysky ke kolektoru) a okolních parametrů, jako je např. vlhkost a teplota. Koncentrace polymeru v roztoku určuje, zda jej lze elektrostaticky zvlákňovat do nanovláken a má důležitý vliv na morfologii vláken. Obecně platí, že zvýšení koncentrace roztoku zvýší také průměr vláken a jednotnost. Proces elektrostatického zvlákňování navíc vyžaduje přenos elektrického náboje z elektrody na zvlákňovací kapku. Pro tvorbu nanovláken je proto nezbytná minimální elektrická vodivost. Elektrická vodivost je ovlivněna typem polymeru a rozpouštědla, koncentrací polymeru a teplotou. Reologické vlastnosti, zejména viskozita, také ovlivňují proces tvorby vláken. Více viskózní roztoky nemohou projít zvlákňovací tryskou a roztoky s nízkou viskozitou zase neprodukuje vlákna [35].

2.6.2 Inkorporace léčivých látek do nanovláken

Většina publikací studující vláknité matrice s obsahem léčiv preferuje přímé elektrostatické zvlákňování směsi léčivo/polymer. Velká část zájmu o použití směsi léčivo/polymer pro elektrospinning pramenila z možnosti dosáhnout trvalého uvolňování léčiva. Zapouzdření léčiva do nanovlákná poskytuje totiž ochranu a postupné uvolňování léčiva [34, 36].

Začlenění léčiv do nanovláken připravovaných pomocí elektrospinningu se provádí různými technikami. Nejjednodušším přístupem je zmíněné přímé smíšení léčiva a polymeru, kdy léčivo a polymer jsou rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle a následně zvlákněny. Síla interakce léčivo/polymer řídí profil uvolňování společně s vlastnostmi rozpustnosti léčiva. Nevýhody této techniky jsou spojeny hlavně s přítomností organického rozpouštědla, často schopného denaturovat bioaktivní molekuly. Navíc je obecně pozorováno náhlé uvolňování léčiva [32].

Mezi různými metodami používanými k přidávání bioaktivních činidel do elektrostaticky připravovaných nanovláken, si značnou pozornost získalo emulzní elektrostatické zvláknování. Emulzní elektrostatické zvláknování umožňuje úspěšné nanášení hydrofobních i hydrofilních činidel a schopnost chránit strukturální integritu a bioaktivitu těchto činidel. Jedná se o poměrně novou a jednoduchou techniku výroby jež umožňuje elektrostaticky zvláknovat roztoky typu voda v oleji (v/o) či olej ve vodě (o/v). Při této metodě je emulze elektrostaticky zvláknována do strukturovaných vláken typu jádro-plášť v důsledku rozdílu těkavosti mezi dvěma rozdílnými fázemi, tj. jedna fáze dispergována do druhé ve formě kapiček. Během procesu elektrostatického zvláknování se rozpouštědlo dispergované fáze rychle odpařuje a kapičky emulze se pohybují dovnitř a spojují se v jádru vláken [37, 38].

Další možností inkorporace léčivých látek do nanovláken je použití metody koaxiálního elektrostatického zvláknování. Tato metoda je modifikací tradičního uspořádání elektrostatického zvláknování s jednou zvláknovací tryskou. Zde je však tato zvláknovací tryska nahrazena dvěma koaxiálními kapilárami. Jde tedy o techniku tvorby nanovláken typu jádro-plášť a může být modulární platformou pro plnění různých léčiv do různých oddílů vlákna. Také koaxiální plnění jediného léčiva do jádra s přítomností pláště poskytuje velkou výhodu, obal totiž působí jako fyzická bariéra zabraňující náhlému uvolnění léčiva. U této metody jsou hlavní nevýhody spojeny s optimalizací parametrů [32, 39].

Další přístup pro plnění nanovláken léčivem zahrnuje povrchovou imobilizaci bioaktivní molekuly po procesu elektrostatického zvláknování. Je tedy možné vyhnout se jakémukoli kontaktu aktivní molekuly s organickým rozpouštědlem, čímž se zabrání jakékoli nežádoucí degradaci. Avšak dosažení delšího průběhu uvolňování vyžaduje silnou nekovalentní vazbu mezi léčivem a polymerem a obvykle proces síťování [32].

2.6.3 Materiály pro přípravu nanovláken

Nanovlákná mohou být připravena ze široké škály materiálů, lze využít jak přírodní a syntetické, tak i hybridní polymery s různými fyzikálními, chemickými a mechanickými vlastnostmi [40]. Neexistuje však žádný univerzální standard pro výběr polymerů aplikovaných pro jednotlivá nanovlákná, výběr závisí vždy na žádoucí funkci nanovláken. Různé polymery s různými molekulami a zdroji vedou ke značným rozdílům ve vlastnostech, jako je viskozita zvláknovacího roztoku, morfologie nanovláken, mechanická pevnost, biokompatibilita a fyzikálně-chemické vlastnosti [41].

V tomto desetiletí se však dominance obnovitelných zdrojů při přípravě nanovlákných materiálů drasticky zvýšila, zejména díky jejich vlastnostem šetrným k životnímu prostředí. Mezi tyto obnovitelné zdroje patří polymery, kterým byla věnována pozornost z hlediska jejich biokompatibility, biologické rozložitelnosti a bioaktivity. Obecně lepší biokompatibilitu mají přírodní polymery, avšak těm syntetickým nelze upřít snadnější elektrostatické zvláknování a vlákna s vynikající mechanickou pevností. Pro získání maximálního užitku těchto materiálů,

bývá doporučena strategie kombinovat polymery, např. chitosan nebo alginát zpracovat do nanovláken s přísávkem polyethylenoxidu (PEO) či polyvinylalkoholu (PVA) [28, 41]. Níže jsou uvedeny a popsány některé z polymerů používaných pro tvorbu nanovláken.

2.6.3.1 Alginát

Alginát je jedním z přírodních polysacharidů, které se nacházejí v buněčných stěnách hnědých řas (rody *Lamanaria* a *Macrocystis*). Rovněž může být produkován i dvěma rody bakterií, konkrétně rody *Azotobacter* a *Pseudomonas*. Alginát se vyznačuje unikátními vlastnostmi, např. gelovatěním, což umožňuje jeho použití v potravinářském, polygrafickém a farmaceutickém průmyslu. Jedná se o lineární kopolymer složený z β -D-mannurátu a α -L-gulonátu, které jsou spojeny 1-4 glykosidickými vazbami. Zájem o využití alginátu k různým aplikacím je díky jeho jedinečným hodnotným vlastnostem, jako je jeho udržitelnost, biologická odbouratelnost, biokompatibilita, antimikrobiální vlastnosti a vynikající adsorpce iontů. Používá se v různých formách, jako jsou nanočástice, mikročástice a nanovlákná [42].

2.6.3.2 Chitosan

Chitosan, částečně N-deacetylovaný derivát chitinu, sestává z D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu. Množství D-glukosaminových jednotek určuje stupeň deacetylace, bylo prokázáno, že deacetylace hraje důležitou roli ve fyzikálně-chemických a biologických vlastnostech chitosanu. A na rozdíl od většiny ostatních polysacharidů, aminoskupiny na D-glukosaminových jednotkách se po rozpuštění ve vodném roztoku kyseliny octové protonují a vytváří kationtový polyelektrolyt. Tato jedinečná vlastnost umožňuje molekulárním řetězcům chitosanu vytvářet elektrostatické komplexy nebo vícevrstvé struktury s jinými syntetickými polymery, které mají záporně nabitě funkční skupiny. Chitosan se typicky používá v různých biomedicínských aplikacích, byly vyvinuty různé scaffoldy na bázi chitosanu, které se vyznačují výbornými mechanickými vlastnostmi, biokompatibilitou a biologickou odbouratelností. Bylo také prokázáno, že podporuje hemostázu a urychluje proces hojení ran, a to jak v *in vitro*, tak *in vivo* studiích. Navíc jeho schopnost gelovatění, kladný náboj, tvorba filmu a přilnavost ke tkáním z něj činí ideálního kandidáta pro zmíněné biomedicínské aplikace. Konkrétně se využívá antimikrobiálních vlastností nanovláken na bázi chitosanu připravených pomocí elektrospinningu pro hojení ran [33, 43].

2.6.3.3 Polyhydroxybutyrát

Polyhydroxybutyrát (PHB), bioplast objevený na počátku 20. let 20. století v bakteriích, patří do rodiny polymerů známých jako polyhydroxyalkanoáty (PHA). Během posledních tří desetiletí byly zkoumány fyzikálně-chemické vlastnosti této nové třídy biopolymerů a byly odhaleny nesčetné výhody při použití PHA jako biomateriálů v medicínských aplikacích, a to díky vlastnostem, jako je jejich biokompatibilita, mechanická stabilita, pevnost a biologická rozložitelnost za fyziologických podmínek bez vzniku toxických degradačních produktů [44, 45].

Co se týče samotného PHB, je produkován mnoha prokaryotickými mikroorganismy, které jej ukládají intracelulárně jako zdroj energie. Pro komerční produkci PHB jsou většinou používány heterotrofní bakterie. Dalšími producenty PHB jsou pak sinice, jmenovitě se jedná o tuto fotosyntetická prokaryota: *Nostoc muscorum*, *Synechococcus sp.*, *Aulosira fertilissima*

a další. Různé mikroorganismy produkují PHB o molekulové hmotnosti v rozmezí od 10^5 do 10^6 Da. PHB získaný z živých buněk je biologicky odbouratelný termoplast s pozoruhodnou podobností s polypropylenem. Jedná se o polymer, který je ve vodě nerozpustný, vůči kyselinám a zásadám je však méně odolný. Je tedy netoxický, biodegradovatelný a biokompatibilní díky čemuž je využívám zejména v oblasti tkáňového inženýrství. Lze jej použít jako trojrozměrné lešení umožňující regeneraci poškozené kůže [45].

2.6.3.4 Želatina

Želatina je levný, vysoce biokompatibilní, biologicky odbouratelný, netoxický, neimunogenní a nedráždivý biopolymer získaný částečnou hydrolyzou přírodního kolagenu, zatímco kolagen je nejhojnějším proteinem v extracelulární matrix a lidském těle. Želatinová nanovlákna, díky svému biologickému původu a uvedeným vlastnostem, mohou poskytnout bezpečný a dobře fungující konstrukt pro tkáňové inženýrství. Želatina byla a je široce používána pro přípravu trojrozměrného lešení užívaného v oblasti farmacie a medicíny, a to kvůli její zvýšené biokompatibilitě ve srovnání se syntetickými polymery [34, 46, 47].

Scaffoldy z želatinových nanovláken připravované metodou elektrostatického zvláknování jsou rozpustné ve vodě, a proto pro dlouhodobé biomedicínské použití musí být zesíťovány. Síťovací činidla a síťovací techniky se používají v závislosti na požadovaných vlastnostech výsledného produktu [47].

2.7 Nanovlákna s inkorporovanými liposomy

Jak už bylo zmíněno, liposomy si získaly širokou pozornost jako nosiče terapeuticky aktivních sloučenin. Liposomy vzhledem ke svým strukturálním vlastnostem nabízejí několik výhod oproti jiným nosičovým systémům, jako je schopnost nést hydrofobní i hydrofilní sloučeniny, vysoká účinnost enkapsulace, biokompatibilita a schopnost transportu přes buněčné membrány. Nicméně konvenční liposomy jsou termodynamicky nestabilní systémy, jsou náchylné k agregaci, fúzi, degradaci nebo hydrolyze, což vede k úniku zachycených sloučenin. Nevýhody pak také shledáváme i u nanovláken, konkrétně u přípravy nanovláken s kompatibilními proteiny. Nedávný pokrok při přípravě nanovláčenného systému s proteiny sice zlepšil zachování proteinové aktivity, avšak proteiny stále zůstávají v polymerních roztocích a nejsou ve svém přirozeném vodném mikroprostředí. Tento nedostatek lze vyřešit právě pomocí liposomů, které jsou schopny zapouzdřit vodný roztok [48, 49].

Integrace liposomů a biopolymerů představuje rovněž slibnou strategii pro zlepšení *in vitro* a *in vivo* výkonnosti liposomů. Jako druhá generace liposomů byly v poslední době vyvinuty hybridní systémy biopolymer-liposom s klíčovými vlastnostmi biokompatibility a biologické rozložitelnosti. Jedním ze studovaných systému biopolymer-liposom jsou povrchově modifikované liposomy. Dalším typickým hybridním systémem jsou naopak liposomy začleněné do biopolymeru. Liposomy však často bývají zapouzdřeny v různých polymerních maticích, jako jsou hydrogely, filmy a nanovlákna. Tyto hybridní systémy nejenže zachovávají strukturální integritu a funkce zachycených liposomů, ale mají také synergické účinky dvou odlišných platforem pro dodávání aktivních látek, které mohou nabídnout jedinečné výhody. Kombinace liposomů s polymerními scaffoldy, jako jsou např. nanovlákna, by mohla tedy překonat omezení konvenčních liposomů a rozšířit jejich využití v biomedicínském inženýrství.

Konkrétně by se použitelnost liposomů mohla uplatnit v obvazech na rány, tkáňovém inženýrství a topické léčbě nemocí [48, 49].

2.8 Aktivní látky v krycích materiálech na rány

Mnohokrát již bylo zmíněno, že terapie kožních ran je klíčovou oblastí výzkumu vzhledem k důležité funkci a estetické roli této tkáně. Když dojde k narušení kůže, bakterie mohou brzy infiltrovat do spodních tkání, což může vést k život ohrožujícím infekcím. K řešení takových patologických stavů je nezbytná účinná léčba. Nedávno se objevily obvazy na rány s obsahem antimikrobiálních činidel jako možnosti, jak snížit bakteriální kolonizaci rány a infekci, aby se zlepšil proces hojení rány [50]. Další hlavní částí péče o rány je snížení bolesti, k čemuž jsou využívána analgetika. Bolest v ráně se léčí především systémově aplikovatelnými analgetiky, která mohou přivodit i různé vedlejší účinky. Je však možné využít lokální léčby pomocí obvazů s analgetiky [51].

2.8.1 Látky s antimikrobiálním účinkem

Antimikrobiální látka je definována jako přírodní nebo syntetická látka, která zabíjí nebo inhibuje růst mikroorganismů, jako jsou bakterie, houby a řasy. Příkladem antimikrobiálních sloučenin jsou antibiotika, která slouží jako účinná terapie proti různým typům infekcí způsobených gramnegativními a grampozitivními bakteriemi [52, 53, 54].

Mnoho studií odhalilo, že různá bakteriostatická nebo baktericidní antibiotika mohou napomáhat uzavření rány. Je také známo, že nespočet antibiotik je účinných proti mikroorganismům způsobující infekci, k výrobě obvazů s antimikrobiálním účinkem však zatím byli využity pouze chinolony, tetracykliny, aminoglykosidy a cefalosporiny. Tyto čtyři třídy antibiotik mohou bránit některým funkcím anebo metabolické dráze bakterií prostřednictvím jedné z následujících cest: inhibice syntézy bakteriální buněčné stěny, zablokování klíčových metabolických drah, inhibice syntézy proteinů a inhibice syntézy nukleových kyselin [55]. Vybraným antibiotikem, použitým při přípravě krytů na rány, je ampicilin, který je popsán níže.

2.8.1.1 Ampicilin

Ampicilin je semisyntetický derivát penicilinu. Beta-laktamové antibiotikum účinné proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Uvádí dobrou minimální inhibiční koncentraci (MIC) proti většině lékařsky důležitých mikroorganismů, jako je *S. aureus*, *Escherichia coli* a *Streptococcus pneumoniae*. Používá se při léčbě střevní horečky, infekci dýchacích cest, infekcí močových cest, infekcí kůže a měkkých tkání. Ampicilin se také používá v kombinaci s jinými antimikrobiálními látkami (aminoglykosidy, inhibitor β -laktamázy), aby se zlepšila jeho účinnost anebo se snížil rozvoj lékové rezistence. Tyto kombinace jsou užitečné při empirické léčbě široké škály komplikovaných infekcí [56, 57].

2.8.2 Látky tlumící bolest

Analgetika, běžně známá jako léčiva zmírňující bolest, jsou látky, které působí různými způsoby k úlevě od různých typů bolesti pociťované v těle, aniž by měnily smyslové vnímání a vědomí nebo blokovaly vedení nervových vzruchů. Mezi volně prodejná analgetika patří látky, jako je paracetamol, slabé opioidy, jako je kodein, a nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID). Většina protizánětlivých analgetik je odvozena z těchto sloučenin: kyseliny

salicylové a fenacetinu. Kyselina acetylsalicylová neboli aspirin je odvozena od kyseliny salicylové a je nejrozšířenějším analgetikem. Acetaminofen, který je odvozen od fenacetinu, také je řazen mezi NSAID zahrnující ibuprofen, naproxen a fenoprofen. Aspirin i NSAID inhibují syntézu prostaglandinů, které indukují reakce v místní tkáni, které zahrnují bolest i zánět [58, 59].

2.8.2.1 Ibuprofen

Ibuprofen je tradiční nesteroidní protizánětlivé léčivo, které je široce používané pro své analgetické, protizánětlivé a antipyretické vlastnosti. Jako většina NSAID se podává jako racemická směs R a S enantiomerů, přičemž za jeho farmakologickou aktivitu je z velké části odpovědný S- forma. Ibuprofen působí jako reversibilní inhibitor enzymů cyklooxygenázy prostřednictvím sterické zábrany, čímž se snižuje hladina prostaglandinů (vedoucí ke zmírnění bolesti, horečky a akutních zánětlivých reakcí). Ibuprofen je tedy indikován pacientům ke zmírnění jejich bolesti či zánětu, včetně bolesti hlavy, svalů, zad a snížení horečky [60, 61].

2.9 Testy bezpečnosti krycích materiálů

Zdá se, že dnes je svět stále více vystaven rizikům a nebezpečí, zejména v souvislosti s výrobou, distribucí a používáním zdravotnických produktů, které mohou často představovat rizika pro obyvatelstvo. Rizika a škodlivé účinky související s používáním zdravotnických produktů, technologií a služeb mohou být způsobeny výrobními vadami, nesprávnými předpisy nebo úmyslným nezákonným jednáním ze strany výrobců, prodejců a poskytovatelů služeb. Některé produkty mají určitý stupeň inherentního rizika nebo nebezpečí, proto je nezbytné přísné sledování jejich výroby, distribuce a použití. Navíc s neustálým vývojem ve vědě a technologii by tato zařízení měla před použitím v klinickém prostředí projít mimo jiné testováním na biokompatibilitu nebo cytotoxicitu, senzibilizaci, intradermální podráždění, akutní toxicitu a spoustu dalších testů, aby bylo zajištěno jejich bezpečné a efektivní použití u lidí [62].

Biokompatibilita se týká zdravotnických prostředků ve specifickém prostředí a umístění hostitele, jejich schopnosti vzájemně reagovat při přímém nebo nepřímém kontaktu s hostitelem, biologických vlastností zdravotnického prostředku ve statickém stavu, dynamického procesu změn *in vivo* a schopnost tolerovat všechny hostitelské systémy při zachování relativní stability, bez vyloučení a destrukce. Podle Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) musí být tedy zdravotnické prostředky podrobeny přísnému testování, a to z důvodu zajištění jejich biokompatibility při jejich kontaktu s tělem. Nový zdravotnický prostředek musí před vstupem do klinického prostředí projít výše zmíněnými testy, jako je cytotoxicita, senzibilizace atd. Z testů biokompatibility je cytotoxicita preferována jako pilotní test a jako důležitý indikátor pro hodnocení zdravotnických prostředků. Například nanočástice jakožto jedny z nejpoužívanějších systémů v biomedicínských aplikacích musí být netoxické, biokompatibilní, neimunogenní a stabilní ve fyziologických médiích. Cytotoxicita je proto významným faktorem pro biomedicínské cíle, zejména pro jejich *in vivo* aplikace, tj. biosenzory nebo nosiče léčiv. Lidé totiž mohou být nanočásticím vystaveni různými způsoby, ať už prostřednictvím inhalace, požití, dermální aplikace nebo injekčně. Stanovení bezpečnostního profilu je tedy nutné a týká se to např. i oblasti kosmetiky, před uvedením nové kosmetické přísady na trh musí výrobci stanovit její bezpečnost. Týká se to také oblasti biotechnologií, přesněji jejího průlomu ve vývoji biomateriálů a bioproduktů pro použití jakožto

zdravotnických prostředků, jako jsou zařízení vyvinutá k regeneraci tkání a poskytování řízeného uvolňování léčiv [62, 63, 64, 65]. Konkrétním příkladem jsou obvazy na rány, které jsou toxické pro mikrobiální buňky a mohou tedy být toxické i pro kožní buňky. Kryty na rány vykazující cytotoxicitu mohou ovlivnit buňky různými způsoby. Buňky mohou přestat růst a dělit se, v důsledku buněčné lýzy se může zvýšit nekróza. Všechny tyto účinky snižují buněčnou životaschopnost, proliferaci a mobilitu, což zpomaluje hojení ran [66].

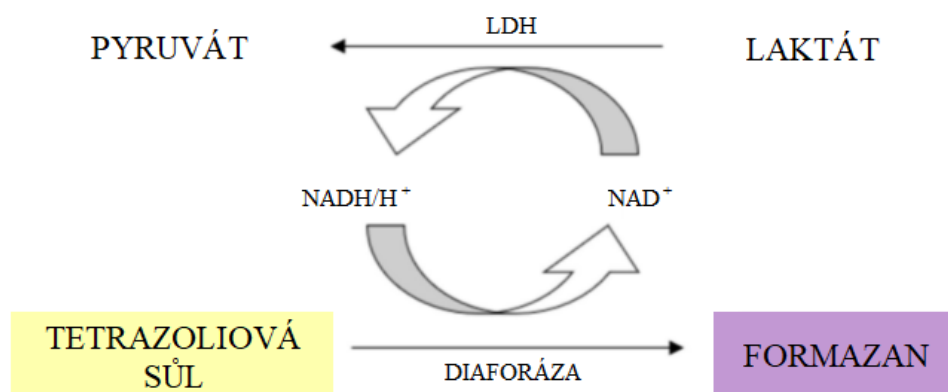
2.9.1 Testy cytotoxicity *in vitro*

Test cytotoxicity, jeden z biologických hodnocení a screeningových testů, využívá tkáňové buňky *in vitro* ke sledování buněčného růstu, reprodukce a morfologických účinků zdravotnických prostředků. A vzhledem k rozmanitosti zdravotnických prostředků, variabilitě prostředí těla a složitosti interakce mezi tělem a zdravotnickými prostředky, nebyla dosud stanovena jednotná metoda hodnocení cytotoxicity. Testů shledáváme hned několik [64].

2.9.1.1 Měření laktátdehydrogenázy (LDH test)

Cytotoxický účinek se hodnotí na základě měření hladiny laktátdehydrogenázy (LDH). Laktátdehydrogenáza je stabilní cytoplazmatický enzym přítomný ve všech buňkách. LDH se rychle uvolňuje z buněčné cytoplazmy do kultivačního média v důsledku poškození buněčné membrány a lýzy buněk. Z tohoto důvodu je LDH test široce používaným kvantitativním testem toxicity různých molekul a léčiv. Měření je založeno na hodnocení schopnosti LDH oxidovat kyselinu mléčnou na kyselinu pyrohroznovou. Nárůst aktivity LDH v supernatantu buněčných kultur ukazuje vztah s procentem mrtvých buněk (zvýšená cytotoxicita koreluje se zvyšujícím se obsahem mrtvých buněk) [67, 68].

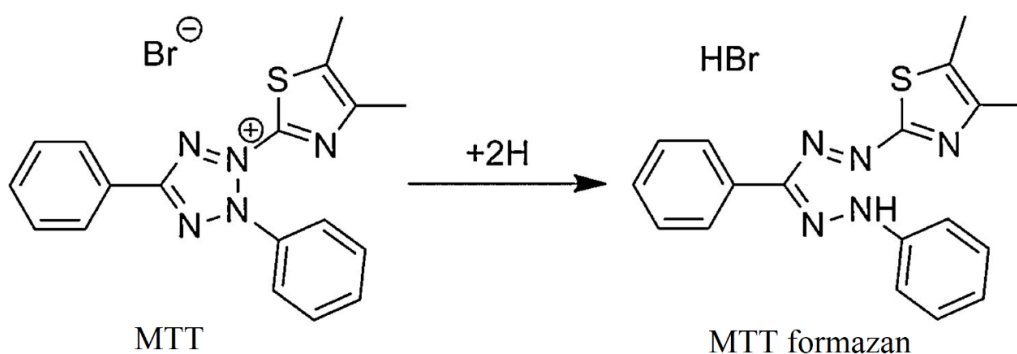
Test cytotoxicity je založen na binárních reakcích. Prvním z nich je redukce NAD^+ na NADH/H^+ katalyzovaná LDH přeměnou laktátu na pyruvát. V následujícím kroku enzym diaforáza využívá nově vytvořené NADH/H^+ ke katalyzování redukce tetrazoliové soli (např. tetrazoliová sůl INT 2-[4-jodfenyl]-3-[4-nitrofenyl]-5-fenyltetrazochlorid) na vysoce zbarvený produkt formazan. Rozpustný formazan vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 550 nm, zatímco žlutý roztok tetrazoliové soli INT neabsorbuje při této vlnové délce [67, 68].



Obrázek 5 Reakce, které jsou základem kvantitativního LDH testu, převzato a upraveno z [68]

2.9.1.2 MTT test

Měření aktivity mitochondriální dehydrogenázy, známé také jako 3-bromid (4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5difenylnitroimidazolium test (MTT test), zajišťuje rychlé vyhodnocení proliferace buněk. MTT test je v současnosti nejběžněji používanou kolorimetrickou metodou pro hodnocení cytotoxicity. Hlavní princip je následující, mitochondriální dehydrogenáza přítomná v místech cytochromu b a c živých buněk může štěpit tetrazolový kruh, vzniklý žlutý ve vodě rozpustný MTT je pak redukován za vzniku purpurového krystalického formazanu. Tato látka je rozpustná v dimethylsulfoxidu a dalších organických rozpouštědlech, ve vodě se však nerozpouští. Množství vytvořených krystalů pozitivně koreluje s počtem buněk a jejich aktivitou. Naměřená hodnota absorbance (optické hustoty) odráží počet buněk a metabolickou aktivitu [62, 64, 69].

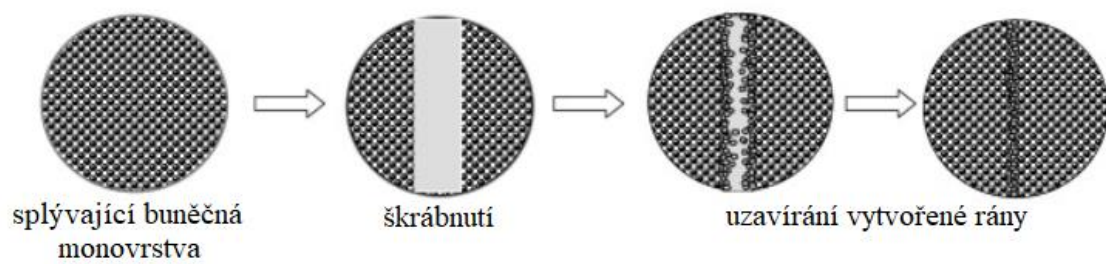


Obrázek 6 Chemická struktura MTT a jeho redukce na formazan [70]

2.9.2 Test „hojení ran“ *in vitro*

Scratch test neboli test škrábání *in vitro* je přímou a ekonomicky výhodnou metodou pro studium migrace *in vitro*. Tento test se často používá k testování migrace buněk. Migrace je důležitý proces, který ovlivňuje několik fyziologických aspektů. Při hojení ran migrace usnadňuje reepitalizaci buněk. A právě studium kolektivní migrace buněk ve dvourozměrné konfluentní monovrstvě ve vysoce kontrolovaných podmínkách *in vitro* umožňuje výzkumníkům simulovat a zkoumat kritické mechanismy působení zahrnuté v procesu. Existuje sice argument, zda lze test, tj. vytvoření umělé mezery tzv. škrábání na splývající buněčné monovrstvě, přirovnat ke skutečné ráně, což je samozřejmě složitější, ale test umožňuje modelování a testování pohybu buněk za dobře definovaných podmínek. Tento test je vhodný pro typy buněk, jako jsou keratinocyty a kožní fibroblasty, které vykazují kolektivní migraci [71, 72, 73].

Tato technika zahrnuje vytvoření lineárního tenkého vrypu „rány“ (vytvoření mezery) v splývající buněčné monovrstvě a následné zachycování snímků buněk vyplňující ránu v pravidelných časových intervalech. Poté je možné analyzovat snímky a kvantifikovat migraci. Test je časově náročnější, jeden až dva dny jsou potřeba k vytvoření buněčné monovrstvy a poté 8 až 18 hodin na migraci buněk k uzavření rány [72, 73].



Obrázek 7 Zjednodušené schéma scratch testu, kolektivní migrace buněk ve splývající buněčné monovrstvě, převzato a upraveno z [74]

3 CÍL PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce byl vývoj nanovláknenného materiálu s integrovanými liposomovými částicemi a obsahem terapeutik, který by mohl sloužit k terapii ran. Hlavním zaměřením této práce byla charakterizace připravených materiálů, kdy velmi důležitou součástí bylo stanovení bezpečnosti připravených krytů za využití lidských kožních buněk.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí cíle:

1. Zpracování rešerše na dané téma
2. Příprava různých nanovláknenných krytů s obsahem liposomů
3. Charakterizace připravených krytů
4. Testování interakce připravených krytů s humánními buňkami
5. Vyhodnocení výsledků a diskuse

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité mikroorganismy

V této práci byly pro stanovení antimikrobiálního účinku zvoleny dva bakteriální kmeny, *Eshcherichia coli* (CCM 8270) a *Staphylococcus epidermidis* (CCM 4418). Zmíněné bakteriální kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.2 Použité buněčné kultury

Připravené materiály v této práci byly testovány v rámci cytotoxicity, veškeré provedené testy byly za využití humánních buněk HaCaT Human keratinocytes cell line pocházejících ze sbírky buněčných kultur Cell Lines Service z Eppelheim v Německu.

4.3 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Boeco (Německo)
- Automatické pipety, Biohit (Německo) a Discovery (Německo)
- Biohazard box, model Airstream třídy II-ESCO, Biotech (Česká republika)
- CellCulture CO₂ inkubátor, ESCO (Německo)
- Centrifuga Sartorius, Biotech (Česká republika)
- Kapalinový chromatograf
- Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS, Malvern (Anglie)
- Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (Česká republika)
- Předvážka Kern 440-32, Kern & Sohn GmbH (Německo)
- Rotační zvlákňovací zařízení
- Spektrofotometr Helios γ , Unicam (Anglie)
- Světelný inverzní biologický mikroskop I-100 L-Scientific, Laboserv (Česká republika)
- Temperovaná třepačka Heidolph Inkubator 1 000, Labicom (Česká republika)
- Ultrazvukový homogenizátor Bandelin Sonoplus HS3200, Sonorex Technik (Německo)
- Vortex, TK3S, Kartellspa (Spojené státy americké)
- Zařízení pro elektrostatické zvlákňování

4.4 Použité chemikálie

4.4.1 Použité chemikálie pro přípravu a charakterizaci liposomových částic

- Acetonitril, Penta (Česká republika)
- Chlorid sodný, Lach-Ner (Česká republika)
- Chloroform, Lach-Ner (Česká republika)
- Cholesterol, Sigma-Aldrich (Německo)
- Kyselina trifluoroctová, P-Lab (Česká republika)
- L- α -fosfatidylcholin, Sigma-Aldrich (Německo)

4.4.2 Použité chemikálie pro přípravu a charakterizaci nanovláknenných krytů

- Acetonitril, Penta (Česká republika)
- Alginát sodný, Sigma-Aldrich (Anglie)
- Chloroform, Lach-Ner (Česká republika)
- Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich (Německo)

- Kyselina octová, Lach-Ner (Česká republika)
- Polyethylenglykol, Sigma-Aldrich (Anglie)
- Polyhydroxybutyrát, Biomer (Německo)
- Tetraethylamonium bromid, Sigma-Aldrich (Anglie)
- Triton-X-100, Sigma-Aldrich (Anglie)
- Želatina, Penta (Česká republika)

4.4.3 Použité chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

- BHI médium, Himedia (Indie)
- NB médium, Himedia (Indie)

4.4.4 Použité chemikálie při testech na humánních buňkách

- Antibiotic-Antimycotic 100X (Biosera), Biotech Německo
- Chlorid draselný, LachNer (Česká republika)
- Chlorid sodný, LachNer (Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný, LachNer (Česká republika)
- 2,4-dinitrofenylhydrazin, Sigma-Aldrich (Německo)
- DMEM medium, Sigma-Aldrich (Anglie)
- Dodecylsírán sodný, Serva (Německo)
- Fetální bovinní sérum (FBS), HyClone (Spojené státy americké)
- Kyselina chlorovodíková, Penta (Česká republika)
- MTT, Duchefa Biochemie (Holandsko)
- NADH, WVR (Spojené státy americké)
- Pyruvát sodný, WVR (Spojené státy americké)
- Trypsin, Versene EDTA, P-Lab (Česká republika)

4.4.5 Použité aktivní látky

Materiály, které byly připravovány za účelem krytí ran, byly doplněny o tyto aktivní látky: ampicilin (Sigma-Aldrich, Anglie) a ibuprofen (Sigma-Aldrich, Anglie).

4.5 Příprava liposomových částic

Liposomy byly připraveny metodou sonikace, pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru. Celkem byly připraveny dva druhy částic, liposomy z lecitinu a cholesterolu a kombinované liposomy s PHB, tj. liposomy z lecitinu, cholesterolu a polymeru PHB. Oba druhy částic byly připraveny s přídavkem aktivní látky, buď s přídavkem antibiotika ampicilinu nebo analgetika ibuprofenu.

Liposomy bez přídavku PHB byly připravovány z cholesterolu a lecitinu v poměru 1 : 9. Do kádinek o obsahu 10 ml destilované vody bylo vždy přidáno 90 mg lecitinu, 10 mg cholesterolu a v případě částic s aktivní látkou bylo přidáno 10 mg této látky. Takto připravená směs byla sonifikována pomocí sondy po dobu 1 minuty v deseti sekundových intervalech, tak aby nedošlo k nadměrnému zahřívání vzorku. Rovněž bylo využito chladicí lázně pro zmírnění horkosti v sondě.

U přípravy kombinovaných liposomů s polymerem PHB bylo využito chloroformu jakožto rozpouštědla. Vždy bylo 10 mg cholesterolu, 60 mg lecitinu a 30 mg daného polymeru rozpuštěno v 1 ml chloroformu. Roztok byl následně přidán do kádinky k 10 ml destilované

vody. Aktivní látka byla přidána opět v množství 10 mg. Obsah kádinky byl poté sonifikován opět po dobu 1 minuty v deseti sekundových intervalech. Nakonec chloroform obsažený v liposomové suspenzi byl odpařen za využití magnetické míchačky s ohřevem.

Celkem byly tedy připraveny čtyři různé typy částic lišící se obsahem aktivní látky nebo přídavkem PHB. Konkrétní složení jednotlivých typů liposomových částic je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1 Složení jednotlivých typů připravených částic

složka	množství			
	liposomy č. 1	liposomy č. 2	liposomy č. 3	liposomy č. 4
cholesterol	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
lecitin	90 mg	90 mg	60 mg	60 mg
PHB	/	/	30 mg	30 mg
ampicilin	10 mg	/	10 mg	/
ibuprofen	/	10 mg	/	10 mg
destilovaná voda	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

4.6 Charakterizace liposomových částic

Součástí charakterizace liposomových částic bylo stanovení enkapsulační účinnosti, velikosti a distribuce velikosti částic, stanovení zeta potenciálu připravených částic a také stanovení postupného uvolňování aktivních látek z částic. Analýza množství aktivních látek (ampicilinu a ibuprofenu) byla provedena pomocí spektrofotometrie a rovněž i citlivější metody HPLC.

4.6.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Z připravených liposomových suspenzí byl vždy odebrán 1 ml do zkumavky typu Eppendorf, který byl centrifugován po dobu 5 minut při 6 000 ot/min (z důvodu usazení největších částic). Supernatant byl odpipetován do nové čisté zkumavky a opět centrifugován. Druhá centrifugace probíhala po dobu 60 minut při 11 000 ot/min. Po odlití supernatantu byly získány liposomy a supernatant byl použit ke stanovení enkapsulační účinnosti, která byla stanovena spektrofotometricky (viz. 4.6.1.1) i pomocí HPLC (viz. 4.6.1.2). Získané částice byly rozsuspendovány v 1 ml destilované vody či v 1 ml fyziologického roztoku, dle způsobu charakterizace.

Enkapsulační účinnost byla stanovena na základě stanovení množství léčiva v supernatantu a odečtení této hodnoty od celkového množství léčiva. Výpočet enkapsulační účinnosti (%) byl proveden dle níže uvedené rovnice (1).

$$EU (\%) = \frac{\text{celkové množství léčiva} - \text{množství léčiva ve volné formě}}{\text{celkové množství léčiva}} \cdot 100 \quad (1)$$

4.6.1.1 Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí spektrofotometrie

Stanovení obsahu aktivních látek (ampicilinu a ibuprofenu) s využitím spektrofotometrie vyžadovalo nejprve sestavení kalibrační přímky a získání kalibrační rovnice pro výpočet

množství daných aktivních látek, čemuž předcházelo zjištění absorpčních maxim těchto látek. Absorpční maxima byla získána proměřením absorpčních spekter terapeutik v rozmezí vlnových délek 200–600 nm. Kalibrační křivka pak byla stanovena proměřením absorbancí kalibračních roztoků, při již stanovených vlnových délkách (260 nm pro ampicilin a 264 nm pro ibuprofen). Konkrétně byly pro kalibraci vytvořeny koncentrační řady roztoků ampicilinu v rozmezí 0,2–1,4 mg/ml a ibuprofenu v rozmezí 0,2–1,8 mg/ml. Ze získaných kalibračních rovnic bylo již možno stanovit množství ampicilinu nebo ibuprofenu v daném roztoku.

Aby tedy byla stanovena enkapsulační účinnost, byla změřena absorbance odebraného supernatantu po druhé centrifugaci (60 minut, 11 000 ot/min) a pomocí kalibrační rovnice byla získána koncentrace dané aktivní látky. Dosazením do rovnice (1) byla stanovena enkapsulační účinnost (%).

4.6.1.2 Stanovení enkapsulační účinnosti metodou HPLC

Analýza pomocí HPLC byla provedena u vzorků získaných stejných způsobem jako u spektrofotometrického stanovení popsaného v předchozí kapitole 4.6.1.1. Byl tedy proměřen odebraný supernatant získaný po druhé centrifugaci. Veškeré vzorky bylo však nutno před analýzou vhodně naředit a přefiltrovat přes nylonový filtr s póry o velikosti 0,45 μm . Vzorky připravené do vialek bylo zapotřebí před stanovením odplynit v ultrazvukové lázni.

Pro výpočet množství aktivních látek bylo třeba sestojit kalibrační přímky a následně získat kalibrační rovnice. Stanovení kalibrační přímky ampicilinu bylo provedeno v rámci experimentální práce loňské diplomové práce [78], rovnice pro stanovení tohoto antibiotika byla tedy převzata. Kalibrační rovnice pro zjištění obsahu ibuprofenu byla stanovena na základě proměření připravené koncentrační řady ibuprofenu v rozmezí 0,1–0,9 mg/ml a sestojení kalibrační přímky jakožto závislosti zintegrované plochy píku na koncentraci daného roztoku ibuprofenu. Hodnoty enkapsulační účinnosti byly získány dosazením stanovených hodnot koncentrací do rovnice (1).

Chromatografické podmínky analýzy, včetně parametrů kolony, jsou uvedeny v tabulce 2 a 3.

Tabulka 2 Chromatografické podmínky při analýze ampicilinu

kolona	Kinetex 2,6 μm C18 100 A, 150 x 4,6 mm
nástřik vzorku na kolonu	20 μl
teplota kolony	25 $^{\circ}\text{C}$
použité mobilní fáze	A) 0,01% TFA; B) ACN
průtok mobilní fáze	0,3 ml/min
typ eluce	izokratická, poměr A a B 80 : 20
vlnová délka detekce	195 nm, 210 nm
celková doba analýzy	6,5 min

Tabulka 3 Chromatografické podmínky při analýze ibuprofenu

kolona	Kinetex 2,6 µm C18 100 A, 150 x 4,6 mm
nástřik vzorku na kolonu	20 µl
teplota kolony	25 °C
použité mobilní fáze	A) ACN; B) demineralizovaná voda
průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
typ eluce	izokratická, poměr A a B 60 : 40
vlnová délka detekce	210 nm, 250 nm
celková doba analýzy	10 min

4.6.2 Stanovení velikosti a distribuce velikosti částic

Stanovení velikosti a distribuce velikosti liposomových částic bylo provedeno pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) na přístroji Malvern Zetasizer za laboratorních podmínek. Roztoky liposomových částic (částice rozsuspendované v destilované vodě) byly před samotnou analýzou 100krát naředěny destilovanou vodou. Pro každý typ připravených liposomů byla průměrná hodnota velikosti a distribuční koeficient zaznamenány vždy celkem třikrát.

4.6.3 Stanovení elektrokinetické stability částic

Stanovení stability připravených liposomových částic jakožto koloidních systémů bylo opět provedeno na přístroji Malvern Zetasizer, stabilita byla zjišťována jako hodnota zeta potenciálu. Roztoky liposomových částic (částice rozsuspendované jak v destilované vodě, tak i ve fyziologickém roztoku) byly rovněž před analýzou 100krát naředěny destilovanou vodou. Připravený vzorek s částicemi byl vždy umístěn do Dip cely, která byla následně vložena do přístroje. Ze zaznamenané hodnoty zeta potenciálu byla určena stabilita částic. Liposomy s hodnotou zeta potenciálu menší než -30 mV a větší než 30 mV byly vyhodnoceny jako stabilní.

Stabilita liposomů byla stanovena ihned po jejich přípravě, dále po týdnu a po 6 týdnech.

4.6.4 Stanovení postupného uvolňování aktivních látek z částic

Postupné uvolňování aktivních látek (ampicilinu a ibuprofenu) z liposomů bylo sledováno dvěma metodami, spektrofotometricky a metodou HPLC. Množství uvolněných léčiv bylo sledováno u všech připravených typů liposomových částic ve zvolených časových intervalech do prostředí tvořeného destilovanou vodou nebo fyziologických roztokem.

Postup stanovení byl následovný: z připravených suspenzí liposomových částic vytvořených pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru byl vždy odebrán 1 ml do zkumavky typu Eppendorf. Roztoky byly následně centrifugovány po dobu 5 minut při 6 000 ot/min. Supernatant byl oddělen od precipitátu a centrifugován po dobu 60 minut při 11 000 ot/min. Postup doposud shodný jako v kapitole 4.6.1. Po centrifugaci byl supernatant odpipetován a k precipitátu tvořeného částicemi byl přidán 1 ml daného prostředí (destilované vody nebo fyziologického roztoku). Částice byly v daném prostředí rozsuspendovány a takto ponechány po potřebnou dobu. Liposomové částice v prostředí tvořeném fyziologickým roztokem byly inkubovány při teplotě 37 °C. Naopak částice, které se nacházely v prostředí destilované vody byly po potřebnou dobu ponechány při laboratorní teplotě. Následně po uplynutí určené doby

byly liposomy s obsahem aktivních látek stočeny v centrifuze (60 minut, 11 000 ot/min) a supernatant byl ponechán k analýze, tedy ke stanovení množství uvolněných látek.

Spektrofotometrické stanovení obsahu daných látek v supernatantu bylo provedeno na základě změření absorbance supernatantu (při vlnové délce 260 nm pro ampicilin a 264 nm pro ibuprofen) a dosazením této hodnoty do kalibrační rovnice zjištěné dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1.1.

Uvolněné množství ampicilinu a ibuprofenu bylo ověřeno i metodou HPLC, kdy postup pro úpravu vzorku, zde odebraného supernatantu, byl shodný s postupem uvedeným v kapitole 4.6.1.2. V té jisté kapitole je uveden rovněž i postup získání kalibračních rovnic těchto léčiv, nezbytných pro výpočet koncentrace uvolněných látek do zmíněných prostředí.

4.7 Příprava a optimalizace přípravy nanovláknenných krytů

Pro přípravu nanovláknenných krytů byly použity zvláknovací techniky přípravy, konkrétně bylo využito odstředivého a elektrostatického zvláknování (viz. Obrázek 8). Nejprve však bylo nutné provést optimalizaci procesu přípravy nanovláken. Vlastnosti roztoků určených ke zvláknování, jako je např. koncentrace, viskozita či vodivost (vodivost v případě elektrostatického zvláknování) jsou jedny z nejdůležitějších faktorů ovlivňující kvalitu připravených vláken. Dalšími faktory, které mají vliv na výslednou morfologii a jiné vlastnosti připravených vláken, jsou v případě elektrostaticky připravovaných vláken parametry jako pracovní vzdálenost (tj. vzdálenost mezi vodivým sběračem a hrotem jehly), použité napětí a průtok. Správná kontrola pracovních parametrů je tedy klíčová pro získání požadovaných vlastností připravených nanovláknenných krytů. Bylo tedy nutné připravit roztoky o koncentraci vhodné ke zvláknování a nalézt žádoucí podmínky pro přípravu nanovláknenných krytů.

Co se týče použitých materiálů ke zvláknování, byly vybrány tyto biopolymerní materiály: alginát, PHB a želatina. Nanovláknenné kryty z alginátu a želatiny byly připraveny metodou elektrospinning. Kryty na bázi PHB byly připraveny oběma zmíněnými technikami, tedy metodou forcesspinning i elektrospinning. V následujících kapitolách jsou uvedeny pracovní postupy výroby nanovláken z uvedených biopolymerů.



Obrázek 8 Zvláknovací zařízení: elektrospinnová soustava (vlevo), zařízení pro odstředivé zvláknování (vpravo)

4.7.1 Optimalizace přípravy alginátových krytů

4.7.1.1 Příprava pracovních roztoků

Elektrostatické zvlákňování je mezi výzkumníky nejrozšířenější metodou pro přípravu nanovláken, alginát sodný (SA) však není zcela vhodným pro tuto metodu. Jedná se totiž o totiž polyelektrolytový biopolymer obsahující polyanionty. Polyanionty molekuly alginátu se vzájemně odpuzují a brání tak zapletení molekulových řetězců. Navíc alginát sodný, zejména alginát o vyšším obsahu kyseliny guluronové, která snadno vytváří gel, se stává příliš viskózním pro elektrostatické zvlákňování již při mírně vyšší koncentraci. Tyto problémy lze překonat přidáním vhodného kopolymeru a malého množství povrchově aktivní látky do roztoku alginátu sodného. Bylo zjištěno, že vodíkové můstky mezi polyelektrolyty a polymerem PEO usnadňují elektrostatické zvlákňování. Specifikovaný podíl alginátu sodného a PEO spolu s malým množstvím povrchově aktivní látky snižuje povrchové napětí a viskozitu, což nám pak umožňuje použít metodu elektrostatického zvlákňování. Takže v důsledku toho by se schopnost roztoku alginátu sodného tvořit vlákna zvýšila, a to dokonce i při vyšším obsahu alginátu v roztoku [75]. Z těchto uvedených důvodů byl do všech připravených alginátových roztoků přidán kopolymer PEO. Celkem bylo připraveno 7 různých alginátových roztoků, které se lišily poměrem alginát/PEO, přidáním rozpouštědlem či přidáním povrchově aktivních látek (PAL). V tabulce 4 je pak uvedeno složení všech připravených roztoků.

Co se týče samotné přípravy jednotlivých roztoků, nejprve byly připraveny roztoky, kde rozpouštědlem byla kyselina octová (AA). Byly připraveny řady pracovních roztoků, kde směs polymerů SA/PEO (v poměru 1 : 1) představovala 4 a 5 hm. % z celkového množství připraveného roztoku. Roztok s obsahem polymeru SA/PEO o koncentraci 4 hm. % byl připraven dvakrát, každý z roztoků obsahoval však kyselinu octovou o jiné koncentraci (25% AA a 50% AA). Takto připravené roztoky o specifickém množství alginátu sodného a PEO s obsahem AA o dané koncentraci byly vždy ponechány po dobu 24 h na magnetické míchačce se zapnutým ohřevem (teplota 37 °C).

Dále byl na základě údajů vědeckého článku [75] připraven další roztok, kde polymer SA/PEO (v poměru 7 : 3) o koncentraci 4 hm. % byl rozpuštěn v destilované vodě. K tomuto roztoku bylo následně přidáno 0,5 hm. % povrchově aktivní látky Triton X-100, aby se zlepšila homogenita a schopnost elektrostatického zvlákňování roztoku. Následně byl takto připravený roztok ponechán opět po dobu 24 hodin na magnetické míchačce při laboratorní teplotě. Další připravený roztok byl opět o obsahu SA/PEO (poměr 7 : 3), destilované vody a Tritonu X-100, SA/PEO ale tvořil 5 hm. %, příprava probíhala opět za laboratorní teploty za využití magnetické míchačky po dobu 24 hodin.

Další připravené roztoky byly připraveny o obsahu alginát/PEO v poměru 1 : 1, rozpouštědlem byla opět destilovaná voda. Roztoky se lišily koncentrací polymeru (5 a 4 hm. %) a přísadkou povrchově aktivních látek. Povrchově aktivními látkami (PAL) byl opět Triton X-100 (0,5 hm. %) a DMSO (5 hm. %), které byly přidány pro snížení povrchového napětí a viskozity. Vybrané koncentrace byly opět zvoleny na základě dostupných údajů vědeckého článku [76].

Tabulka 4 Složení jednotlivých roztoků použitých pro tvorbu alginátových krytů

roztok č.	roztok SA/PEO [hm. %]	poměr SA a PEO	rozpouštědlo	PAL [hm. %]	
				Triton X-100	DMSO
1	4	1 : 1	25% AA	/	/
2	4	1 : 1	50% AA	/	/
3	4	7 : 3	dest. voda	0,5	/
4	5	7 : 3	dest. voda	0,5	/
5	5	1 : 1	dest. voda	0,5	5
6	5	1 : 1	dest. voda	0,5	/
7	5	1 : 1	50% AA	/	/

4.7.1.2 Zvláknování roztoků metodou elektrospinning

Příprava nanovláken z alginátu/PEO byla provedena na elektrospinnové soustavě, která se skládá z: čerpadla, vysokonapěťového napájecího zdroje, uzemněného kovového kolektoru pokrytého hliníkovou fólií a injekční stříkačky s kapilární jehlou s tupým hrotem. Samotný postup procesu zvláknování vždy zahrnoval: naplnění stříkačky potřebným objemem pracovního roztoku, následné připojení stříkačky k pumpě, umístění kovového sběrače naproti pumpě o zvolené pracovní vzdálenosti (vzdálenost konce jehly od kolektoru), připojení svorek s elektrickým napětím ke zvláknovací jehle a kolektoru, po připojení svorek k oběma elektrodám následovalo uzemnění kolektoru (uzemnění pomocí zemnicího kolíku zásuvky). Když byly parametry nastaveny, bylo nejprve spuštěno čerpadlo. Jakmile se na konci jehly objevila kapka zásobního roztoku, byl zapnut zdroj napětí. Experimenty byly prováděny při pracovní vzdálenosti 7–15 cm, průtoku 0,2–0,4 ml/h. a napětí 12–17 kV. Ke zvláknování byly použity kapilární jehly s tupým hrotem o různých rozměrech, konkrétně jehla o délce 4 cm a průměru 0,8 mm a jehla o délce 2 cm a průměru 1,2 mm.

Během procesu zvláknování by se na hliníkovou fólii po určitém čase měla nanést vlákna, která by následně vytvořila sběrnou zónu vláken (sít) ve formě kruhu. Vytvořená vlákna by pak byla opatrně sundávána z kolektoru a uchována v Petriho miskách při laboratorní teplotě, tak jako tomu bylo u zvláknování roztoků PHB a roztoků želatiny. Bohužel u veškerých provedených experimentů elektrostatického zvláknování SA/PEO nebyla pozorována tvorba vláken, konkrétní výsledky procesu optimalizace tvorby alginátových krytů a souhrn všech provedených experimentů je uveden v kapitole 5.2.1.

4.7.2 Optimalizace přípravy krytů na bázi PHB

4.7.2.1 Příprava pracovních roztoků

Pro přípravu nanovláknenných krytů z PHB byly vyzkoušeny tři roztoky lišící se koncentrací PHB. Konkrétně byly připraveny pracovní roztoky s obsahem PHB 1, 2 a 4 hm. %. Co se týče použitého rozpouštědla, pro všechny tři roztoky byl rozpouštědlem chloroform. Vždy bylo naváženo specifické množství PHB, které bylo následně rozpuštěno v daném objemu rozpouštědla. Metoda elektrostatického zvláknování však vyžaduje roztoky o určité vodivosti, přidáním tetraethylamonium bromidu dojde ke změně iontové síly, a tedy k dosažení vyšší vodivosti roztoků, proto bylo k roztokům přidáno 0,2 hm. % této látky. Připravený roztok byl vždy zahříván na magnetické míchačce (60 °C) dokud nedošlo k úplnému rozpuštění polymeru.

V případě vláken obohacených o aktivní látku (ampicilin nebo ibuprofen) bylo ke zvláknovacímu roztoku přidáno množství aktivní látky odpovídající 5 nebo 10 % celkovému množství PHB v roztoku chloroformu.

4.7.2.2 Zvláknování roztoků metodou elektrospinning

Příprava nanovláken byla provedena ze všech připravených pracovních roztoků. Postup zvláknování na elektrospinnové soustavě byl téměř shodný s postupem uvedeným v předchozí kapitole (kapitola 4.7.1.2), výjimkou však bylo použití kapilární jehly. Ve zkratce, plastová injekční stříkačka byla naplněna pracovním roztokem a umístěna k pumpě, hrot stříkačky byl obalen hliníkovou fólií, pomocí krokosvorek byl hrot stříkačky a kolektor připojeny ke zdroji napětí, následovalo nastavení rychlosti přívodu vzorku na pumpě (4–7 ml/h.), nastavení pracovní vzdálenosti (15 cm) a nastavení napětí na zdroji (15 kV). Množství zvlákněného pracovního roztoku o obsahu 4 hm. % PHB bylo 5 ml, roztoku o obsahu 2 hm. % PHB 10 ml a roztoku o obsahu 1 hm. % PHB 15 ml. Tvorba vlákna byla pozorována u všech experimentů provedených se všemi uvedenými roztoky. Zde se během všech procesů podařilo vytvořit sběrnou síť vláken, která tvarově představovala kruh. Vytvořená vlákna byla tedy pečlivě a velice opatrně sundána z kolektoru a uchována v Petriho miskách.

Pracovní roztok (resp. jeho koncentrace), u něhož byl hladký průběh zvláknování, byl pak zvolen k přípravě nanovlákněných krytů s obsahem aktivních látek. Parametry vyhodnocené jakožto nejvhodnější pro tvorbu vláken byly použity i při přípravě vláken s terapeutiky.

4.7.2.3 Zvláknování roztoků metodou forcesspining

Tvorba vláken metodou odstředivého zvláknování byla provedena ze všech připravených roztoků. Zvláknované množství jednotlivých roztoků bylo různé. Roztoku o obsahu 4 hm. % PHB bylo zvlákněno 10 ml, roztoku o poloviční koncentraci (2 hm. % PHB) bylo zvlákněno dvojnásobné množství, a tedy 20 ml. Roztoku o nejnižší koncentraci PHB (1 hm. %) bylo zvlákněno až 30 ml. Příprava nanovláken touto technikou spočívala v pomalém přikapávání pracovního roztoku na střed rotujícího disku, kdy na základě odstředivé síly docházelo k tvorbě vláken, která byla zachytávána na tyčích po obvodu (na kolektoru). Vytvořená vlákna byla opatrně sundána z kolektoru a uchována v Petriho miskách.

I v případě přípravy vláken metodou odstředivého zvláknování byl na základě průběhu procesu přípravy vláken a samotných vytvořených vláken zvolena nejvhodnější koncentrace pracovního roztoku pro tvorbu nanovlákněných krytů s léčivy.

4.7.3 Optimalizace přípravy želatinových krytů

4.7.3.1 Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky pro přípravu želatinových nanovlákněných krytů byly připraveny celkem dva. Rozpouštědlem pro oba roztoky byla 50% kyselina octová. První roztok byl připraven rozpouštěním 2,5 g v 10 ml 50% kyselině octové, druhý roztok o vyšší koncentraci byl připraven rozpouštěním 3 g v 10 ml 50% kyselině octové. V případě roztoků s aktivní látkou bylo vždy k roztoku želatiny přidáno 5 nebo 10 % odpovídající celkovému množství želatiny. Roztoky byly míchány na magnetické míchačce s ohřevem (30 °C) dokud nebyla želatina zcela rozpouštěna.

4.7.3.2 Zvlákňování roztoků metodou elektrospinning

Postup procesu elektrostatičkého zvlákňování všech připravených pracovních roztoků želatiny byl shodný s postupem přípravy ostatních typů krytů. Proces se samozřejmě lišil v nastavených parametrech, pracovní vzdálenosti, napětí, průtoku a rozměrech použité kapilární jehly. Zde byly nastavené parametry zvoleny na základě údajů dostupného vědeckého článku, včetně zvolené koncentrace pracovních roztoků [77]. Konkrétně bylo vycházeno z těchto hodnot: vzdálenost od hrotu jehly ke kolektoru nastavena na 10 cm, aplikované napětí nastaveno na 15 kV a průtok se pohyboval v rozmezí 0,4 až 1 ml/h. Součástí optimalizace byl také výběr vhodné zvlákňovací jehly, bylo vyzkoušeno zvlákňování s kapilární jehlou o délce 2 cm a průměru 0,8 mm a s jehlou o délce 2 cm a průměrem 1,2 mm.

I v tomto případě se podařilo vytvořit sběrnou síť vláken, která byla opatrně sejmuta z kolektoru a uchována v Petriho misce. Kryty s obsahem léčivých látek byly pak připraveny na základě zoptimalizovaných parametrů.

4.8 Charakterizace připravených nanovláčenných krytů

4.8.1 Stanovení stability vláken

Ke stanovení stability vláken byly využity připravené kryty bez obsahu aktivních složek. Z každého typu připravených krytů byl vystřižen čtverec o velikosti 1 cm², který byl následně zvážen (hmotnost 1), umístěn do zkumavky typu Eppendorf a zalit 2 ml modelového prostředí. Modelovým prostředím byla buď destilovaná voda nebo fyziologický roztok. Zkumavka se vzorkem byla vždy naplněna jedním z daných prostředí a po uplynutí potřebné doby byl vzorek krytu vysušen a zvážen (hmotnost 2). Vzorky umístěné v prostředí tvořeném fyziologickým roztokem byly inkubovány při teplotě 37 °C a vzorky v prostředí destilované vody byly ponechány při teplotě laboratoře. Výsledkem bylo pak porovnání hmotností 1 a 2. A stanovení každého vzorku bylo provedeno celkem třikrát.

4.8.2 Stanovení postupného uvolňování aktivních látek z krytů

Sledování postupného uvolňování ampicilinu a ibuprofenu bylo provedeno se všemi připravenými nanovláčennými textiliemi obsahujícími tato léčiva. Tak jako u předchozího stanovení byl i zde využit čtverec nanovláčenného krytu o velikosti 1 cm² a známé hmotnosti, jenž byl umístěn do zkumavky typu Eppendorf a následně zalit 2 ml modelového prostředí. Opět prostředí byla tvořena destilovanou vodou a fyziologickým roztokem. Nanovláčenné kryty umístěné do prostředí fyziologického roztoku byly ponechány v inkubátoru s nastavenou teplotou na 37 °C, v případě uvolňování terapeutik do destilované vody byla zvolena laboratorní teplota. Vždy po uplynutí zvolené doby byla vlákna vytažena z daných prostředí a samotná prostředí byla ponechána ke stanovení množství uvolněných terapeutik.

Stanovení uvolněného množství terapeutik do daných prostředí byla provedena spektrofotometricky, tak jako tomu bylo i v případě liposomových částic. Zde byl tedy postup určení shodný s postupem spektrofotometrického stanovení množství uvolněných látek z částic (viz. kapitola 4.6.4).

4.9 Příprava nanovláknenných krytů s inkorporovanými liposomy

Snahou této práce byl vývoj nanovláknenného materiálu s integrovanými liposomovými částicemi, který by mohl sloužit jako zdroj terapeutických látek a stal se tak vhodným prostředkem pro terapii ran. Samozřejmostí takového materiálu bylo také zachování struktur a funkcí jak liposomů, tak i vybraných polymerů, a také zajištění synergie v oblasti dodávání léčivých látek mezi těmito systémy. V této kapitole jsou uvedeny postupy tvorby nanovláknenných vrstev s obsahem liposomů metodou elektrostatického zvláknování, jejíž součástí je rovněž i optimalizace podmínek procesu tvorby vláken.

Výběr materiálů pro vývoj těchto hybridních systému byl uskutečněn na základě výsledků optimalizace procesu elektrostatického zvláknování různých polymerů (viz. 5.2) (alginátu, PHB a želatiny). Experimenty byly provedeny s liposomy, které byly připraveny dle postupu v uvedeném v kapitole 4.5.

Níže jsou popsány způsoby přípravy nanovláknenných vrstev ze dvou různých polymerních materiálů s přidavky různých typů liposomových částic.

4.9.1 Kryty na bázi PHB s obsahem liposomových částic

K začlenění funkčních materiálů (zde liposomů) do biodegradovatelných polymerních vláken bylo využito tzv. emulzního elektrostatického zvláknování, jehož princip je uveden v teoretické části práce (viz. kapitola 2.6.2). Těto metody bylo využito z důvodu potřeby současného zvláknování dvou nemísitelných složek. Biologicky rozložitelný vláknotvorný materiál PHB byl solubilizován v organickém rozpouštědle (chloroformu), zatímco získané liposomy byly suspendovány ve vodném prostředí (destilované vodě). Emulze (typu V/O) pro tuto metodu byla vytvořena za využití tyčového ultrazvukového homogenizátoru.

Samotný postup tvorby nanovláken z polymeru PHB s obsahem částic zahrnoval nejprve přípravu pracovního roztoku PHB, kdy koncentrace tohoto polymeru v roztoku byla vybrána na základě výsledků optimalizace přípravy krytů na bázi PHB (viz. 5.2.2.1). K připravenému PHB roztoku (10 ml) bylo následně přidáno 250 μ l liposomových částic rozsuspendovaných v destilované vodě, takto připravený roztok byl dále sonifikován po dobu 30 sekund. S připravenou emulzí již mohlo být přistoupeno k procesu zvláknování. Pracovní parametry pro tvorbu vláken byly zvoleny také na základě výsledků optimalizace. Postup přípravy krytu byl shodný s postupem popsáný v kapitole 4.7.2.2. Po ukončení procesu zvláknování následovalo snímání vytvořené nanovrstvy z kolektoru.

Nanovláknenný kryt s integrovanými částicemi byl nejprve připraven bez přítomnosti terapeutik a s liposomy bez enkapsulované léčivé složky. Na základě optimalizace, tj. zvolení správných parametrů a vhodného množství vodné složky v roztoku PHB, byla provedena i příprava vláken s terapeutiky, které byly přidány jak do pracovního roztoku, tak i do liposomových částic. Celkem byly připraveny tři druhy krytů lišící se obsahem aktivní složky a typem připravených částic, konkrétní složení jednotlivých krytů je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5 Připravené kryty na bázi PHB s obsahem liposomových částic

PHB kryt č.	přidaná aktivní látka	typ přidaných částic
1	/	liposomy s ampicilinem
2	ibuprofen	liposomy s ampicilinem
3	ampicilin	liposomy s ibuprofenem

4.9.2 Želatinové kryty s obsahem částic

Příprava želatinových krytů s obsahem částic byla provedena s roztokem želatiny, jehož koncentrace byla zvolena na základě výsledků optimalizace (viz. 5.2.3), a částicemi rozsuspendovanými v destilované vodě. Konkrétně bylo připraveno 5 ml želatinového roztoku, ke kterému bylo přimícháno 250 μ l částic v destilované vodě. Po důkladném pomíchání bylo možno přistoupit ke tvorbě vláken. Zvláknění bylo provedeno metodou elektrostatického zvláknění, dle postupu uvedeném v kapitole 4.7.3. Pracovní parametry byly určeny opět na základě procesu optimalizace přípravy želatinových krytů.

Želatinových krytů s obsahem částic bylo připraveno celkem 6, připravené kryty se lišili obsahem léčiv a typem částic (částice s PHB i bez PHB). Příprava krytů s aktivními látkami byla provedena až dle provedené optimalizace přípravy nanovláken bez inkorporovaných léčiv s liposomy připravenými bez ampicilinu a ibuprofenu. V níže uvedené tabulce 6 jsou zapsány veškeré připravené želatinové kryty s obsahem částic.

Tabulka 6 Připravené želatinové kryty s obsahem liposomových částic

želatinový kryt č.	přidaná aktivní látka	typ přidaných částic
1	/	liposomy s ampicilinem
2	/	liposomy s ampicilinem a PHB
3	ibuprofen	liposomy s ampicilinem
4	ibuprofen	liposomy s ampicilinem a PHB
5	ampicilin	liposomy s ibuprofenem
6	ampicilin	liposomy s ibuprofenem a PHB

4.10 Charakterizace nanovláknenných krytů s inkorporovanými liposomy

Charakterizace připravených nanostrukturních hybridních systémů se týkala kontroly uvolňování aktivních látek z nanovláken, tak jako tomu bylo i u samotných vláken a liposomových částic. Avšak důležitou součástí byl kvalitativní důkaz přítomnosti liposomů ve vláknech. K ověření přítomnosti částic ve vláknenné vrstvě bylo využito fluorescenčního mikroskopu. Ověření bylo provedeno u nanovláken s částicemi bez enkapsulovaných aktivních látek. Pro sledování fluorescence bylo využito fluorescenční sondy BODIPY 493/503, která bývá používána právě ke značení fosfolipidů. Tato membránová sonda (0,5 μ l) byla přidána k již připraveným liposomovým částicím suspendovaných v destilované vodě (250 μ l), těsně před procesem zvláknění.

4.10.1 Postupného uvolňování aktivních látek z krytů s obsahem liposomů

Kontrola uvolňování léčiv ampicilinu i ibuprofenu byla provedena metodou HPLC. A tak jako i u sledování postupného uvolňování ze samotných nanovláken, byl i zde předem zvážený čtvereček vytvořené nanostruktury vložen do zkumavky typu Eppendorf a přelit 2 ml modelového prostředí (destilovanou vodou nebo fyziologickým roztokem). Po uplynutí zvolené doby byl čtvereček vyndán a prostředí s uvolněnou látkou ponecháno k analýze. Úprava vzorku pro analýzu na kapalinovém chromatografu a samotný proces stanovení byl proveden dle postupu v kapitole 4.6.4.

4.11 Antimikrobiální stanovení

Stanovení vlivu aktivních látek inkorporovaných do připravených nanomateriálů vůči mikroorganismům bylo provedeno bujónovou diluční metodou. Zvolenými modelovými mikroorganismy byly fakultativně anaerobní kmeny bakterií. *Escherichia coli* byla zvolena jakožto zástupce gramnegativních bakterií a *Staphylococcus epidermidis* pak zastupoval bakterie grampozitivní.

4.11.1 Příprava živných médií a kultivace vybraných bakteriálních kmenů

Před samotným antimikrobiálním testem bylo třeba připravit inokulum zaočkováním dané bakteriální kultury do tekutého živného média. Živnými půdami pro kultivaci byla komerčně dostupná média (viz. Tabulka 7), která byla připravena dle instrukcí udávaných výrobcem. Média byla připravována do 100 ml Erlemeyerových baněk rozpuštěním v 50 ml destilované vody. Ke sterilaci médií byl využit tlakový hrnec, kde sterilace probíhala po dobu 35 minut a teplotě 120 °C. Vychladlá média byla následně zaočkována 1 ml dané bakteriální kultury uchovávané v tekutých médiích. Takto připravená média byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci, tj. uplynutí 24 hodin, byl odebrán 1 ml inokula do nově připraveného sterilního média, které bylo využito následnému antimikrobiálnímu testu.

Tabulka 7 Použitá živná média pro kultivaci vybraných mikroorganismů

mikroorganismus	médium	množství média [mg/ml]
<i>Escherichia coli</i>	Nutrient Broth (NB)	25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Brain Heart Infusion (BHI)	37

4.11.2 Bujónová diluční metoda

Inhibice růstu uvedených bakteriálních kmenů byla sledována pomocí bujónové diluční metody na 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Tato metoda využívá tvorby zákalu, jenž lze pak charakterizovat pomocí spektrofotometrie, zde bylo využito konkrétně ELISA readeru.

Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo vždy pipetováno 50 µl testované aktivní látky ve formě roztoku a 150 µl naředěné kultury. Blank, který je nutný pro sledování růstu mikroorganismu, byl připraven z 50 µl rozpouštědla (tj. destilované vody) a 150 µl zředěné kultury buněk. Následně bylo využito ELISA readeru, kdy byla změřena absorbance v čase 0 a po 24 hodinách kultivace (kultivace při 37 °C na třepačce) při vlnové délce 630 nm.

4.12 Stanovení bezpečnosti připravených materiálů

Pro zjištění bezpečnosti připravených materiálů určených pro hojení ran byly provedeny cytotoxické testy na humánních keratinocytech linie HaCaT, provedeným testem byl test MTT (viz. kapitola 4.12.3) a spolu s ním i LDH test (viz. kapitola 4.12.4). Bezpečnost byla testována pouze u vlákných materiálů (z polymerů PHB a želatiny) s obsahem liposomových částic. Testování vlivu působení roztoků o různých koncentracích ampicilinu (0,04–1,28 mg/ml) a ibuprofenu (0,3–0,96 mg/ml), které byly inkorporovány jak do vlákných krytů bez obsahu částic, tak i samotných liposomových částic, bylo provedeno v rámci loňské diplomové práce [78] a protože cytotoxický účinek těchto aktivních látek po jejich aplikaci nebyl prokázán, bylo přistoupeno rovnou k testování hybridních vlákných materiálů s částicemi. Kromě určení

bezpečnosti z hlediska cytotoxicity, byla sledována i kolektivní migrace keratinocytů v rámci provedení scratch testu neboli testu „hojení ran“. Migrace buněk jakožto důležitý proces při reepitalizaci kůže byla sledována rovněž u připravených krytů s obsahem částic.

4.12.1 Příprava materiálů pro testování bezpečnosti

MTT test i test „hojení ran“ byly provedeny s 24 jamkovými mikrotitračními destičkami, do kterých byl vždy umístěn předem zvážený vzorek nanovákenného krytu ve tvaru čtverce o velikosti 1 cm². Takto připravené vzorky bylo třeba před inkubací s buněčnou kulturou vysvětlit v laminárních boxu UV zářením (po dobu 20 minut).

4.12.2 Kultivace humánních keratinocytů

Humánní keratinocyty linie HaCaT (pasáž 10) byly kultivovány v komerčním médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose), které bylo připraveno s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra (FBS) a 1 % antibiotika. Protože média nebo i následně použitý fosfátový pufr (PBS) bývají uchovávány v chladu, je nutné tyto roztoky před použitím vytemperovat na teplotu 37 °C, aby nedošlo k teplotnímu šoku u buněk. Samotná kultivace probíhá v inkubátoru nastaveném na teplotu 37 °C, relativní vlhkost 90 % a obsah CO₂ na 5 %. Je také třeba zmínit, že při veškeré manipulaci s humánními buňkami je důležité brát velký zřetel na sterilitu. Buňky je třeba při kultivaci denně kontrolovat pod mikroskopem, bývá kontrolován celý obsah kultivační lahvičky.

V případě, že při mikroskopické kontrole je zaznamenána konfluence nad 80 %, musí být přistoupeno k tzv. pasážování, tj. převedení buněk ze staré kultivační lahvičky do dvou nových. Stejně tak, pokud je vizuálně pozorována změna barvy média (změna z červené na oranžovou) musí být provedena výměna média.

Co se týče samotného pasážování, je nutné nejprve z kultivačních lahviček vylít médium, následně promýt lahvičky PBS (promývání provést celkem 3x) a po promytí přidat trypsin (do velké kultivační lahvičky 1 ml trypsinu). Kultivační lahvičky s rozlitym trypsinem je třeba inkubovat po dobu 10 minut při 37 °C. Poté následuje mikroskopická kontrola, kdy pozorujeme kulaté plovoucí buňky, které byly odlepeny ode dna kultivační lahvičky díky působení enzymu. K buňkám je dále přidáváno 5 ml PBS a celý obsah kultivační lahvičky je převeden do centrifugační zkumavky. Po stočení buněk v PBS při 320–360 ref (25 °C) po dobu 5 minut jsou buňky získány v podobě peletky na spodu centrifugační zkumavky. Peletku buněk je pak třeba rozsuspendovat v 5 ml nového DMEM média a následně médium s buňkami rozdělit do dvou nových kultivačních lahviček. Lahvičky jsou samozřejmě doplněny na požadovaný objem a zkontrolovány pod mikroskopem.

4.12.3 MTT test

Cytotoxicita byla nejprve testována prostřednictvím stanovení aktivity mitochondriální dehydrogenázy. Pro tento kolorimetrický test byly keratinocyty získány z kultivační lahvičky pomocí trypsinu, PBS a převedením obsahu lahvičky do centrifugační zkumavky. Po centrifugaci byl slit PBS a peletka buněk rozsuspendována v 5 ml média. Prvotní postup byl tedy shodný jako při pasážování, včetně nastavených parametrů na centrifuze. Následně byla mikroskopicky stanovena koncentrace buněk, kdy ke 100 µl odebrané suspenze buněk do zkumavky typu Eppendorf bylo přidáno 100 µl tropanové modře (poměr 1 : 1). Tato vytvořená

směs byla následně pomocí pipety převedena pod krycí skříčko na Bürkerově komůrce. Po stanovení koncentrace buněk byla buněčná kultura naředěna na koncentraci $2 \cdot 10^4$ buněk/100 μ l. Následně byla vhodně naředěná kultura buněk rozpipetována na 24 jamkovou mikrotitrační destičku, 500 μ l kultury na jamku. Připravené destičky s buňkami byly dále ponechány po dobu 24 hodin v inkubačním boxu.

Po 24 hodinách bylo médium z jednotlivých jamek odpipetováno a nahrazeno stejným objemem nového média, do každé jamky (s vynecháním kontroly) byl přidán čtvereček zváženého nanovláknenného krytu. Destička se vzorky byla následně ponechána k inkubaci opět po dobu 24 hodin.

Na třetí den byly z jamek odebrány vzorky a odpipetováno médium. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l barviva MTT (2,5 mg/ml v PBS, přefiltrované) a destička byla ponechána k inkubaci. Po třech hodinách inkubace bylo do každé jamky přidáno 500 μ l 10% SDS v PBS. Následně byla destička obalena hliníkovou fólií a po 24 hodinách uchování ve tmě za laboratorní teploty byla spektrofotometricky (pomocí ELISA readeru) změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Nakonec byla metabolická aktivita keratinocytů inkubovaných s nanovláknennými kryty porovnána s mitochondriální aktivitou keratinocytů inkubovaných v čistém médiu (tj. kontrolou).

4.12.4 LDH test

LDH test zaměřený na stanovení hladiny laktátdehydrogenázy, enzymu uvolňujícího se z buněčné cytoplasmy důsledkem poškození buněčné membrány, byl proveden s médiem odpipetovaným z jednotlivých jamek mikrotitrační destičky po provedení předchozího MTT testu.

Tento test byl proveden s využitím 96 jamkové mikrotitrační destičky, kdy do každé jamky bylo napipetováno 10 μ l buněčného supernatantu. Supernatant každého vzorku byl pipetován celkem třikrát. Následně bylo k těmto 10 μ l přidáno 50 μ l NADH rozpuštěného v pyruvátu sodném (0,75 mM), koncentrace pyruvát/NADH činila 1 mg/ml. Mikrotitrační destička byla následně ponechána k inkubaci na 30 minut při teplotě 37 °C. Po uplynutí uvedené doby bylo do každé jamky přidáno 50 μ l 2,4-dinitrofenylhydrazinu (20 mg/100 ml v 1 M kyselině chlorovodíkové). Opět byla destička ponechána k inkubaci, nyní však na 20 minut při pokojové teplotě ve tmě. Po uplynutí 20 minut bylo do každé jamky přidáno 50 μ l 4 M NaOH. Destička byla takto ponechána na 5 minut ve tmě (laboratorní teplota) a po uplynutí tohoto času byla pomocí ELISA readeru změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. A tak jako i u MTT testu, nebylo opomenuto proměření kontroly. Otestována byla rovněž kontrola pozitivní, tzn. buňky byly kultivovány za přítomnosti 30% ethanolu.

Stanovení aktivity enzymu laktátdehydrogenázy bylo provedeno dosazením stanovených absorbancí do kalibrační rovnice, která byla získána proměření standardních roztoků pyruvát/NADH (viz. Tabulka 8). Do jamek destičky na místo 10 μ l buněčného supernatantu a 50 μ l roztoku pyruvát/NADH bylo pipetováno přímo 60 μ l standardu pyruvát/NADH.

Tabulka 8 Koncentrační řada standardů pyruvát/NADH

roztok č.	pyruvát/NADH [μ l]	destilovaná voda [μ l]
1	500	50
2	400	450
3	300	250
4	200	350
5	100	450
6	50	500

4.12.5 Scratch test neboli test „hojení ran“

Schopnost nanovlákných krytů s liposomovými částicemi ovlivnit migraci keratinocytů byla stanovena na keratinocytech získaných stejným způsobem jako u MTT testu (viz. 4.12.3). Po 24hodinové inkubaci buněk ve 24 jamkové mikrotitrační destičce byla i zde provedena výměna média, staré médium bylo z každé jamky odpipetováno a k buňkám bylo přidáno po 500 μ l čerstvého média. Dále ve splývající buněčné monovrstvy v každé jamce destičky byl vytvořen tenký vryp představující „ránu“. Rýha na keratinocytech byla vytvořena pomocí špičky pipety. Následně byl získán snímek každé buněčné vrstvy s vytvořenou ránou. Do jamek přímo na vytvořenou ránu byl vložen zvážený čtverek nanovlákného krytu s obsahem částic, do jamek určených jako kontrola vzorek přidán nebyl. Destičky byly umístěny inkubátoru (37 °C), kde byly ponechány po dobu 48 hodin, přičemž po 24 hodinách bylo mikroskopicky zkontrolováno zacelování vytvořených ran. Výsledkem provedeného testu bylo porovnání snímků a velikosti průměrů vytvořených ran v čase 0, 24 a 48 hodin, vše bylo samozřejmě srovnáno s kontrolou.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

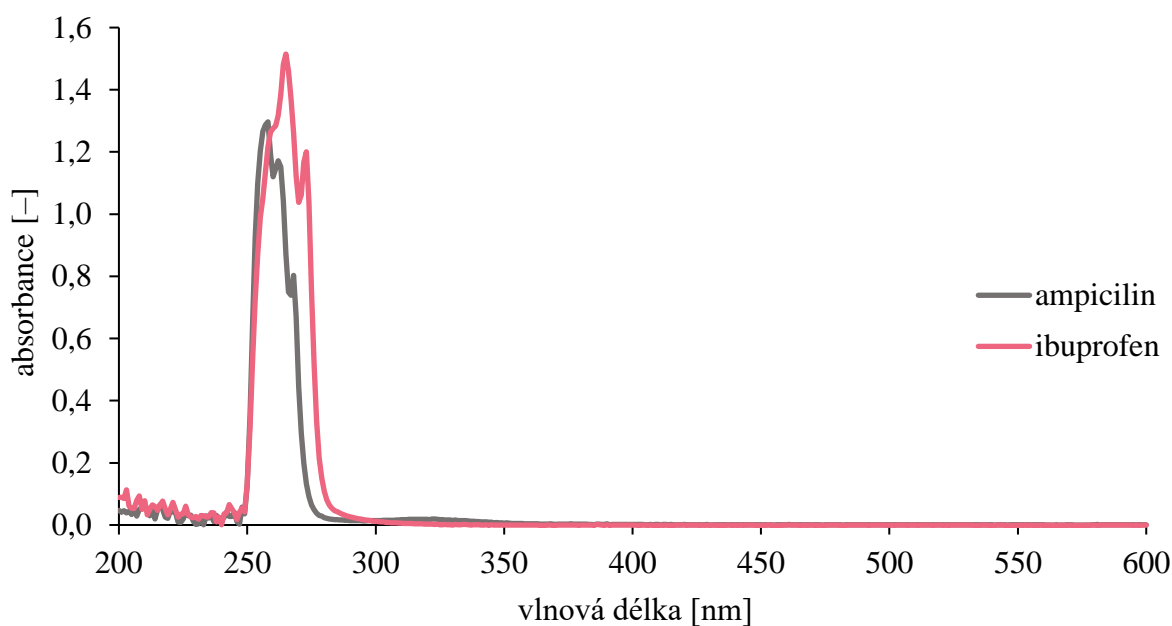
5.1 Charakterizace připravených liposomových částic

5.1.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Účinnost enkapsulace aktivních látek (ampicilinu i ibuprofenu) do liposomových částic byla stanovena dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1. Stanovení bylo provedeno nejprve spektrofotometricky, pro ověření získaných výsledků ze spektrofotometrického stanovení bylo provedeno stanovení enkapsulační účinnosti i metodou HPLC.

5.1.1.1 Stanovení enkapsulační účinnosti metodou spektrofotometrie

Spektrofotometrické stanovení enkapsulační účinnosti bylo provedeno dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1.1, stanovení pro každý typ vzorku bylo provedeno celkem třikrát. Na začátku byla však proměřena absorpční spektra aktivních látek enkapsulovaných do liposomových částic nebo později inkorporovaných do nanovláknenných krytů. Ze získaných spekter, která jsou uvedena na obrázku 9, byla následně odečtena absorpční maxima těchto látek.



Obrázek 9 Absorpční spektra ampicilinu a ibuprofenu

Z absorpčních spekter byla odečtena tato maxima: 260 nm pro ampicilin a 264 nm pro ibuprofen. Při těchto vlnových délkách byla pak proměřena sada kalibračních roztoků a vzorky samotné. Proměřením kalibračních roztoků obou léčiv byly získány kalibrační přímky a také kalibrační rovnice (viz. Tabulka 9), nutné pro výpočet. Získané kalibrační rovnice byly kromě stanovení enkapsulační účinnosti potřebné také u stanovení postupného uvolňování ampicilinu a ibuprofenu z částic a vláken.

Tabulka 9 Kalibrační rovnice léčiv (spektrofotometrie)

aktivní látka	kalibrační rovnice
ampicilin	$y = 0,7554x; R^2 = 0,9999$
ibuprofen	$y = 1,4014x; R^2 = 0,9998$

Účinnost enkapsulace aktivních látek ampicilinu a ibuprofenu byla stanovena u liposomových částic a kombinovaných liposomových částic s PHB. Získané hodnoty ze spektrofotometrického stanovení jsou vyjádřena v procentech a uvedena v tabulce 10.

Tabulka 10 Enkapsulační účinnost (spektrofotometrické stanovení)

typy liposomů	enkapsulační účinnost [%]	
	ampicilin	ibuprofen
liposomy bez PHB	$57,03 \pm 0,55$	$69,77 \pm 0,61$
liposomy s PHB	$62,86 \pm 2,78$	$75,93 \pm 0,88$

Z hodnot uvedených v tabulce 10 vidíme, že větší množství léčiva bylo enkapsulováno do částic s inkorporovaným PHB, v porovnání s částicemi bez obsahu tohoto polymeru. Co se týče samotných léčiv, ibuprofen se enkapsuloval velmi dobře do obou typů částic. Bylo dosaženo až 75,93 % účinnosti enkapsulace, a to v případě částic s PHB. U částic bez přídavku PHB bylo dosaženo rovněž vyšší enkapsulační účinnosti (69,77 %). Schopnost enkapsulace ampicilinu byla o něco nižší, v porovnání s ibuprofenem. Ale i v tomto případě byla enkapsulační účinnost nad 50 %. Ampicilinu bylo do částic bez PHB enkapsulováno 57,03 % a do částic s PHB až 62,86 %.

5.1.1.2 Stanovení enkapsulační účinnosti metodou HPLC

Metoda HPLC byla zvolena z důvodu ověření získaných hodnot spektrofotometricky. Spektrofotometrické stanovení ampicilinu a ibuprofenu již u předešlých diplomových prací (např. [78]) nebylo příliš přesné, a proto se volila stanovení i citlivější metodou jako je právě HPLC. Kalibrační rovnice použité pro výpočet množství daných aktivních látek jsou uvedeny v tabulce 11.

Stanovení účinnosti enkapsulace terapeutik ampicilinu a ibuprofenu pomocí HPLC bylo provedeno dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1.2. I zde je enkapsulační účinnost vyjádřena procentuálně (viz. Tabulka 12).

Tabulka 11 Kalibrační rovnice léčiv (HPLC)

aktivní látka	kalibrační rovnice
ampicilin	$y = 8\,408x; R^2 = 0,9830$
ibuprofen	$y = 116,29x; R^2 = 0,9992$

V níže uvedené tabulce 12 můžeme vidět, že se podařilo enkapsulovat větší množství z obou léčiv, a to jak do liposomových částic, tak i do kombinovaných liposomových částic s PHB. Avšak ve srovnání s hodnotami získanými spektrofotometrickou metodou, hodnoty enkapsulační účinnosti získané pomocí HPLC jsou znatelně vyšší, zvláště u množství

enkapsulovaného analgetika, kde výsledky z HPLC ukazují, že bylo do částic zapouzdřeno více než 90 % léčiva (do obou typů částic). V případě antibiotika ampicilinu byla potvrzena enkapsulační účinnost kolem 60 %, tak jako tomu bylo i výsledků ze spektrofotometrie, účinnost enkapsulace se lišila pouze o jednotky procent (vyšší u HPLC).

Tabulka 12 Enkapsulační účinnost (stanovení metodou HPLC)

typy liposomů	enkapsulační účinnost [%]	
	Ampicilin	ibuprofen
liposomy bez PHB	64,76 ± 0,13	96,96 ± 0,48
liposomy s PHB	66,09 ± 0,40	97,43 ± 1,95

5.1.2 Stanovení velikosti

Pro posouzení fyzikální stability systému byla stanovena velikost a index polydisperzity (PdI) připravených liposomových částic suspendovaných ve vodném prostředí. Částice byly připraveny dle postupu uvedeném v kapitole 4.5 a samotný postup stanovení těchto parametrů, u kterého bylo využito techniky dynamického rozptylu světla, je pak popsán v kapitole 4.6.2.

Získané hodnoty velikosti a index heterogenity všech typů připravených částic jsou zaznamenány jako průměrné hodnoty ze tří provedených měření každého vzorku a uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13 Průměrná velikost a index polydisperzity liposomových částic

typy liposomů	velikost [nm]	index polydisperzity [-]
prázdné liposomy	227,80 ± 3,44	0,22 ± 0,02
prázdné liposomy s PHB	247,53 ± 2,31	0,19 ± 0,02
liposomy s ampicilinem	315,43 ± 9,55	0,27 ± 0,01
liposomy s ampicilinem a PHB	392,10 ± 6,22	0,21 ± 0,00
liposomy s ibuprofenem	351,93 ± 3,53	0,30 ± 0,04
liposomy s ibuprofenem a PHB	373,43 ± 4,05	0,32 ± 0,02

Z výše uvedené tabulky je patrné, že průměrná velikost částic se pohybovala v rozmezí přibližně od 200 do 400 nm. Jako nejmenší byly vyhodnoceny prázdné částice, které dosahovaly velikosti 227,80 nm. O něco větší velikost byla zaznamenána také u prázdných částic, avšak připravených s přídavkem polymeru PHB. Jejich velikost dosahovala 247,53 nm. Celkově pak enkapsulací aktivních látek do liposomů docházelo ke zvyšování jejich průměrné velikosti. Všechny typy připravených liposomových částic s enkapsulovanými terapeutiky dosahovaly velikosti nad 300 nm. Z tabulky je také jasně zřejmé, že částice obsahující PHB ve své fosfolipidové dvojrůstvě jsou znatelně větší, ve srovnání s částicemi bez tohoto polymeru. Příkladem jsou liposomy o obsahu ampicilinu, kdy částice s přídavkem PHB byly připraveny o velikosti až 392,10 nm, naopak částice bez inkorporovaného PHB dosahovaly velikosti 315,43 nm, tedy o 76,67 nm méně.

V tabulce jsou rovněž uvedeny získané hodnoty indexu polydisperzity, tedy údaje o distribuci velikosti liposomových částic v suspenzi. U všech typů připravených částic se hodnoty PdI

pohybovaly v rozmezí od 0,19 do 0,32. Nebyla překročena ani hodnota PDI 0,40 a částice tak lze považovat za uniformní.

5.1.3 Stanovení elektrokinetické stability

Pomocí techniky dynamického rozptylu světla byl také stanoven zeta potenciál jakožto parametr určující stabilitu liposomové suspenze. Elektrokinetická stabilita připravených částic byla sledována při jejich kontaktu s destilovanou vodou i fyziologickým roztokem. Stanovení zeta potenciálu bylo provedeno ihned po přípravě liposomů, dále týden a 6 týdnů ode dne jejich přípravy. Veškerý postup stanovení je uveden v kapitole 4.6.3. Výsledné hodnoty zeta potenciálů jsou uvedeny v tabulce 14 jako průměrné hodnoty, i v tomto případě byl totiž každý vzorek proměřen celkem třikrát. Posouzení, zda je daný systém stabilní bylo na základě získané hodnoty zeta potenciálu, resp. zda hodnota spadá do intervalu -30 až 30 mV či nikoliv. Hodnoty nacházející se mimo tento interval značí stabilitu připraveného systému.

Tabulka 14 Hodnoty zeta potenciálu liposomů suspendovaných ve vodném prostředí

typy liposomů	zeta potenciál [mV]		
	po přípravě	po týdnu	po 6 týdnech
prázdné liposomy	$-40,27 \pm 0,71$	$-42,87 \pm 1,16$	$-21,15 \pm 1,91$
prázdné liposomy s PHB	$-43,43 \pm 3,76$	$-41,33 \pm 0,57$	$-25,27 \pm 8,07$
liposomy s ampicilinem	$-42,73 \pm 1,19$	$-44,30 \pm 4,97$	$-38,97 \pm 3,01$
liposomy s ampicilinem a PHB	$-50,87 \pm 1,86$	$-53,83 \pm 2,08$	$-63,93 \pm 1,59$
liposomy s ibuprofenem	$-38,67 \pm 0,23$	$-42,33 \pm 0,71$	$-33,90 \pm 2,09$
liposomy s ibuprofenem a PHB	$-40,73 \pm 2,11$	$-42,80 \pm 2,16$	$-36,97 \pm 2,06$

Na základě výše uvedeného předpokladu, že stabilní systém je charakterizován hodnotou zeta potenciálu do -30 mV a nad 30 mV, můžeme říci, že připravené částice vykazují značnou stabilitu. V tabulce také můžeme vidět, že částice i po týdnu skladování jsou stále zcela stabilní. U částic skladovaných 6 týdnů můžeme z hlediska stability pozorovat změnu, hodnoty zeta potenciálu u některých typů částic vzrostly, zejména u částic bez enkapsulovaných léčivých složek (prázdné liposomy, prázdné liposomy s PHB). Tyto typy částic měly již hodnoty v rozmezí nestability. Částice s obsahem aktivních látek i po této době měly hodnoty do -30 mV. Stále je můžeme tedy považovat za stabilní.

Co se týče srovnání liposomů s inkorporovaným PHB a liposomů připravených bez obsahu tohoto polymeru, částice s PHB vykazovaly vyšší stabilitu. Největší rozdíl zeta potenciálu můžeme pozorovat u částic s enkapsulovaným ampicilinem, kde rozdíl mezi částicemi s PHB a bez PHB je okolo 10 mV.

Tabulka 15 Hodnoty zeta potenciálu liposomů suspendovaných ve fyziologickém roztoku

typy liposomů	zeta potenciál [mV]		
	po přípravě	po týdnu	po 6 týdnech
prázdné liposomy	$-65,77 \pm 3,37$	$-77,97 \pm 2,51$	$-65,77 \pm 3,37$
prázdné liposomy s PHB	$-78,23 \pm 2,06$	$-83,40 \pm 2,84$	$-73,50 \pm 3,35$
liposomy s ampicilinem	$-69,67 \pm 3,82$	$-70,90 \pm 3,55$	$-52,30 \pm 4,81$
liposomy s ampicilinem a PHB	$-78,17 \pm 2,32$	$-78,57 \pm 4,01$	$-67,07 \pm 0,49$
liposomy s ibuprofenem	$-68,57 \pm 1,35$	$-75,20 \pm 2,59$	$-65,50 \pm 2,07$
liposomy s ibuprofenem a PHB	$-74,73 \pm 1,33$	$-73,53 \pm 4,28$	$-70,43 \pm 2,43$

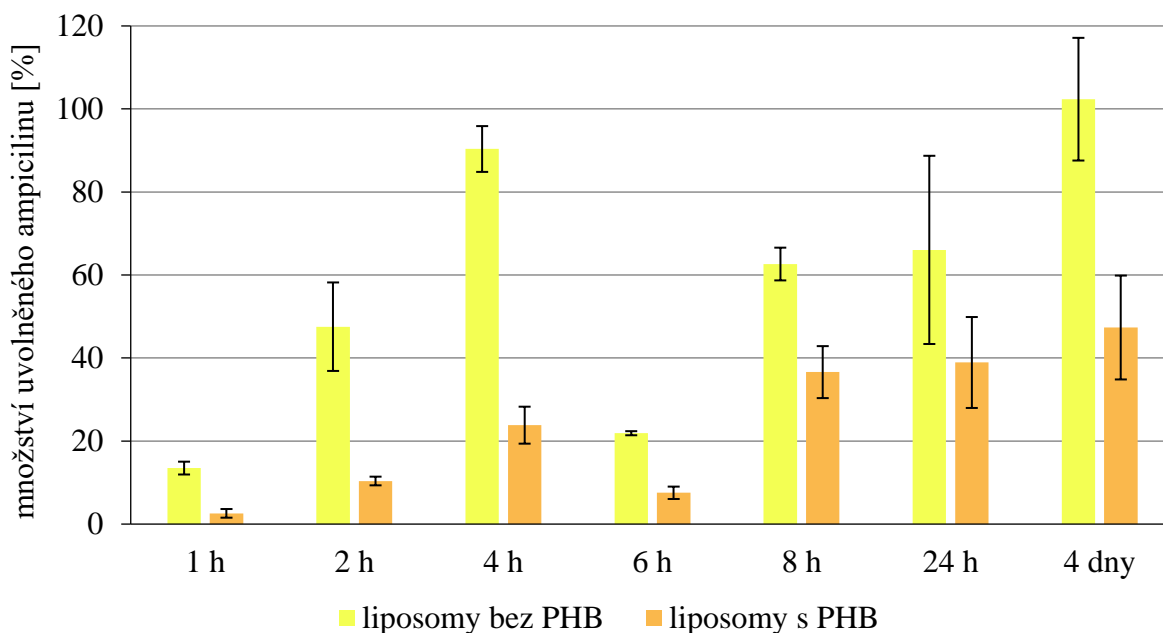
V tabulce jsou zaznamenány hodnoty zeta potenciálu liposomů, které byly suspendovány do fyziologického roztoku. V porovnání s tabulkou můžeme konstatovat, že hodnoty parametru elektrokinetické stability jsou nižší, a tudíž částice jsou více stabilní. Totéž platí i pro částice skladované až 6 týdnů v tomto prostředí, jejich hodnoty zeta potenciálu značí stále mimořádnou stabilitu.

5.1.4 Kontrola uvolňování aktivních látek z částic

Kontrola uvolňování léčiv ampicilinu a ibuprofenu enkapsulovaných do všech typů připravených částic byla provedena spektrofotometricky a pro ověření pomocí HPLC.

5.1.4.1 Uvolňování aktivních látek z částic (spektrofotometrické stanovení)

Postup, jakým byla sledována množství uvolněných látek z částic po určitý čas, je uveden v kapitole 4.6.4. Konkrétně byla provedena kontrola uvolňování u ampicilinu a ibuprofenu enkapsulovaného do liposomových částic a do kombinovaných liposomových částic s PHB. Množství uvolněného léčiva bylo sledováno v časovém intervalu 1 hodina až 4 dny a vypočtena pomocí kalibrační rovnice uvedené v kapitole 5.1.1.1. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako průměrné, neboť každý vzorek byl stanoven celkem třikrát. Veškeré získané hodnoty jsou uvedeny v procentech jakožto množství uvolněného léčiva z celkového množství léčiva, které se podařilo do částic enkapsulovat. Hodnoty jsou tedy vztaženy na výsledné hodnoty enkapsulační účinnosti uvedené v kapitole 5.1.1.1.

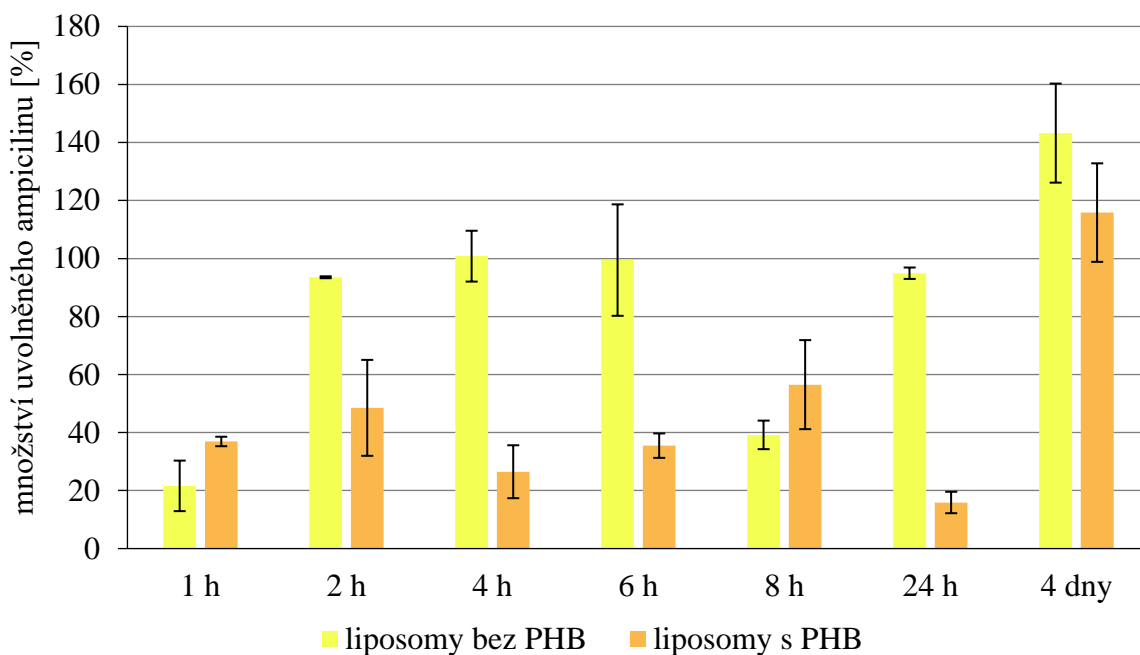


Obrázek 10 Grafické znázornění množství uvolněného ampicilinu z částic do prostředí tvořeného destilovanou vodou (spektrofotometrie)

Uvolňování ampicilinu i ibuprofenu bylo sledováno do dvou prostředí o různých teplotách, do destilované vody (laboratorní teplota) a do fyziologického roztoku (37 °C). Výše můžeme vidět grafické znázornění (Obrázek 10) postupného uvolňování antibiotika do prostředí tvořeného destilovanou vodou. Množství tohoto léčiva uvolňujícího se z liposomových částic bez PHB i z částic s přidaným polymerem PHB v prvních hodinách uvolňování roste, u částic bez PHB bylo již po 4 hodinách dosaženo uvolnění veškerého enkapsulovaného množství antibiotika. Stejného trendu dosáhl i ampicilin uvolňující se z liposomových částic s PHB, avšak uvolněné množství bylo daleko nižší, po 4 hodinách bylo uvolněno nad 20 % enkapsulovaného ampicilinu.

U 6 hodin můžeme pozorovat vychýlení této rostoucí křivky, a to jak u uvolňování z částic bez PHB, tak i z částic s PHB. Dále ve vyšších časech, od 8 hodin a více, již pozorujeme opět rostoucí trend množství uvolněného léčiva.

Níže je pak uvedeno grafické znázornění uvolňování antibiotika do prostředí fyziologického roztoku (Obrázek 11), kde opět můžeme rostoucí hodnoty uvolněného množství ampicilinu a poklesy ve vyšších hodinách uvolňování, tak jako tomu bylo i u uvolňování této aktivní látky do prostředí destilované vody.

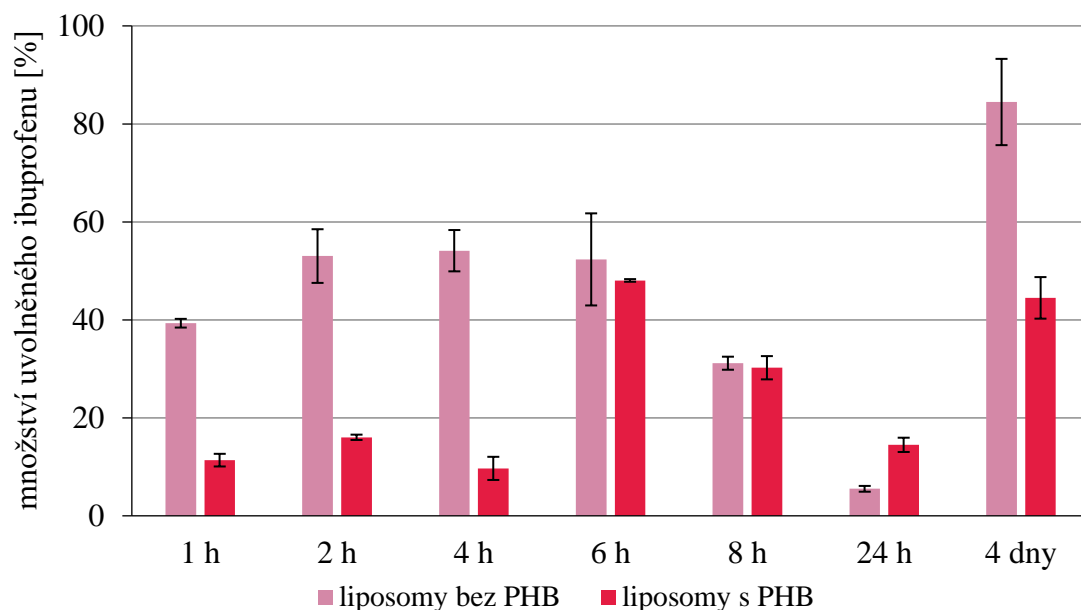


Obrázek 11 Grafické znázornění množství uvolněného ampicilinu z částic do prostředí tvořeného fyziologickým roztokem (spektrofotometrie)

Výše zmíněný pokles množství uvolněného ampicilinu byl však u prostředí tvořeného fyziologickým roztokem zaznamenán v pozdějších časech, ve srovnání s předchozím prostředím. Zde byl pokles pozorován až po 8 hodinách uvolňování, avšak pouze u uvolňování z částic bez obsahu polymeru PHB. Znatelně menší množství uvolněného ampicilinu z modifikovaných liposomových částic polymerem PHB bylo pak pozorováno až na druhý den uvolňování. Snížení množství uvolněného ampicilinu ve zmíněných časech může být přisouzeno možné difuzi této látky zpět do struktury nosiče, případně k zachycení léčiva ve struktuře částic. Celkově však můžeme konstatovat, že funkcionalizací liposomů polymerem PHB dojde ke snížení rychlosti uvolňování, enkapsulovaná látka se tedy uvolňuje po delší čas postupně a v menších množstvích. Rozdíl také sledujeme v prostředí, do kterého se látka uvolňuje. Jak můžeme vidět, rychlost uvolňování u fyziologického roztoku se změnila, v porovnání s destilovanou vodou.

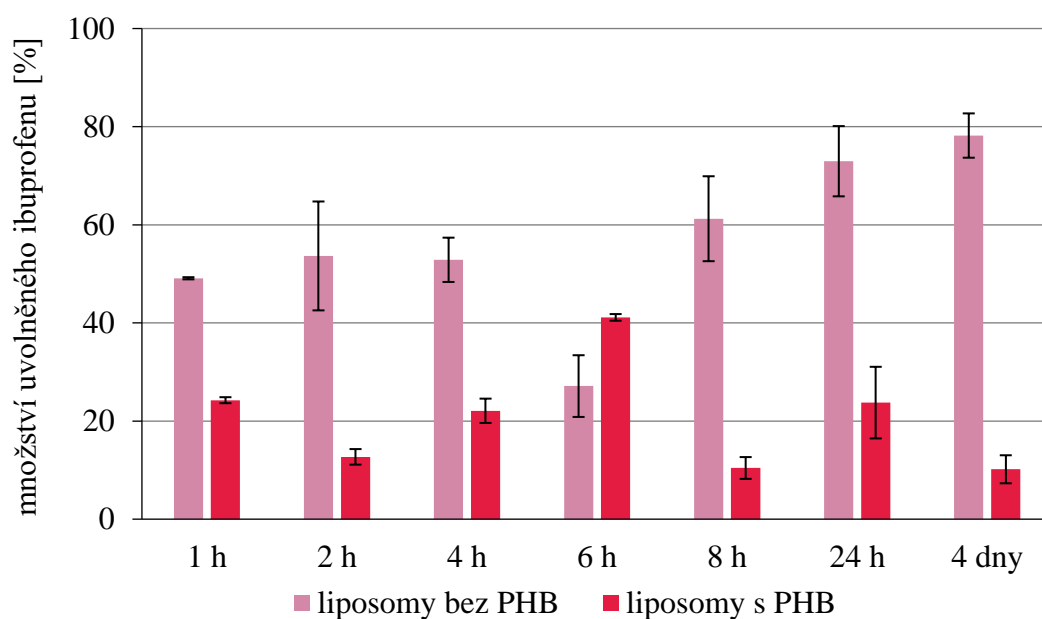
Stanovením postupného uvolňování antibiotika z částic metodou spektrofotometrie však není považováno za příliš přesné. U uvolňování do obou prostředí bylo u řady časů stanoveno nad 100 % množství uvolněné látky, z tohoto důvodu bylo zařazeno stanovení i citlivější metodou, kterou je kapalinová chromatografie (viz. kapitola 5.1.4.2).

A co se týče enkapsulovaného analgetika do částic, kontrola postupného uvolňování, opět do prostředí destilované vody a fyziologického roztoku, je graficky znázorněna na obrázcích 12 a 13.



Obrázek 12 Grafické znázornění množství uvolněného ibuprofenu z částic do prostředí tvořeného destilovanou vodou (spektrofotometrie)

Postupné uvolňování ibuprofenu z připravených částic do prostředí destilované vody je znázorněno na obrázku 12, kde můžeme pozorovat opět rostoucí závislost množství uvolněného léčiva v čase, opět s poklesy v určitých hodinách. V prvních hodinách uvolňování bylo zaznamenáno nad 50 % procent množství enkapsulovaného léčiva, v případě uvolňování z částic bez PHB. U částic s přidavkem polymeru dochází opět ke zpomalení procesu uvolňování, léčivo se uvolňuje v menších koncentracích, jak se dalo očekávat.



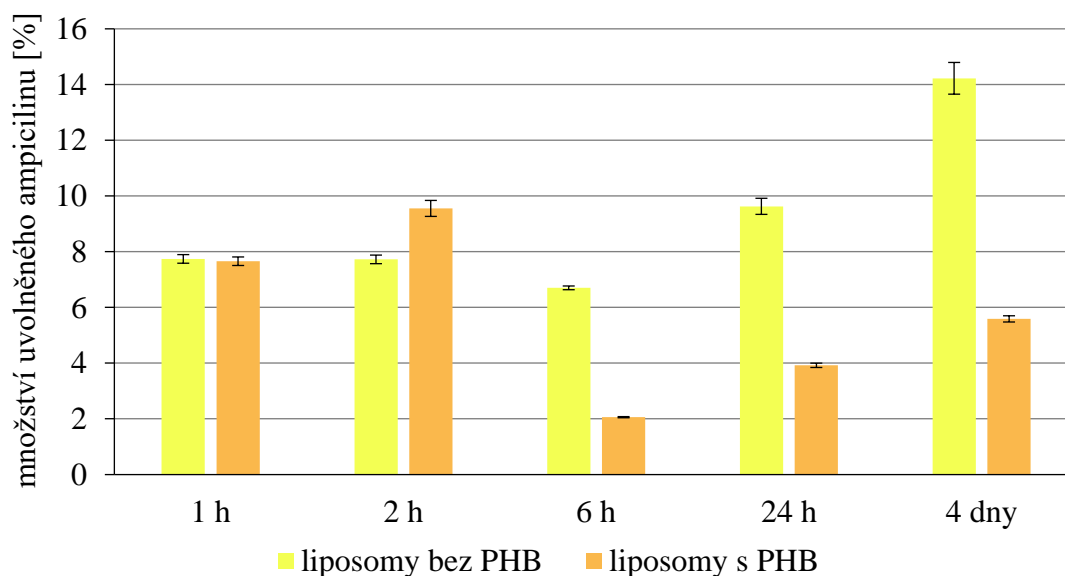
Obrázek 13 Grafické znázornění množství uvolněného ibuprofenu z částic do prostředí tvořeného fyziologickým roztokem (spektrofotometrie)

Na obrázku 13 vidíme uvolňování ibuprofenu z částic do fyziologického roztoku. I zde pozorujeme rostoucí závislost uvolněného množství analgetika na čase, kdy nejvíce látky bylo detekováno až po delším čase uvolňování (po 8 hodinách a více), v případě částic bez PHB. U tohoto typu částic bylo v prvních časech zaznamenáno kolem 50 % ibuprofenu, v 6 hodinách došlo jako i v předchozích stanoveních ke snížení koncentrace léčiva uvolněného do tohoto prostředí. Naopak z částic se zabudovaným PHB ve své struktuře bylo v tomto čase detekováno nejvyšší množství (nad 40 % enkapsulovaného množství ibuprofenu). A nelze si nepovšimnout mírnějších poklesů uvolněného množství této látky z částic s PHB, tato zakolísání opět můžeme přisoudit difuzi aktivní látky přes fosfolipidovou membránu do vnitřní struktury částic a naopak.

5.1.4.2 Uvolňování aktivních látek z částic (stanovení metodou HPLC)

Protože spektrofotometrie není dostatečně citlivá a příliš přesná metoda pro stanovení používaných aktivních látek v této práci, což bylo vícekrát potvrzeno i u starších diplomových prací, bylo provedeno přeměření metodou HPLC. Postup stanovení a úpravy vzorků pro detekci na kapalinovém chromatografu je uveden v kapitole 4.6.4. Kalibrační rovnice použita pro výpočet uvolněného množství léčiva je uvedena v kapitole 5.1.1.2. Každý vzorek byl opět zaznamenán celkem třikrát a vyjádřen jako průměrná hodnota v procentech. Opět bylo za 100 % považováno množství, které se podařilo zapouzdřit do daných částic (viz. kapitola 5.1.1.2).

Veškeré získané výsledky jsou znázorněny graficky a uvedeny níže.



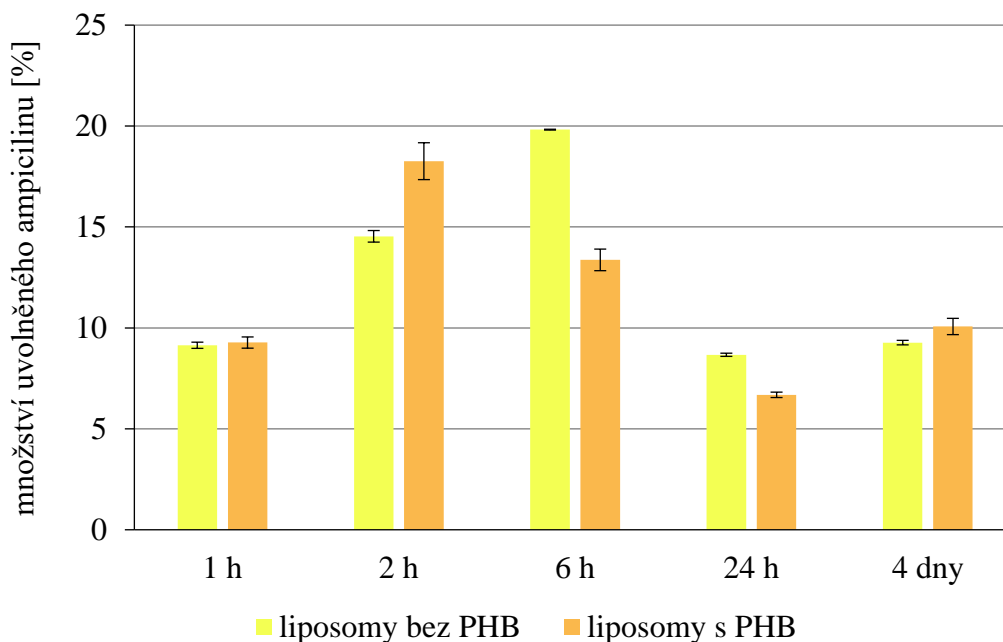
Obrázek 14 Grafické znázornění množství uvolněného ampicilinu z částic do prostředí tvořeného destilovanou vodou (HPLC)

Na obrázku 14 je uvedeno porovnání uvolňování ampicilinu z částic bez PHB s uvolňováním této látky z částic s přídatkem PHB. V grafickém zobrazení můžeme vidět, že tak jako u spektrofotometrického stanovení, u uvolňování z obou typů částic došlo k postupnému

zvyšování množství uvolněné látky v průběhu času, avšak po 6 hodinách došlo k mírnému vychýlení této rostoucí křivky, kdy bylo detekováno nejnižší množství uvolněného ampicilinu. Rozdíly v množství uvolněné látky z částic bez PHB a částic s PHB nejsou nějak znatelné jako u spektrofotometrického stanovení, v prvních časech uvolňování jsou dokonce téměř shodné.

Protože získané hodnoty enkapsulační účinnosti pomocí spektrofotometrie a metodou HPLC se nijak výrazně nelišily (pouze o jednotky procent), a získané výsledky z uvolňování byly vztaženy na hodnotu enkapsulační účinnosti stanovenou stejnou metodou jakou je sledováno uvolňování ampicilinu, je možné nyní získaná data porovnat. Co se tedy týče celkového srovnání výsledků ze spektrofotometrického stanovení a ze stanovení metodou HPLC, získaná data z HPLC jsou značně nižší. Příkladem je uvolnění množství ampicilinu z liposomových částic bez PHB (do destilované vody), kdy při spektrofotometrickém stanovení bylo zaznamenáno až 66,05 % ampicilinu (tj. 0,38 mg/ml) vzhledem k celkovému enkapsulovanému množství a metodou HPLC 9,63 % (tj. 0,06 mg/ml).

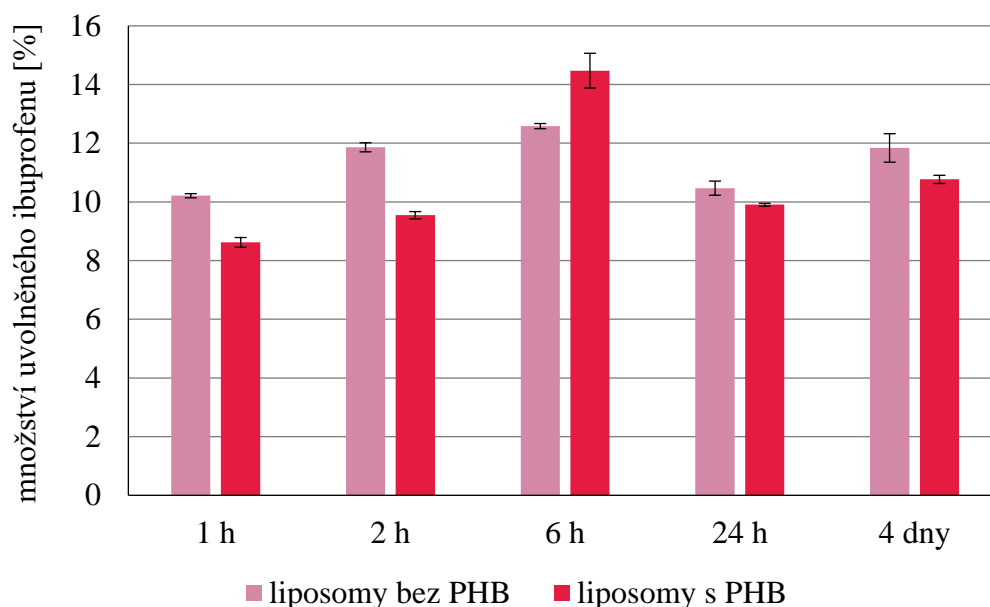
Grafické znázornění uvolňování antibiotika z částic do prostředí tvořeného fyziologickým roztokem je uvedeno níže (viz. Obrázek 15). I zde můžeme vidět markantně nižší hodnoty ze stanovení metodou HPLC než u spektrofotometrické metody, zvláště u uvolňování z liposomových částic bez PHB. Získané hodnoty touto citlivější metodou ukazují, že nejvyšší dosažené množství uvolněného ampicilinu činí 20 % z enkapsulovaného množství. Uvolněné množství ampicilinu do tohoto prostředí se pohybovalo po celou dobu zvoleného časového intervalu v rozmezí pouze od 7 do 20 %, což platí pro uvolňování z obou typů připravených částic.



Obrázek 15 Grafické znázornění množství uvolněného ampicilinu z částic do prostředí tvořeného fyziologickým roztokem (HPLC)

Na obrázku 15 pozorujeme v prvních časech uvolňování rostoucí trend, druhý den sledování bylo však detekováno nižší množství aktivní látky, došlo tedy opět k poklesu. Naopak, na 4. den uvolňování byla zaznamenána vyšší koncentrace uvolněného ampicilinu, a to u uvolňování z obou typů připravených částic.

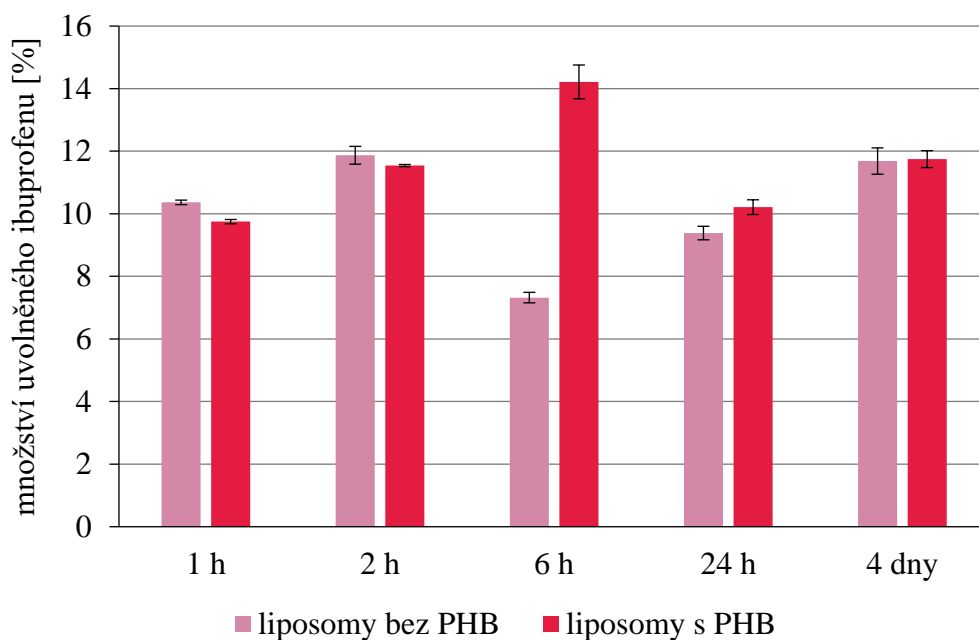
Grafická znázornění uvedená níže (viz. Obrázek 16 a Obrázek 17) již ukazují závislost množství uvolněného analgetika ibuprofenu v závislosti na čase.



Obrázek 16 Grafické znázornění množství uvolněného ibuprofenu z částic do prostředí tvořeného destilovanou vodou (HPLC)

Na obrázku 16 vidíme mírně rostoucí množství uvolněného ibuprofenu v prvních časech uvolňování. Největší množství analgetika bylo detekováno v čase 6 hodin, což platí pro uvolňování z obou typů připravených částic (12,58 % u částic bez PHB a 14,47 % u částic s PHB). Na druhý den bylo detekováno o něco menší množství této aktivní látky, dále již byl zaznamenán rostoucí trend.

Graf uvedený na obrázku 17 představující uvolňování ibuprofenu z částic do fyziologického roztoku ukazuje podobný trend jaký byl stanoven i pomocí spektrofotometrie. Byl tedy zaznamenán mírný pokles u uvolňování analgetika z částic bez PHB v 6 hodinách sledování, zaznamenaný pokles nebyl však příliš vysoký, jedná se o rozdíl přibližně 4 % od předchozího zaznamenaní (čas 2 hodiny). Co se týče částic s polymerem PHB, v tomto případě došlo k poklesu koncentrace až na druhý den. Celkově zaznamenaná množství se u částic bez PHB pohybovala v rozmezí od 7 do 12 % vzhledem k enkapsulovanému množství. A u částic s PHB bylo detekováno množství této aktivní látky od 10 do 14 %.



Obrázek 17 Grafické znázornění množství uvolněného ibuprofenu z částic do prostředí tvořeného fyziologickým roztokem (HPLC)

5.2 Příprava a optimalizace přípravy nanovláknenných krytů

5.2.1 Alginátové kryty

Roztok alginátu sodného (SA) sám o sobě je elektrostaticky nezvláknitelný, je třeba přidat podpůrného polymeru, kterým byl v této práci PEO. Veškeré pracovní roztoky SA/PEO byly připraveny dle postupu uvedeném v kapitole 4.7.1.1 a samotný proces elektrostatického zvláknování byl proveden dle postupu zapsaném v kapitole 4.7.1.2. Prvním provedeným experimentem bylo zvláknování roztoku o poměru alginátu sodného a PEO 1 : 1 (obsah SA/PEO 4 hm. %), rozpouštědlem byla 25% kyselina octová. Zvláknování bylo provedeno s průtokem 0,2 ml/h, vzdáleností 10 cm, napětím 15 kV a jehlou o délce 2 cm a průměru 1,2 mm, po aplikaci napětí došlo však pouze k ukapávání kapičky roztoku z kapilární jehly a ani po zvýšení napětí nebylo možné vytvořit Taylorův kužel a paprsek vláken. Nezdařené zvláknění tohoto roztoku bylo přisouzeno roztoku samotnému, konkrétně nižší koncentraci rozpouštědla, a tak i nižší vodivosti roztoku. Proto byl připraven tentýž roztok, avšak rozpouštědlem byla 50% kyselina octová. Ale ani tento pracovní roztok nebyl vhodným, při použití stejných parametrů jako u předchozího roztoku docházelo pouze k dopadání kapek roztoku na kolektor. Opět tedy nedošlo k tvorbě vlákna, a to ani při změně parametrů. Dalším experimentem bylo proto zvláknování roztoku znovu o poměru alginátu sodného a PEO 1 : 1, celkový obsah směsi těchto polymerů byl však vyšší (5 hm. % SA/PEO). U zvláknování tohoto roztoku bylo vycházeno ze stejných parametrů, pracovní vzdálenosti 10 cm, průtok se pohyboval v rozmezí 0,2–0,4 ml/h, napětí bylo nastaveno na 15 kV a zvláknovací jehla byla totožná jako u předchozích experimentů. Po aplikaci napětí byla pozorována na hrotu

zvlákňovací jehly pulzující kapička, která po krátkých chvílích ukapávala. Tvorba vlákna tedy nebyla pozorována a na kolektoru nebyl po delší době spatřen žádný produkt.

V další fázi procesu optimalizace přípravy alginátových nanovláken bylo pracováno s roztoky tvořenými vždy směsí polymerů alginátu sodného a PEO a destilovanou vodou. Pro podporu elektrostatického zvlákňování byly roztoky doplněny látkou Triton X-100. Následující experiment byl proveden s roztokem o obsahu 4 hm. % SA/PEO (poměr polymerů 7 : 3). S pracovní vzdáleností 12 cm, průtokem 0,4 ml/h, nastaveným napětím na 10,5 kV a zvlákňovací jehlou o délce 4 cm a průměru 1,2 mm bylo dosaženo tvorby stabilní kapky a produktu na kolektoru. Získaný produkt byl tvořen velmi slabou vrstvou a bylo na něm pozorováno značné množství malých dírek. Tvorba Taylorova kužele a ani vlákna nebyla pozorována. Dá se tedy předpokládat, že docházelo pouze k rozprašování polymeru a tvorbě filmu. Experiment byl ukončen po 7 hodinách, bohužel se však nepodařilo produkt sundat z kolektoru, vytvořená vrstva byla příliš slabá. Dalším pokusem bylo zvlákňování roztoku o stejném poměru SA/PEO jako v předchozím případě, avšak o vyšší celkové koncentraci směsi těchto polymerů (5 hm. %). Co se týče procesních parametrů, po optimalizaci byla pracovní vzdálenost nastavena na 15 cm, průtok na 0,4 až 0,5 ml/h, napětí na 14,5 kV a kapilární jehla byla zvolena délce 2 cm a průměru 1,2 cm. Po aplikaci napětí byla pozorována rovněž stabilní kapička, která však daleko častěji ukapávala ve srovnání s předešlými případy. Ale i zde bylo dosaženo spíše tvorby filmu nežli nanovláknenné vrstvy.

Optimalizace tvorby vláken byla dále provedena se dvěma roztoky o obsahu 5 hm. % SA/PEO, kdy poměr alginátu a PEO byl 1 : 1. Oba připravené roztoky obsahovaly povrchově aktivní látku Triton X-100, avšak druhý roztok kromě této látky byl připraven s přídavkem DMSO. Výchozími parametry pro zvlákňování těchto dvou roztoků byly: pracovní vzdálenost 10 cm, průtok 0,4 ml/h, napětí 15 kV a pracovní jehla o délce 2 cm a průměru 1,2 mm. Z roztoku s kombinovaným účinkem Tritonu X-100 a DMSO byl opět vytvořen produkt s četným množstvím drobných dírek (viz. Obrázek 18) a opět nebyla spatřena tvorba vlákna. Můžeme tedy říci, že docházelo i v tomto případě pouze k rozprašování polymeru. Co se týče procesu zvlákňování roztoku bez kosolventu DMSO, při použití stejných parametrů docházelo pouze k velmi četnému ukapávání kapiček ze zvlákňovací jehly a ani při změně parametrů nebylo dosaženo zlepšení. V důsledku toho byl vytvořen nový roztok, který se lišil pouze v celkové koncentraci směsi polymerů (tedy 4 hm. % SA/PEO). Zvlákňování bylo provedeno se stejnými parametry jako u experimentu s roztokem o obsahu Tritonu X-100 a DMSO, výsledkem byla opět tenčí vrstva rozprašeného polymeru s dírkami bez možného sundání z kolektoru. Produkty experimentů s tímto roztokem a roztokem o obsahu obou PAL byly na první pohled totožné, vizuálně lze však posoudit, že vytvořená vrstva z roztoku o obsahu 5 hm. % SA/PEO s přídavkem Tritonu X-100 (0,5 hm. %) a DMSO (5 hm. %) působila silněji.



Obrázek 18 Produkty z roztoku o obsahu 4 hm. % SA/PEO (poměr polymerů 1 : 1) s obsahem 0,5 hm. % Tritonu X-100 (vlevo) a z roztoku o obsahu 5 hm. % SA/PEO s přidavkem 0,5 hm. % Tritonu X-100 a 5 hm. % DMSO (vpravo)

Z uvedených důvodů, tj. především nemožného sejmutí vytvořené vrstvy z kolektoru, nebylo dále s tímto polymerem pracováno. Avšak možností jak vytvořenou vrstvu z SA/PEO (5 hm. %, s přidavkem Tritonu X-100 a DMSO) využít by byla tvorba krytu o více vrstvách, např. spodní vrstva by byla tvořena dobře snímatelnými nanovláknými z PHB a horní právě z alginátu sodného. Protože předmětem práce Bc. Lucie Procházkové [79] byla příprava vícevrstvých krytů, byly veškeré výsledky z procesu optimalizace tvorby alginátových krytů poskytnuty zde do zmíněné práce.

5.2.2 Kryty na bázi PHB

5.2.2.1 Elektrostatické zvlákňování

Optimalizace přípravy nanovláknenných krytů na bázi PHB metodou elektrostatického zvlákňování byla provedena dle postupu uvedeném v kapitole 4.7.2.2, z roztoků jejichž způsob přípravy je uveden v kapitole 4.7.2.1. Experimenty byly provedeny se třemi roztoky lišící se koncentrací PHB. Výchozí parametry (pracovní vzdálenost 15 cm, průtok 4–7 ml/h a napětí 15 kV) pro zvlákňování se jevily jako vhodné, neboť byla pozorována tvorba Taylorova kužele a paprsku vlákn. Průtok se samozřejmě u tvorby vláken z roztoku o nižší koncentraci PHB (1 hm. %) lišil, ve srovnání s přípravou vláken z roztoku o koncentraci vyšší. U roztoku o obsahu 1 hm. % PHB se tvořila vlákna jemnější, roztok byl méně viskózní, a tudíž bylo

zapotřebí nastavení nižšího průtoku na pumpě (1–2 ml/h). Zvlákňování tohoto roztoku bylo tedy časově méně efektivní.

Zvlákňování roztoku o obsahu 4 hm. % bylo rychlejší, průtok byl nastaven až na 7 ml/h, avšak docházelo k občasnému ukapávání roztoku polymeru ze zvlákňovací jehly. Další proces zvlákňování byl proveden s roztokem o obsahu 2 hm. % za průtoku 4 ml/h, kdy během zvlákňování byl pozorován stabilní paprsek bez ukapávání roztoku z jehly. Výsledný produkt byl celistvý, hladký a odebrání z kolektoru bylo provedeno bez problémů. Odebraný produkt vytvořený z roztoku o obsahu 4 hm. % PHB zanechal na kolektoru tenkou vrstvu, nebylo tedy možné odebrat celý produkt.



Obrázek 19 Zvlákňování roztoku o obsahu 2 hm. % PHB metodou elektrostatického zvlákňování: průběh zvlákňování (vlevo), snímání nanovlákněného produktu po zvlákňování 10 ml roztoku (vpravo)

Na základě pozorování procesu zvlákňování jednotlivých pracovních roztoků a vizuální porovnání výsledných nanovlákněných produktů byl roztok o obsahu 2 hm. % PHB zvolen jako optimální a použit pro přípravu krytů s terapií.

5.2.2.2 Odstředivé zvlákňování

Stejně tak jako u elektrostatického zvlákňování, popsaného v předchozí kapitole 5.2.2.1, bylo porovnáno zvlákňování roztoků lišící se koncentrací polymeru (opět roztoky o obsahu 1, 2 a 4 hm. % PHB). Při tvorbě vláken z roztoku o nejnižší koncentraci docházelo k trhání vláken a na tyčích kolektoru neulpěla téměř žádná vlákna. Vlákna vytvářená z roztoku o obsahu 2 hm. % PHB se po zvlákňování 10 ml roztoku začala trhat a samotné odebrání produktu z kolektoru bylo obtížné. Naopak zvlákňování roztoku o nejvyšší koncentraci PHB bylo bezproblémové a byl získán celistvý produkt. Tento roztok byl tedy vyhodnocen jako nejvhodnější a byl využit i k přípravě krytů s aktivními látkami.



Obrázek 20 Zvlákňování roztoku o obsahu 4 hm. % PHB metodou odstředivého zvlákňování: ulpělá vlákna tyčích kolektoru (vlevo), získaný produkt po zvlákňování 10 ml roztoku (vpravo)

5.2.3 Želatinové kryty

Roztoky pro přípravu želatinových krytů byly připraveny celkem dva (viz. kapitola 4.7.3.1), avšak s rozdílnou koncentrací želatiny (25 a 30 hm. %). Nanovláknna byla připravena metodou elektrostatického zvlákňování dle postupu popsaného v kapitole 4.7.3.2. Se zvolenými parametry (pracovní vzdálenost 10 cm, průtok 0,7 ml/h, napětí 15 kV, použitá jehla o průměru 1,2 mm a délce 2 cm) bylo dosaženo tvorby paprsku vlákna, a to u obou experimentů provedených se zmíněnými roztoky. Při pozorování tvorby vláken docházelo v případě zvlákňování roztoku o obsahu 30 hm. % želatiny k občasnému odkapávání roztoku z kapilární jehly, přičemž kapičky dopadaly směrem ke kolektoru. Z obou připravených roztoků byl vytvořen celistvý kryt, avšak při sundávání nanovláknenného produktu vytvořeného z roztoku o vyšší koncentraci zůstala jeho část na kolektoru, nebylo tedy získáno 100 % produktu. Kromě toho, na vytvořeném krytu z tohoto roztoku tvořeného větším množstvím želatiny byly spatřeny drobné dírký menší četnosti, dopadáním kapiček došlo zřejmě k mírnému proděravění. Naopak kryt vytvořený z roztoku o obsahu menšího množství želatiny byl hladký, bez známek děr a jeho snímání z kolektoru bylo snadné.

Z těchto uvedených důvodů byl k přípravě nanovláknenných krytů s aktivními látkami využit roztok o obsahu 25 hm. % želatiny.



Obrázek 21 Zvlákňování želatinového roztoku (25 hm. % želatiny) metodou elektrostatického zvlákňování: průběh zvlákňování (vlevo), získávání produktu po zvlákňení 2,5 ml roztoku (vpravo)

5.3 Charakterizace nanovláknenných krytů

5.3.1 Stanovení stability nanovláknenných krytů

Příprava vzorečku nanovláknenného krytu a samotný postup stanovení je popsán kapitole 4.8.1. Stabilita nanovláken byla stanovena u připravených vláken bez obsahu léčivých látek a pouze u vláken z polymeru PHB. Dle výsledků provedené optimalizace přípravy nanovláknenných krytů byly pro přípravu krytů s obsahem léčiv zvoleny polymery PHB a želatina. Protože želatina je ve vodě rozpustný materiál, nebylo třeba stanovat stabilitu krytu připraveného z tohoto polymeru. Předpokládal se tedy hmotnostní úbytek u želatinového krytu 100 %, již v rádech několika minut. Konkrétně byla stabilita testována u těchto PHB krytů: kryt o obsahu 4 hm.% PHB (připravený metodou odstředivého zvlákňování) a kryt o obsahu 2 hm. % PHB (připravený metodou elektrostatického zvlákňování). Stabilita byla stanovena jako úbytek hmotnosti v čase, přičemž získané hodnoty jsou uvedeny jakožto úbytek materiálu v % (vztaženo na navážku daného vzorku), a protože každý vzorek byl stanoven celkem třikrát, výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty. A i zde byla rychlost degradace nanovláken sledována ve dvou prostředích, destilované vodě (laboratorní teplota) a fyziologickém roztoku (37 °C).

Veškeré získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 16, kde můžeme vidět procentuální úbytek zmíněných typů vláken po ponoření do modelových prostředí v časovém intervalu od 1 hodiny až po 8 dnů. Z tabulky je zřejmé, že u nanovláken nacházejících se v daných prostředí několik hodin nedochází k nijak výraznému úbytku hmotnosti, vyznačují se tedy větší stabilitou. Znatelnější úbytek pozorujeme u vláken nacházejících se v prostředí fyziologického roztoku po dobu 4 dnů. U vláken připravených metodou forcespinning byl úbytek materiálu stanoven na 48,72 % a u elektrospinnových vláken na 32,00 %. K nejvýraznější degradaci vláken došlo však až po 8 dnech, zvláště u vláken ze 4% PHB nacházejících se ve fyziologickém roztoku (úbytek

78,79 %). U vláken obsahujících 2 hm. % PHB byl výraznější úbytek hmotnosti také až po 8 dnech, kdy u krytu v prostředí fyziologického roztoku došlo až k poklesu hmotnosti o 65,96 %. Celkově byl úbytek hmotnosti vláken vložených do prostředí fyziologického roztoku znatelnější, ve srovnání s vlákny vložených do destilované vody.

Lze také konstatovat, že v průběhu času dochází postupné degradaci připravených vláken na bázi PHB. Postupná degradace však může napomáhat postupnému uvolňování léčiv inkorporovaných do nanovláknenných krytů. Rychlost uvolňování léčiv z nanovláknenné struktury je totiž řízena rychlostí difuze z polymerní struktury a také rychlostí degradace nanovláknenného nosiče.

Tabulka 16 Stabilita samotných nanovláknenných krytů

čas	modelové prostředí	úbytek materiálu [%]	
		4% PHB (forcespinning)	2% PHB (elektrospinning)
1 hodina	destilovaná voda	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	fyziologický roztok	7,41 ± 0,33	13,33 ± 0,44
2 hodiny	destilovaná voda	8,70 ± 0,22	13,33 ± 0,65
	fyziologický roztok	8,87 ± 0,39	13,90 ± 0,23
4 hodiny	destilovaná voda	15,15 ± 0,53	16,67 ± 0,82
	fyziologický roztok	16,54 ± 1,07	16,81 ± 0,49
8 hodin	destilovaná voda	13,79 ± 0,48	20,83 ± 1,02
	fyziologický roztok	18,46 ± 0,83	21,05 ± 0,69
1 den	destilovaná voda	18,91 ± 0,49	18,29 ± 1,02
	fyziologický roztok	21,21 ± 0,74	21,54 ± 0,79
2 dny	destilovaná voda	17,24 ± 0,96	18,89 ± 0,68
	fyziologický roztok	26,15 ± 1,18	23,26 ± 0,78
4 dny	destilovaná voda	18,00 ± 0,53	21,21 ± 1,04
	fyziologický roztok	48,72 ± 1,19	32,00 ± 1,06
8 dnů	destilovaná voda	55,38 ± 0,69	60,53 ± 1,37
	fyziologický roztok	78,79 ± 0,97	65,96 ± 1,35

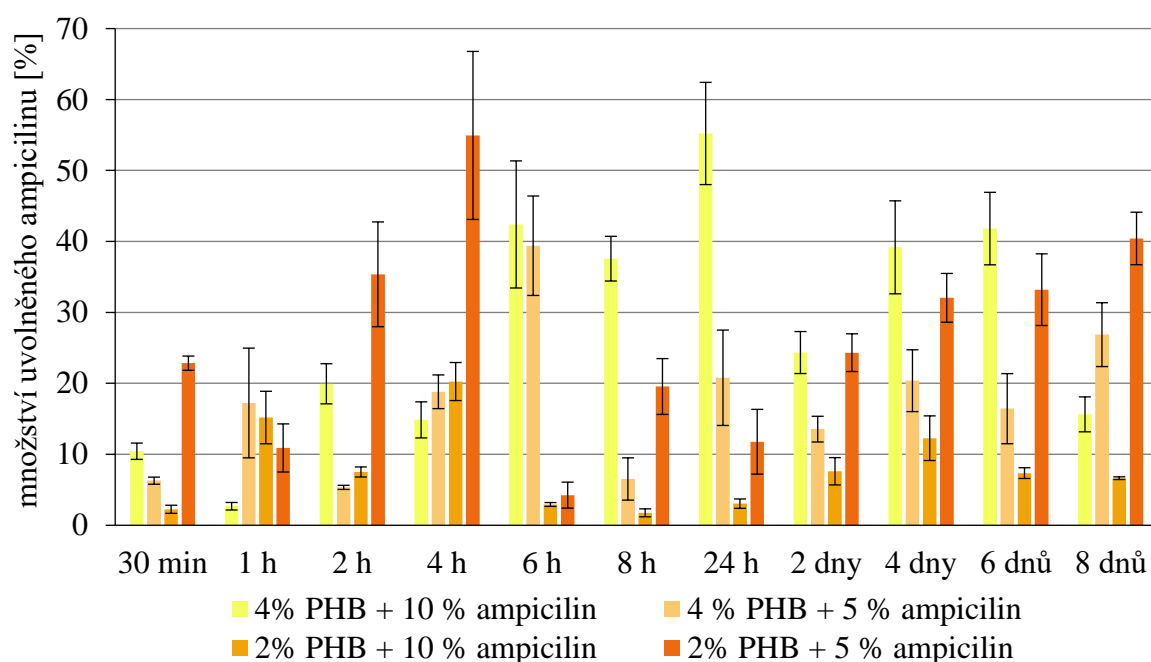
5.3.2 Kontrola uvolňování aktivních látek z nanovláknenných krytů

Sledování postupného uvolňování léčiv ampicilinu a ibuprofenu z připravených nanovláknenných krytů bylo provedeno dle postupu uvedeném v kapitole 4.8.2. Stanovení množství uvolněných látek do modelových prostředí, destilované vody (laboratorní teplota) a fyziologického roztoku (37 °C), bylo zjištěno spektrofotometricky. Pro výpočet množství uvolněných látek byla použita kalibrační rovnice v kapitole 4.6.1.1. Výsledkem bylo tedy procentuální vyjádření množství léčiva vztahované k celkovému množství látky inkorporované do celého nanovláknenného krytu.

Kontrola uvolňování aktivních látek byla provedena celkem u 8 připravených PHB krytů, které se lišily obsahem typu léčiva (ampicilin nebo ibuprofen), obsažených množství (5 nebo 10 % dané aktivní látky odpovídající množství použitého polymeru PHB) a především typem

krytu (4% PHB kryt připravený metodou forcespinning nebo 2% PHB kryt připravený metodou elektrospinning). Připraveny však byly také želatinové kryty lišící opět množstvím inkorporovaného léčiva (5 nebo 10 % léčiva odpovídající množství použité želatiny), ale jak už bylo výše zmíněno (viz. kapitola 5.3.1), u želatinových krytů byl předpoklad vysoké rychlosti degradace krytu při jeho kontaktu s uvedenými modelovými prostředími, a to za velmi krátký čas. Rychlost degradace koresponduje s rychlostí uvolňování léčiv ze struktury nanovláknenného nosiče. Z těchto důvodů bylo sledováno postupné uvolňování ampicilinu a ibuprofenu pouze u krytů na bázi PHB.

Získané výsledky byly zpracovány do sloupcových grafů, které jsou uvedeny níže.

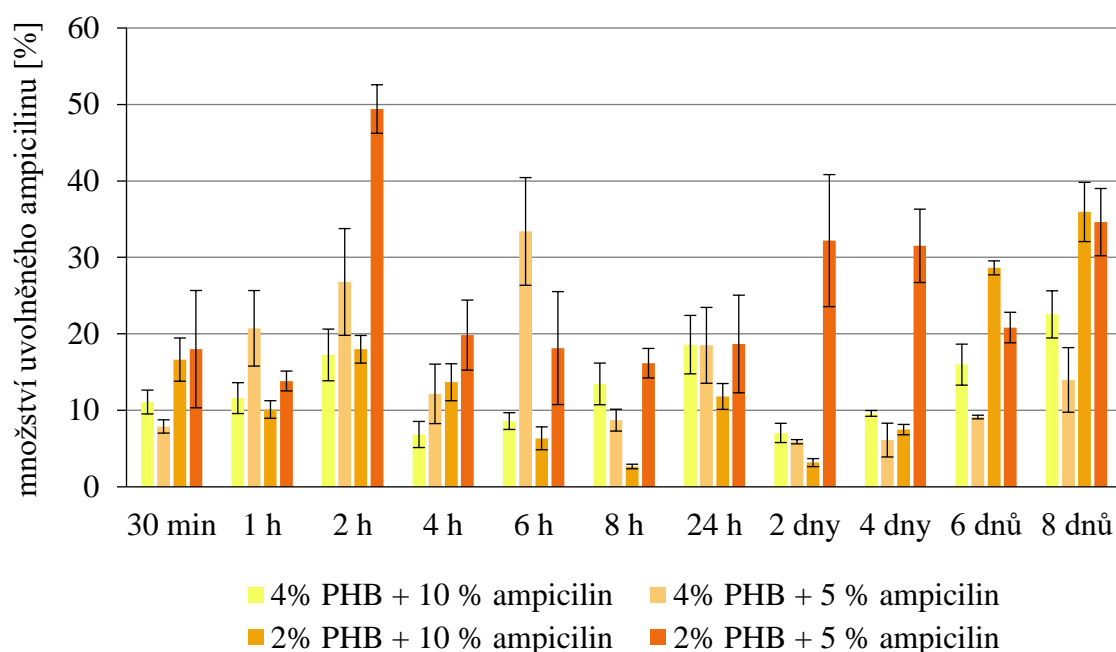


Obrázek 22 Grafické znázornění množství uvolněného ampicilinu z nanovláknenných krytů do prostředí tvořeného destilovanou vodou

Zde na uvedeném na obrázku 22, jenž představuje závislost množství uvolněného ampicilinu z nanovláknenných krytů do prostředí destilované vody na čase, může vidět postupně zvyšující se množství uvolněného antibiotika, avšak s občasným zakolísáním. Občasné poklesy rostoucího trendu uvolněného množství můžeme pozorovat jak u krytů s obsahem 4 hm. % PHB, tak i u krytů s obsahem 2 hm. %, nehledě na množství inkorporované látky. Zmíněné výkyvy si lze vysvětlit difuzí látky do zpět do struktury nanovláken a následným uvolněním této látky do modelového prostředí. Vliv také může mít i samotná struktura vlákna, nanovláknna se vyznačují četným obsahem póru jak ve svém vnitřku, tak i na svém povrchu. Léčivo zachycené v těchto pórech se mohlo v některých časech uvolnit pouze ze samotné vnitřní struktury, či jen z povrchu, a proto někdy shledáváme nižší koncentraci uvolněné látky. Výrazný pokles uvolněného množství můžeme pozorovat u 2% krytu na bázi PHB s obsahem 5 % léčivé látky v čase uvolňování 6 hodin, v tomto čase bylo detekováno pouze ze 4 %. V čase 8 hodin bylo u tohoto krytu detekováno pětinasobné množství ampicilinu (tj. 20 % ampicilinu),

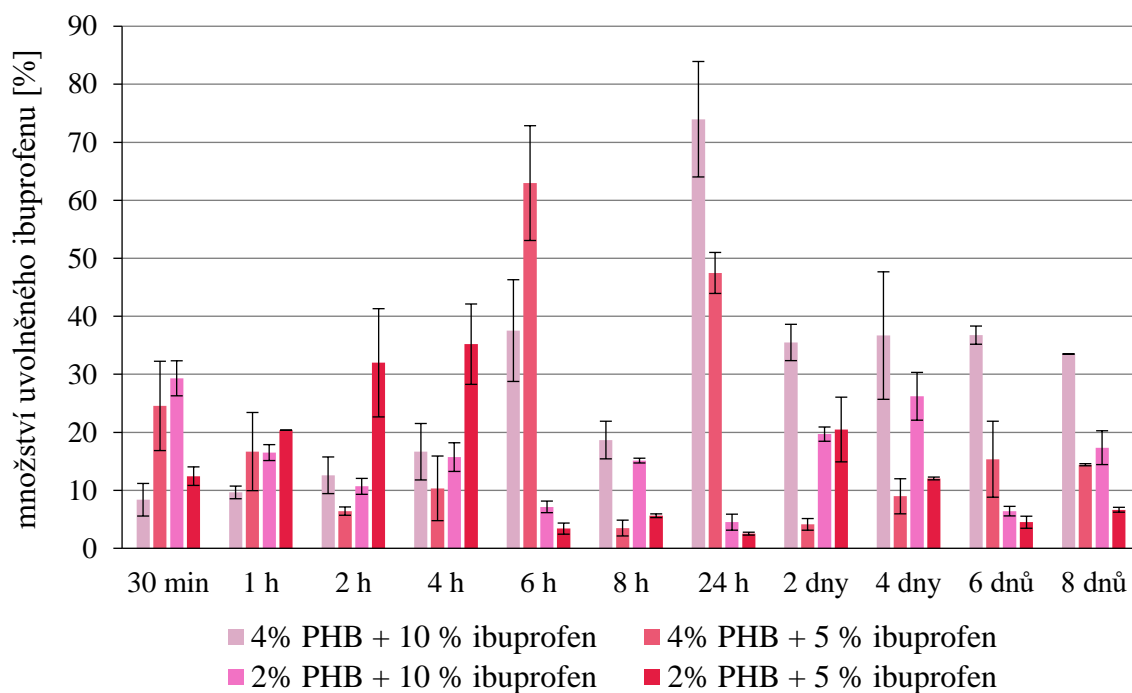
ve srovnání s předešlým časem. Největší množství uvolněné látky pak pozorujeme u 4% PHB krytu, zejména v čase 24 hodin, kdy bylo uvolněno až 55 % tohoto antibiotika.

A co se týče vlivu množství aktivní látky inkorporované do krytu, výraznější ovlivnění můžeme pozorovat u 2% PHB, kdy u krytů připravených s nižším obsahem aktivní látky (tj. 5 % ampicilinu) bylo detekováno vyšší množství uvolněného ampicilinu, ve srovnání se stejným krytem o obsahu vyššího množství této aktivní látky (tj. 10 % ampicilinu). Je tedy možné, že množství inkorporovaného léčiva mělo vliv na samotnou morfologii a zejména vlastnosti připravených nanovláken. I přesto, že množství aktivní látky nemělo vliv na samotnou zvláknitelnost a dle vizuální charakteristiky u připravených krytů nebyl spatřen rozdíl, rozdíly uvolněného množství léčiva jsou však patrnější. Stejněho vlivu totiž můžeme pozorovat i u dalšího modelového prostředí, u fyziologického roztoku (viz. Obrázek 23). I zde jsou v některých časech uvolňování zaznamenána vyšší množství u 2% PHB krytu s obsahem menšího množství ampicilinu, ve srovnání se 2% PHB krytem o obsahu 10 % tohoto antibiotika. U 4% PHB krytu rozdíly v množství inkorporované léčivé látky nejsou tak zřejmé.



Obrázek 23 Grafické znázornění množství uvolněného ampicilinu z nanovláčkových krytů do prostředí tvořeného fyziologickým roztokem

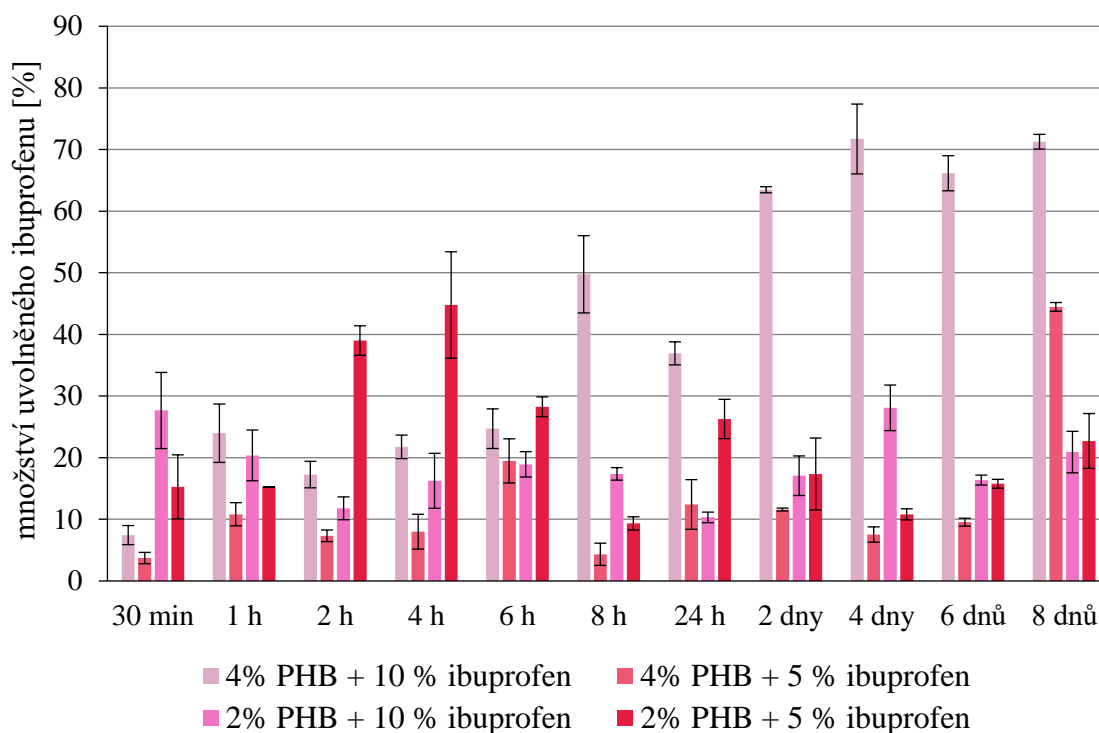
A stejně tak, jako u uvolňování antibiotika do prostředí destilované vody, i zde (Obrázek 23) pozorujeme dostatečná množství uvolněné léčivé látky v delším časovém období. Když dojde porušení kůže, je nezbytné zabránit bakteriální kolonizaci rány a předejít tak infekci. A právě kryt s dostatečným uvolňováním antibiotika do rány, by zajistil rychlejší hojení ran, a především zabránil infekci. Dle provedených antimikrobiálních testů (viz. 5.6), již koncentrace 0,05 mg/ml ampicilinu zajistí potlačení růstu bakteriálního kmene *E. coli*. A u většiny časů byla uvolněná koncentrace dostatečná pro zajištění potlačení vzniku bakteriální infekce.



Obrázek 24 Grafické znázornění množství uvolněného ibuprofenu z nanovláknenných krytů do prostředí tvořeného destilovanou vodou

Zde na výše uvedeném grafickém znázornění (viz. Obrázek 25) pozorujeme množství uvolněného analgetika ibuprofenu do modelového prostředí tvořeného destilovanou vodou. Rostoucí trend uvolněného množství léčiva z vláken o obsahu 4 hm. % PHB pozorujeme až po čas 6 hodin, následně pozorujeme nižší množství uvolněné látky (8 hodin). Na druhý den však již byla detekována opět vysoká koncentrace léčiva, u krytu s obsahem 10 % ibuprofenu bylo uvolněno více jak 70 % této látky. U krytu obsahujícího 2 hm. % PHB byl značný pokles již při 6 hodinách uvolňování, delší časové období (od 2 dnů) nám však ukazuje vyšší množství uvolněného analgetika. Nárůsty a poklesy hodnot si lze opět odůvodnit možnou difuzí této látky zpět do struktury nanovláknna a naopak. Případně při detekci vyšší koncentrace léčiva mohlo dojít k uvolňování jak z vnitřní struktury nanovláknna, tak i z povrchu nosiče.

Níže je pak uveden graf znázorňující uvolňování analgetika z nanovláknenných krytů do prostředí tvořeného fyziologickým roztokem (viz. Obrázek 25). I zde pozorujeme občasné výkyvy rostoucího trendu množství uvolněného antibiotika. Nelze si však nepovšimnout vyšších hodnot množství uvolněného léčiva ze 4% PHB krytu o obsahu 10 % léčiva, zejména od 8 hodin a více. Na druhý den bylo uvolněno až 72 % ibuprofenu z tohoto krytu.



Obrázek 25 Grafické znázornění množství uvolněného ibuprofenu z nanovláčkových krytů do prostředí tvořeného fyziologickým roztokem

Kromě zbavení se zápalu v ráně, součástí pozorné péče o ránu je také snížení bolesti v ráně, čehož lze docílit právě přidáním analgetika do krytí. V případě aplikace vytvořených nanovláčkových krytů v této práci, dle výsledků z uvolňování můžeme říci, že i po delším časovém úseku (týdnu) se analgetikum uvolňuje v dostatečném množství, po týdnu je stále dosaženo koncentrace 0,18 mg/ml, v případě 4% PHB krytu s 10 % léčiva. Například u 2% PHB krytu s 5 % léčiva byla poslední den uvolňování detekováno léčivo o koncentraci 0,01 mg/ml, tedy nižší ve srovnání se 4% PHB krytem. Nicméně platí, že bolest pacienta určuje typ a množství používaných analgetik. Proto výběr typu krytu a odpovídající množství inkorporovaných analgetik by záviselo na typu a závažnosti poranění kůže.

5.4 Příprava nanovláčkových krytů s inkorporovanými liposomy

5.4.1 Kryty na bázi PHB s obsahem liposomů

Pro přípravu nanovláčkových PHB krytů s obsahem liposomů byla využita metoda emulzního elektrostatického zvlákňování. Postup přípravy tohoto typu krytu je uveden v kapitole 4.9.1. Co se týče samotného pracovního roztoku určeného ke zvlákňování, na základě výsledků optimalizace přípravy PHB krytů by zvolen právě roztok o obsahu 2 hm. % PHB. K tomuto roztoku byly přidány částice rozsuspendované v destilované vodě. Proces zvlákňování byl uskutečněn právě při zoptimalizovaných parametrech (průtok 4 ml/h, pracovní vzdálenost 15 cm a napětí 15 kV). Experiment byl nejprve proveden s PHB roztokem a roztokem liposomů bez enkapsulovaných aktivních látek. A protože přidavek roztoku částic neovlivnil průběh elektrostatického zvlákňování, byly tyto zvolené parametry (včetně zvolené koncentrace

liposomů) ponechány i pro přípravu těchto hybridních krytů i s aktivními látkami (ampicilinem a ibuprofenem).

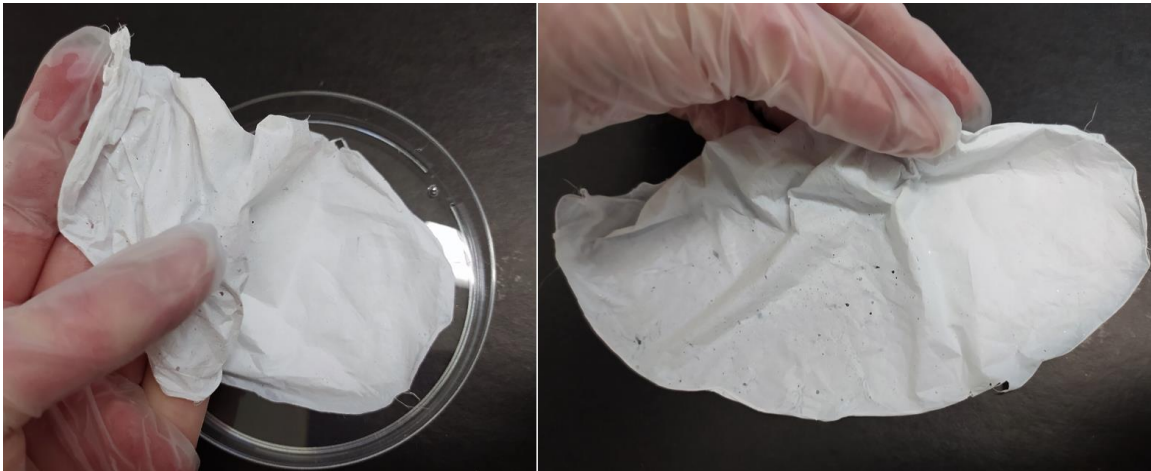
Dle vizuální charakterizace, vytvořený PHB kryt s předpokládaným obsahem liposomových částic byl hladký a celistvý. Snímání vytvořené vrstvy bylo snadné. Avšak vizuální rozdíl mezi PHB krytem a PHB krytem s obsahem liposomů byl zcela očividný, zvlákněním emulze bylo dosaženo tvorby průsvitného krytu (viz. Obrázek 26), ve srovnání s PHB krytem bez obsahu částic.



Obrázek 26 Tvorba krytu na bázi PHB s integrovanými liposomovými částicemi metodou emulzního elektrostatického zvláknění (vlevo), získaný PHB kryt s liposomy (vpravo)

5.4.2 Želatinové kryty s obsahem liposomů

Příprava želatinových krytů byla provedena dle postupu uvedeném v kapitole 4.9.2. Použitým pracovním roztokem ke zvláknění byl na základě výsledků optimalizace roztok o obsahu 25 hm. % želatiny, i samotný proces elektrostatického zvláknění byl proveden s již zoptimalizovanými parametry (průtok 1 ml/h, pracovní vzdálenost 10 cm a napětí 15 kV). Proces zvláknění přidávkem roztoku liposomů (liposomy rozsuspendované v destilované vodě) k pracovnímu roztoku želatiny nebyl ovlivněn. Zvláknění probíhalo hladce, byla pozorována tvorba paprsku vlákna a Taylorův kužel. Z těchto důvodů pro přípravu těchto systémů s aktivními látkami byly zmíněné parametry ponechány, včetně přidané koncentrace roztoku částic. Vytvořený nanovlákněný želatinový kryt s předpokládaným obsahem částic můžeme vidět níže na obrázku 27.



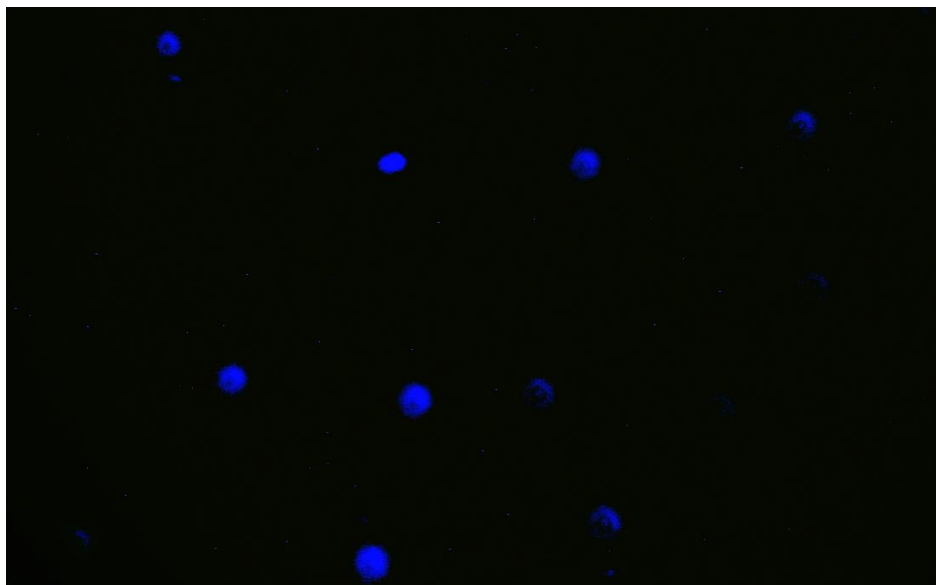
Obrázek 27 Nanovláknenný želatinový kryt s obsahem liposomových částic

5.5 Charakterizace nanovláknenných krytů s inkorporovanými liposomy

5.5.1 Kvalitativní důkaz přítomnosti liposomů

Ověření přítomnosti liposomových částic ve vytvořených vrstvách (PHB a želatiny) bylo provedeno za využití fluorescenčního mikroskopu. K označení liposomových částic, resp. fosfolipidů, byla použita membránová fluorescenční sonda BODIPY 493/503. Postup přípravy částic se zmíněným fluoroforem je uveden v kapitole 4.10.

Pozorováním pod fluorescenčním mikroskopem byla ověřena přítomnost liposomových částic ve vytvořených vrstvách připravených metodou elektrostatického zvlákňování. Pod mikroskopem byla pozorována místa svítící modře dokazující právě přítomnost značených částic.



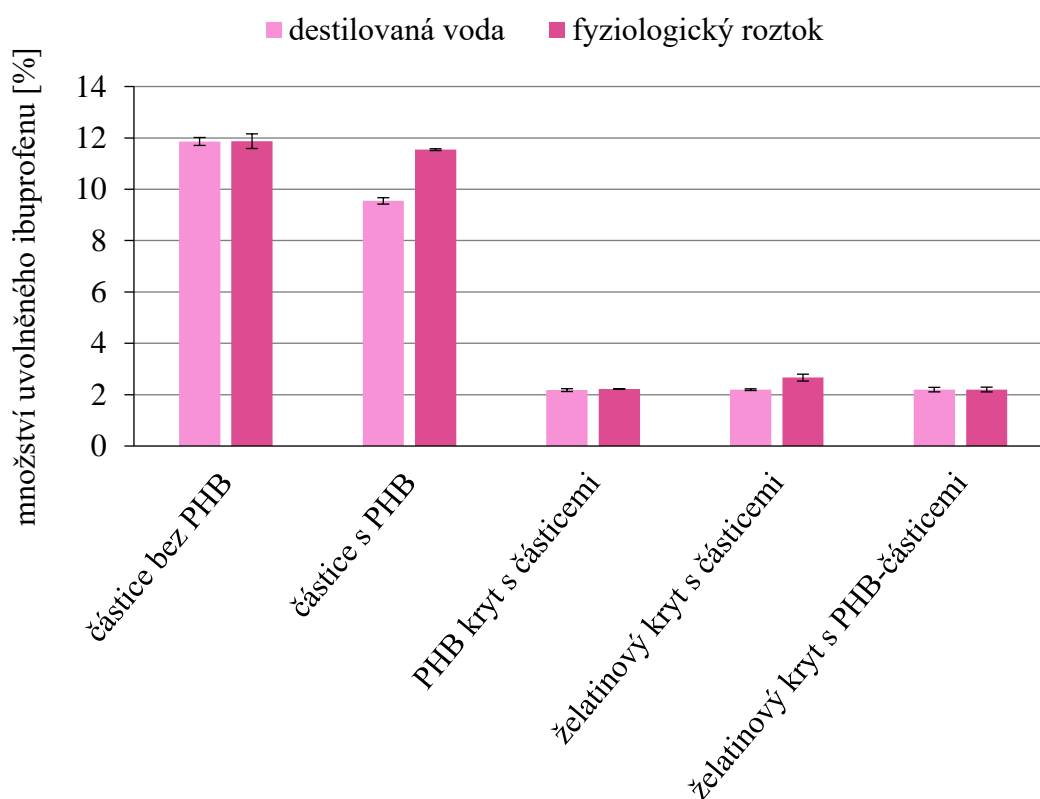
Obrázek 28 Důkaz přítomnosti liposomů v želatinových nanovlákněch (zvětšení 1000x)

Důkaz přítomnosti částic ve vytvořené struktuře můžeme vidět na výše uvedeném snímku z fluorescenčního mikroskopu (viz. Obrázek 28). Snímek potvrzuje přítomnost liposomů v želatinových nanovláčkách, kde právě modře svítící místa značí přítomnost liposomových částic bez PHB v nanovláčkové vrstvě želatiny.

5.5.2 Kontrola uvolňování aktivní látek z krytů s obsahem liposomů

Uvolňování aktivních látek z těchto hybridních systémů bylo sledováno dle postupu uvedeném v kapitole 4.10.1. Stanovení množství uvolněných aktivních látek do modelového prostředí v závislosti na čase bylo provedeno u všech připravených nanovláčkových krytů s obsahem liposomů (PHB krytů i želatinových), které byly připraveny dle postupu uvedeném v kapitole 4.9. Jako metoda pro detekci uvolněného množství byla zvolena kapalinová chromatografie, neboť ve většině připravených krytů s částicemi byla obsažena kombinace léčiv používaných v této práci, zapotřebí bylo tedy citlivější techniky.

V předchozích kapitolách zabývající se uvolňováním terapeutik z připravených nanostruktur jsme mohli vidět, že oba typy nosičů, tj. liposomové částice i nanovláčka, vykazují podobné vlastnosti, nanovláčkový nosič však uvolňoval svůj obsah za delší čas. U liposomových částic, již v prvních hodinách bylo detekováno větší množství uvolněné látky. Lze tedy předpokládat, že integrací liposomů do nanovláček dosáhneme synergického účinku právě v oblasti dodávání léčivých látek mezi těmito systémy, zajistíme tak zpomalení uvolňování látek z liposomových částic.



Obrázek 29 Grafické znázornění uvolňování ibuprofenu z částic v čase 2 hodin

Na výše uvedeném obrázku 29 můžeme vidět srovnání uvolněného množství ibuprofenu z částic a z částic integrovaných v nanovlákních v čase 2 hodin. Množství uvolněného léčiva, uvedené v grafu, bylo vyjádřeno v procentech a vztaženo na množství látky, které se podařilo do částic enkapsulovat (viz. 4.6.1.2). Na obrázku tedy můžeme vidět i množství uvolněného analgetika (%) ze samotných částic, které bylo stanoveno rovněž pomocí metody HPLC. Porovnání samotných částic bylo provedeno konkrétně s těmito kombinovanými systémy: PHB krytem s ampicilinem a ibuprofenovými částicemi, želatinovým krytem s ampicilinem a ibuprofenovými částicemi a také želatinovým krytem s ampicilinem a ibuprofenovými PHB-částicemi. Sledováno bylo tedy množství uvolněného ibuprofenu v čase 2 hodin.

A jak už bylo uvedeno, předpokladem inkorporací částic do nanovláken je zpomalení procesu uvolňování. Což můžeme potvrdit právě uvedeným grafem. V čase 2 hodin uvolňování do prostředí destilované vody (laboratorní teplota) a fyziologického roztoku (37 °C) vidíme, že množství detekované látky ze samotných liposomových částic se pohybuje v rozmezí 10 až 12 %, což odpovídá koncentraci 0,09–0,12 mg/ml (koncentrace zjištěná z kalibrační rovnice $y = 113,29 x$). U částic integrovaných ve vytvořených vrstvách bylo v tomto čase zjištěno 2 až necelé 3 % uvolněného ibuprofenu z enkapsulovaného množství (tj. 0,02–0,03 mg/ml), což platí jak u krytů vytvořených z polymeru PHB, tak i ze želatinových. Je však třeba upozornit na to, že srovnání bylo provedeno za předpokladu, že veškeré množství připravených částic bylo inkorporováno do daných nanovláken. Množství částic, které bylo reálně obsaženo ve vlákních, nemusí odpovídat množství, jaké bylo do částic vloženo. Mohlo dojít například k degradaci částic, zejména při procesu tvorby emulze pro tvorbu PHB vláken s částicemi, která byla připravena pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru.

Kromě uvedeného uvolňování v čase 2 hodin, které bylo uvedeno pro srovnání, bylo za využití metody HPLC sledováno uvolňování v časovém intervalu od 30 minut až po 4 dny, a to ze všech připravených struktur o obsahu částic. Výsledky z důvodu rozsahu získaných dat jsou uvedeny v příloze (viz. kapitola 9), kde jsou uvedena v podobě stanovené koncentrace v jednotkách mg/ml. Avšak bohužel u některých vzorků želatinových vláken, kde bylo očekáváno rychlé uvolnění (z důvodu rychlého rozpuštění želatiny v modelovém prostředí) a zároveň jakési zpomalení tím, že některá vlákna mohla zůstat, nebyla u všech vzorků možná detekce. Na chromatogramu byl viděn pouze velký pík želatiny překrývající sledovanou část tohoto záznamu.

Na tomto místě je třeba také zmínit, že detekovaná množství aktivních látek enkapsulovaných do částic, nám také potvrzují jejich přítomnost v daných vrstvách. Bohužel, však nyní nemůžeme posoudit, zda při samotném procesu tvorby vláken nedošlo k jejich degradaci, a proto je třeba provést mikroskopickou kontrolu (SEM), která v průběhu tvorby této práce nebyla možná.

5.6 Antimikrobiální aktivita

Antibakteriální účinek byl posouzen u koncentračních řad roztoků ampicilinu a ibuprofenu prostřednictvím diluční metody. Inhibiční účinnost těchto roztoků byla testována na bakteriálních kmenech *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis* dle postupu uvedeném v kapitole 4.11.2.

Výsledná antibakteriální aktivita (%) je znázorněna v níže uvedené tabulce 18, přičemž účinnost růstu jednotlivých bakteriálních kmenů je značena symboly, jejichž vysvětlení je uvedeno v tabulce 17.

Tabulka 17 Znaky pro daná procenta antibakteriálního účinku

Inhibice [%]	0	0–10	10–40	40–60	60–80	80–90	90–100
Znak	--	-	+	++	+++	++++	+++++

V prvních sloupcích tabulky 18 můžeme vidět výsledky stanovení citlivosti gramnegativního bakteriálního kmene *Escherichia coli* a grampozitivního kmene *Staphylococcus epidermidis* vůči antibiotiku ampicilin. U kmene *E. coli* můžeme pozorovat vysokou citlivost na toto antibiotikum, růst bakteriální kultury byl totiž zcela potlačen. Bylo dosaženo téměř 100% inhibice růstu bakterie, a to už při nižší koncentraci antibiotika (0,05 mg/ml). Co se týče citlivosti druhého kmene na antibiotikum, výraznější ovlivnění růstu kultury *S. epidermidis* byla pozorována až od koncentrace 0,25 mg/ml (inhibice od 60 do 80 %), při nižších koncentracích tohoto beta-laktamového antibiotika byl nárůst kultury ovlivněn pouze z několika jednotek procent.

Ve stejné tabulce můžeme pozorovat chování zmíněných bakteriálních kmenů v přítomnosti analgetika ibuprofenu. A jak se dalo očekávat, u obou kmenů nebyla antibakteriální aktivita tohoto léčiva pozorována. Drobný, avšak nijak výrazný antibakteriální účinek (pouze z několika jednotek procent) byl zaznamenán u *E. coli* při působení vyšších koncentrací ibuprofenu, až od 1 mg/ml.

Tabulka 18 Antibakteriální účinek různých koncentrací roztoků ampicilinu a ibuprofenu

aktivní látka [mg/ml]	ampicilin		ibuprofen	
	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>
0,050	+++++	-	--	--
0,125	+++++	++	--	--
0,250	+++++	+++	--	--
0,375	+++++	+++	--	--
0,500	+++++	+++	--	--
0,750	+++++	+++	--	--
1,000	+++++	+++	-	--
1,250	+++++	+++	-	--
1,500	+++++	+++	-	--
1,750	+++++	+++	-	--
2,000	+++++	+++	-	--

5.7 Stanovení bezpečnosti připravených materiálů

Konečnou fází této diplomové práce bylo určení bezpečnosti, resp. sledování případného cytotoxického účinku připravených materiálů. Bezpečnost u materiálů, upravených pro toto stanovení dle postupu 4.12.1, byla ověřena provedením MTT. Spolu MTT testem byl pro doplnění proveden i LDH test. Co se týče samotných materiálů, kterými byly nanovlákněné kryty s částicemi, jsou vypsány níže (viz. Tabulka 19). A protože jednotlivé kryty nebyly připraveny o stejné tloušťce, v tabulce jsou rovněž uvedeny i hmotnosti jednotlivých vzorků.

Se stanovením cytotoxicity, proběhl u uvedených materiálů souběžně i tzv. scratch test neboli test „hojení ran“, jehož postup provedení je uveden v kapitole 4.12.5.

Tabulka 19 Vzorky krytů o obsahu částic testované na humánních buňkách

vzorek	značení	hmotnost (1 cm ²) [mg]	
		MTT test	scratch test
PHB vlákna + prázdné částice	P1	3,0	3,6
PHB vlákna + částice s ampicilinem	P2	2,2	2,7
PHB vlákna s ibuprofenem + částice s ampicilinem	P3	2,1	2,3
PHB vlákna s ampicilinem + částice s ibuprofenem	P4	2,3	2,3
želatinová vlákna + prázdné částice	Ž1	1,3	1,4
želatinová vlákna + prázdné PHB částice	Ž2	0,6	0,5
želatinová vlákna + částice s ampicilinem	Ž3	0,9	0,8
želatinová vlákna + PHB částice s ampicilinem	Ž4	1,4	1,3
želatinová vlákna s ibuprofenem + částice s ampicilinem	Ž5	1,1	0,8
želatinová vlákna s ibuprofenem + PHB částice s ampicilinem	Ž6	1,3	1,3
želatinová vlákna s ampicilinem + částice s ibuprofenem	Ž7	2,2	1,3
želatinová vlákna s ampicilinem + PHB částice s ibuprofenem	Ž8	1,1	1,0

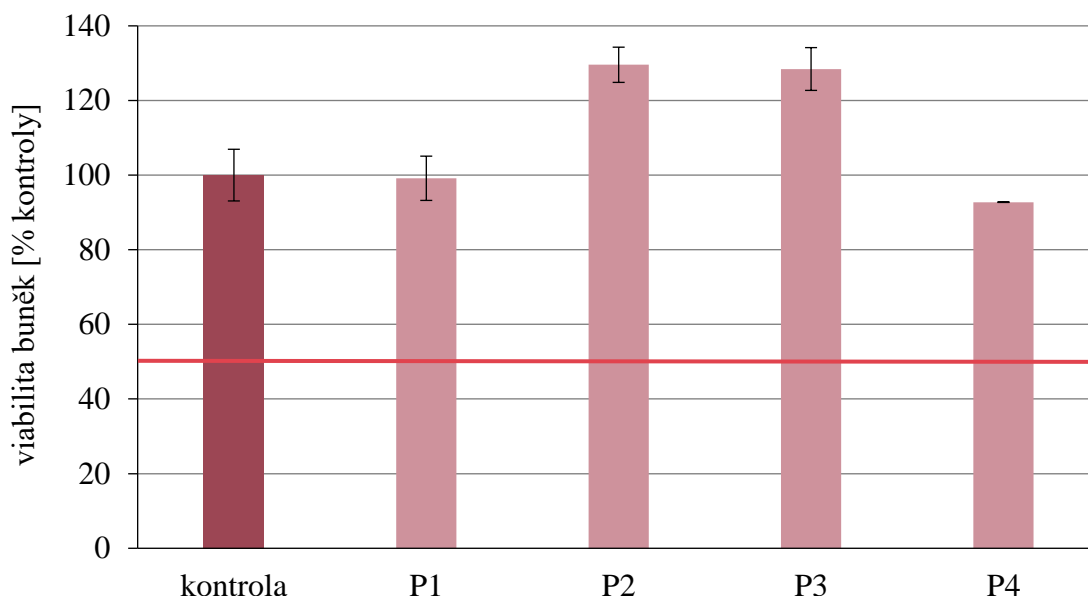
5.7.1 MTT test

MTT test byl proveden dle postupu uvedeném v kapitole 4.12.3, přičemž každý vzorek byl testován celkem dvakrát, výsledkem je tedy průměrná hodnota převedená na procentuální vyjádření růstu vzhledem ke kontrole růstu keratinocytů (CC) (viabilita CC činí 100 %).

Veškeré výsledné hodnoty viability HaCaT buněk po kultivaci s nanovlákněnými strukturami s inkorporovanými liposomy jsou uvedeny níže na obrázcích 30 a 31. Na těchto grafických znázorněních si můžeme všimnout červeného zvýraznění představující hranici cytotoxicity. Pokud hodnota inhibice metabolické aktivity neklesne pod 50 % kontroly [80],

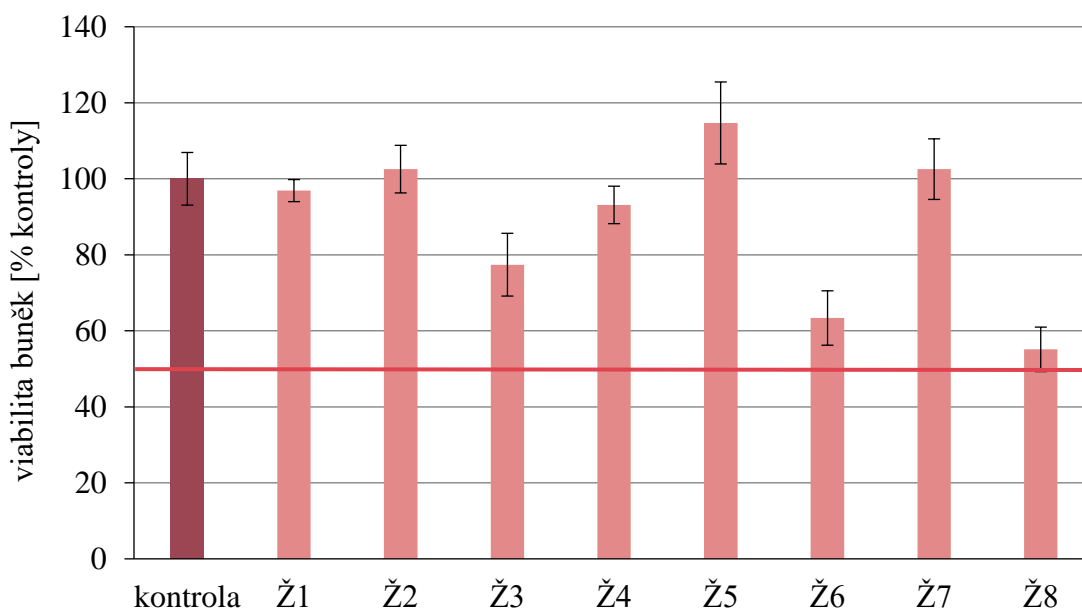
tzn. pod hranici cytotoxicity, testovaný vzorek lze považovat za bezpečný, tedy v rámci stanovení cytotoxického účinku.

Graf uvedený níže na obrázku 30 představuje výsledky MTT testu nanovláken na bázi PHB s obsahem liposomových částic. A jak můžeme vidět, PHB vlákna s liposomy nejsou v daných množství toxická. Veškeré hodnoty leží vysoko nad hranicí cytotoxicity, nebyl zaznamenán ani nijak výrazný pokles růstu keratinocytů vzhledem ke kontrole.



Obrázek 30 Viabilita HaCaT buněk po kultivaci s kryty na bázi PHB s obsahem částic

Na grafickém znázornění (viz. Obrázek 31) jsou uvedeny výsledky stanovení růstu keratinocytů po kultivaci s želatinovými kryty obsahujícími liposomové částice a modifikované liposomové částice polymerem PHB. I zde můžeme vidět, že tyto nanovláčkové kryty neměly významný vliv na metabolickou aktivitu keratinocytů vzhledem ke kontrole. Hodnota inhibice nebyla překročena, a proto lze vzorky považovat za netoxické. Ovšem mírný pokles viability sledujeme u vzorků obsahujících PHB-částice v želatinové struktuře (vzorek Ž6 a Ž8), jejich případný cytotoxický účinek byl však také prověřen LDH testem.

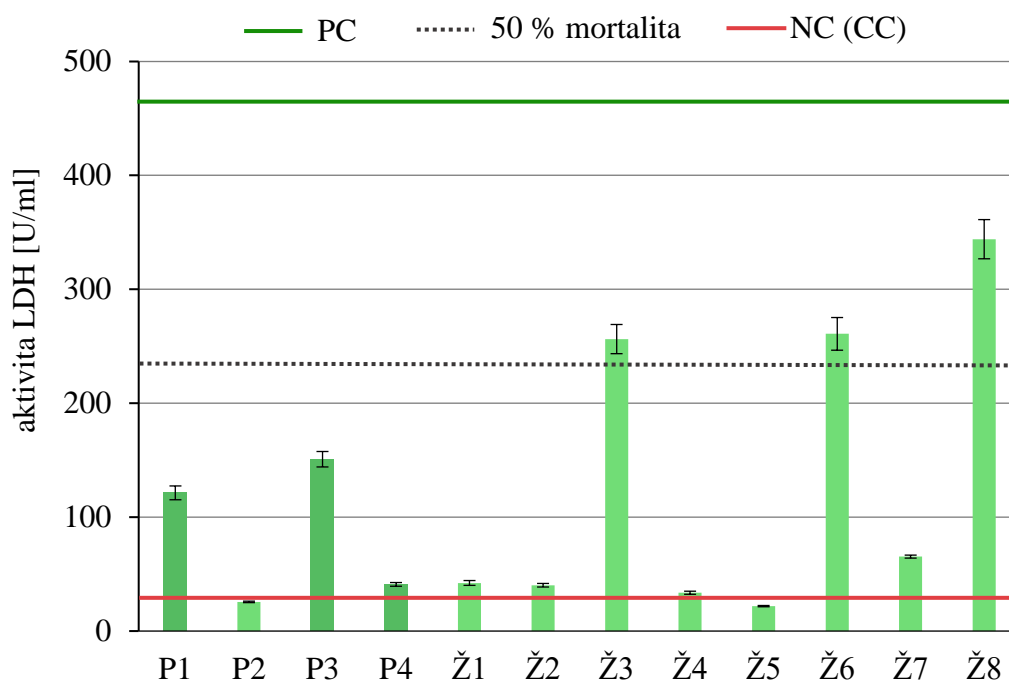


Obrázek 31 Viabilita HaCaT buněk po kultivaci s želatinovými kryty s obsahem částic

5.7.2 LDH test

Spolu s provedeným MTT testem byl proveden i LDH test, kde je cytotoxicita hodnocena na základě měření cytoplazmatického enzymu laktátdehydrogenázy, který se z buněčné cytoplazmy do kultivačního média uvolňuje v důsledku poškození buněk vlivem toxické látky. Z čehož pak vyplývá, čím vyšší aktivita tohoto enzymu bude detekována, tím nižší bude viabilita buněk, zde keratinocytů linie HaCaT. Aktivita byla stanovena v buněčných médiích, která byla odebrána z 24 jamkových destiček, ve kterých probíhal MTT test, konkrétní postup je uveden v kapitole 4.12.4.

Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměrné hodnoty ze tří měření a zpracovány do grafu uvedeném níže na obrázku 32. V grafickém znázornění, kromě získaných výsledků, můžeme také vidět červeně vyznačenou aktivitu LDH v buněčné kontrole růstu (CC) a zeleně vyznačenou aktivitu LDH v pozitivní kontrole, u které je předpokládáno 100 % usmrcení buněk, neboť buňky byly kultivovány v 30% ethanolu.



Obrázek 32 Aktivita LDH v médiu po vystavení HaCaT krytům s částicemi; pozitivní kontrola (PC): buňky kultivované s 30% ethanolem; negativní kontrola (NC): buňky kultivované v čistém médiu (CC)

Na grafickém znázornění (viz. Obrázek 32) můžeme vidět nižší produkci enzymu LDH do kultivačního média, a to u většiny vzorků. Což nám tedy potvrdilo, že připravené nanostruktury s liposomy nejsou toxické. Avšak i zde sledujeme výjimku, konkrétně u tří vzorků želatinových vláken. Vzorky Ž3 a Ž6, představující želatinová vlákna s ampicilinovými částicemi a želatinová vlákna s přídavkem ibuprofenu a obsahem ampicilinových PHB-částic, přesáhly šedě vyznačenou hranici cytotoxicity 50 %. Tyto vzorky již při MTT testu prokázaly nižší viabilitu ve srovnání s kontrolou, a proto i zde byla očekávána vyšší aktivita enzymu LDH. V grafu si však nelze nepovšimnout vysoké aktivity enzymu u vzorku Ž8 (želatinová vlákna s ampicilinem + ibuprofenové PHB-částice). U tohoto vzorku byl však mírnější cytotoxický účinek předpokládán, neboť viabilita buněk u MTT testu dosáhla hranice cytotoxicity. Toxický účinek zmíněných vzorků nebyl však vysoký, ani jeden ze vzorků se neblížil hranici pozitivní kontroly, proto se dá jejich cytotoxicita považovat nyní za diskutabilní a doporučuje se provedení dalšího testování v rámci cytotoxicity.

Za zmínku stojí také výborná viabilita buněk kultivovaných s některými PHB a želatinovými vlákny o obsahu liposomů, zejména u vzorku P2 (PHB vlákna s ampicilinem) a Ž5 (želatinová vlákna s ibuprofenem a obsahem ampicilinových částic), kde hodnoty aktivity enzymu jsou blízké naměřené hodnotě aktivity u kontrolních buněk (CC).

5.7.3 Scratch test (test „hojení ran“)

Scratch test neboli test rychlosti hojení uměle vytvořené rány byl proveden dle postupu uvedeném v kapitole 4.12.5. Cílem tohoto testu bylo sledování zacelení vytvořeného vrypu v monovrstvě keratinocytů v čase 24 hodin a 48 hodin ode dne vytvoření rány. Konkrétně byla

sledována tloušťka rány (v čase 0, 24 a 48 hodin), na základě čehož bylo určeno procento zacelení rány v daných časech. Získaná procenta byla samozřejmě vztažena na % zacelení rány u kontroly. Samotný proces zacelování rány u kontroly, tj. buněk kultivovaných bez přítomnosti krytu, je vyjádřen v % a uveden v tabulce 20. A jako i u MTT testu, byl i zde každý vzorek stanoven celkem dvakrát, výsledné hodnoty uvedené v tabulce 21 jsou tedy vyjádřeny jako hodnoty průměrné. Protože se vzorky PHB vláken byla složitější manipulace, nebylo tak možné získat snímek po 24 hodinách a určit o kolik % došlo k zacelení rány ve srovnání s předešlým dnem. Pouze u želatinových vláken byly výsledky získány z obou uvedených časů.

Tabulka 20 Zacelení rány v čase 24 h a 48 h v % (CC)

kontrola (CC)	zacelení rány [%]	
	24 hodin	48 hodin
	42,57 ± 1,49	62,40 ± 2,49

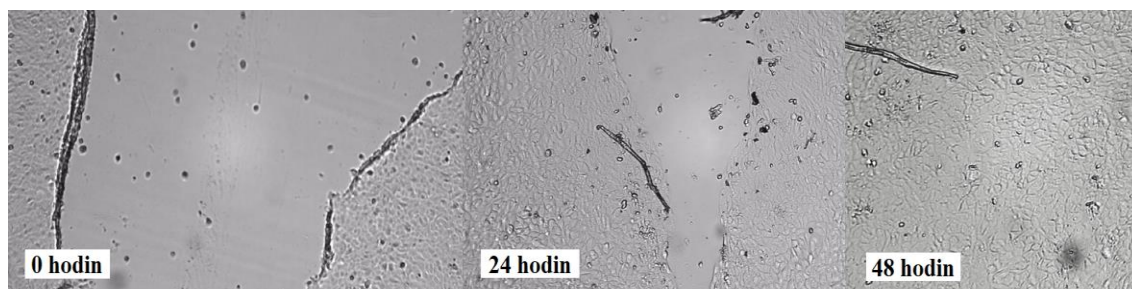
Tabulka 21 Zacelení rány v čase 24 h a 48 h v % (vzorky)

vzorek	zacelení rány [% kontroly]	
	24 hodin	48 hodin
P1	/	100,00 ± 0,00
P2	/	100,00 ± 0,00
P3	/	100,00 ± 0,00
P4	/	100,00 ± 0,00
Ž1	65,64 ± 1,79	100,00 ± 0,00
Ž2	98,14 ± 9,24	/
Ž3	46,99 ± 5,80	100,00 ± 0,00
Ž4	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
Ž5	100,00 ± 1,56	/
Ž6	64,11 ± 8,86	89,74 ± 4,51
Ž7	48,86 ± 4,05	100,00 ± 0,00
Ž8	48,72 ± 3,39	79,35 ± 3,07

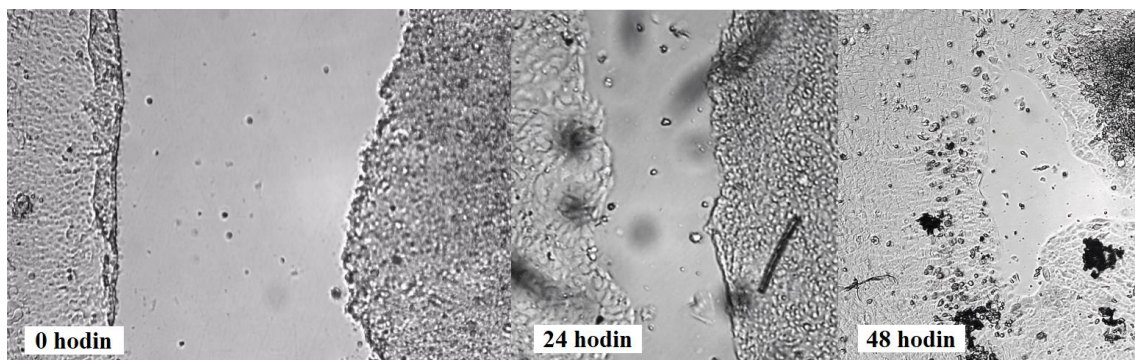
Z hodnot uvedených v tabulce 21 vidíme, že i po 24 hodinách došlo k rychlému zacelení vytvořených ran, významná migrace keratinocytů byla zaznamenána u vzorků Ž4 (želatinová vlákna s ampicilinovými PHB částicemi) a Ž5 (želatinová vlákna s ibuprofenem a obsahem ampicilinových částic). Za zmínku stojí také rychlost migrace buněk kultivovaných s vlákny o obsahu částic bez enkapsulovaných léčivých složek, u ran léčených těmito vzorky došlo již po 24 hodinách k mimořádnému zacelení, u vzorku Ž2 téměř 100%. Nejnižší procenta zacelení pak shledáváme u vzorku Ž3 a Ž8. U těchto vzorků nebyla však ani při dřívějších testech (MTT i LDH) potvrzena podpora růstu buněk, spíše naopak, proto rychlé zacelení ran zde nebylo očekáváno.

Co se týče vláken na bázi PHB, po 48 hodinách nebyl pod mikroskopem spatřen náznak vytvořené rány, u buněk kultivovaných s těmito typy vzorků došlo tedy ke 100% zacelení ran.

Pro důkaz, jsou níže uvedeny získané snímky z mikroskopu, kde můžeme vidět posun v zacelování ran ode dne jejich vytvoření.



Obrázek 33 Snímek procesu zacelování rány, schopnosti zacelení rány u vzorku Ž1, zacelení po 24 hodinách stanoveno na 65,64 % a po 48 hodinách na 100 % (zvětšení 100x)



Obrázek 34 Snímek procesu zacelování rány, schopnosti zacelení rány u vzorku Ž8, zacelení po 24 hodinách stanoveno na 48,72 % a po 48 hodinách na 79,35 % (zvětšení 100x)

6 ZÁVĚR

V současné době se do popředí dostávají nanomateriály, které jsou považovány za novou možnost terapie různých onemocnění. Jedním z příkladů jsou nanovlákná a nanočástice, jakožto nosiče léčivých látek, uplatnitelných v oblasti léčby ran. A právě cílem této práce bylo vyvinout krycí materiály na rány, v podobě nanovláknenných vrstev s liposomovými částicemi, které by podporovaly hojení ran, a to prostřednictvím postupného dodávání terapeutik, jako jsou antibiotika zabírající bakteriální infekci a analgetika tlumící bolest v ráně.

První část práce se týkala vývojem jednotlivých struktur a jejich charakterizací. Bylo třeba jednotlivé systémy hybridního nanovláknenného krytu s liposomy charakterizovat z hlediska jejich stability, postupného uvolňování léčivých látek a zejména bezpečnosti, kdy stanovení cytotoxicity za využití lidských kožních buněk bylo jedním z cílů této práce. Nejprve byly tedy připraveny liposomové částice a také polymerem PHB modifikované liposomové částice. U připravených částic lišících se obsahem aktivních látek (ampicilinu a ibuprofenu) bylo nejprve stanovena enkapsulační účinnost jednotlivých léčiv, kdy jako částice s největší schopností zapouzdřit léčivo do své struktury byly vyhodnoceny liposomy obohacené o PHB. Dle stanovení pomocí spektrofotometrie PHB-částice enkapsulovaly až 75,93 % analgetika a 62,86 % antibiotika, u částic bez tohoto polymeru bylo množství zapouzdřeného léčiva menší, ale i tak přesáhly hodnotu enkapsulační účinnosti 50 %. Dle stanovení metodou HPLC, provedené pro ověření přesnosti předchozího stanovení, byla enkapsulační účinnost ampicilinu téměř shodná, u ibuprofenu byly však rozdíly patrnější (EU ibuprofenu obou typů částic nad 90 %).

Veškeré připravené částice byly dále podrobeny stanovením využívající dynamický rozptyl světla. Nejprve byla zjištěna velikost a údaje o distribuci velikosti částic. Průměrná velikost částic se pohybovala v rozmezí od 200 do 400 nm. Všechny připravené částice o obsahu léčiv však vykazovaly velikost nad 300 nm, enkapsulací aktivních látek docházelo tedy ke zvyšování velikosti částic. Co se týče hodnot indexů polys disperzít, všechny připravené částice jevíly uniformitu. Charakterizace proběhla i z hlediska stability systému (částice suspendované v destilované vodě i fyziologickém roztoku), kdy částice i po 6 týdnech, vyjímaje částic bez enkapsulovaných složek v prostředí destilované vody, vykazovaly značnou stabilitu.

Další velká část práce byla pak zaměřena na nanovlákná. Kdy nedílnou součástí práce bylo provedení optimalizace procesu přípravy vláken. Tvorbou vláken připravovaných z různých biopolymerních materiálů, alginátu, PHB a želatiny, byla optimalizována z hlediska správné koncentrace, viskozity a vodivosti polymerních roztoků. Dále byly testovány parametry jako je pracovní vzdálenost, použité napětí a průtok, v případě elektrostaticky připravovaných nanovláken. Po provedené optimalizaci se podařilo vytvořit konkrétně tato nanovláknenná krytí: PHB kryt o obsahu 2 hm. % PHB (připravený metodou elektrospinning), PHB kryt o obsahu 4 hm. % PHB (připravený metodou forcespinning) a želatinových kryt o obsahu 25 hm. % želatiny (elektrospinning). Tyto uvedené kryty byly následně připravovány se zmíněnými aktivními látkami ampicilinem a ibuprofen, které tvořily 5 nebo 10 % z celkového množství daného polymeru. Kryt z polymeru alginátu sodného, resp. alginátu s kopolymerem PEO, bohužel nebyl vytvořen. Po provedení několika experimentů se podařilo vytvořit pouze vrstvu spíše rozprášeného polymeru a bohužel však nesnímatelnou z kolektoru. Avšak možné využití by tato vrstva mohla najít v rámci vícevrstevných krytů, kde by tvořila např. prostřední či druhou

vrstvu. Tématem souběžně probíhající práce s touto diplomovou byl vývoj těchto zmíněných vícevrstvých krytů, proto veškerá data z optimalizace přípravy vláken z tohoto polymeru byla poskytnuta do této práce.

Připravená nanovláknina byla charakterizována z hlediska jejich stability, byl sledován úbytek hmotnosti vláken nacházejících se v prostředí destilované vody nebo ve fyziologickém roztoku v určitém časovém intervalu. Na základě výsledků z tohoto stanovení lze říci, že u připravených vláken v průběhu času docházelo k postupné degradaci, která může však napomáhat postupnému uvolňování léčiv obsažených v nanovlákninné struktuře.

A protože hlavním cílem práce bylo vytvoření nanovlákninné vrstvy s integrovanými liposomy, další část práce se zabývala jejím vývojem. Nanovláknina o obsahu částic byla vytvářena z polymeru PHB a želatiny. K přípravě vláken z PHB však musela být využita jiná technika zvlákňování, a to emulzní elektrostatické zvlákňování. Důležitou součástí této části byl kvalitativní důkaz přítomnosti liposomů ve vytvořených vrstvách, kdy ověření bylo provedeno za využití fluorescenčního mikroskopu. Částice značené membránovou sondou BODIPY byly pod mikroskopem spatřeny, což nám dalo důkaz o tom, že do vytvořených vláken se podařilo částice inkorporovat.

Samotné připravené liposomové částice, nanovláknina a vytvořené hybridní systémy byly podrobeny charakterizaci z hlediska postupného uvolňování aktivních látek v nich obsažených. U uvolňování z liposomů i nanovláken byl viděn jasně rostoucí trend zvyšujícího se množství léčiv v průběhu času, ačkoliv s občasnými výkyvy odůvodněnými zpětnou difuzí látek do struktury. Dle získaných výsledků, ať už pomocí spektrofotometrie či HPLC, můžeme říci, že léčiva se uvolňovala v dostatečných množstvích, na to, aby např. v případě antibiotika dokázala potlačit vznik bakteriální infekce v ráně. Což bylo i potvrzeno sledováním citlivosti dvou bakteriálních kmenů (*E. coli* a *S. epidermidis*) na různé koncentrace ampicilinu. I v případě ibuprofenu můžeme konstatovat dostatečné dodávání tohoto léčiva. Součástí pozorné péče o ránu je totiž i snížení bolesti. Samozřejmě však platí, že bolest pacienta určuje typ a množství používaných analgetik. Proto výběr krytu a odpovídající množství inkorporovaných léčiv by záviselo na typu a závažnosti poranění.

Uvolňováním aktivních látek z nanovlákninných vrstev s liposomy nám pak znovu potvrdilo přítomnost liposomů v těchto strukturách. Bohužel však nemůžeme jasně určit počet či případnou degradaci částic způsobenou elektrostatickým zvlákňováním, proto se u těchto typů krytů doporučuje provedení kontroly pomocí elektronového mikroskopu (SEM). A co se týče samotného uvolňování, cílem u těchto struktur bylo dosažení synergie v oblasti dodávání léčiv mezi těmito systémy. Což bylo i potvrzeno, inkorporací částic do vláken došlo ke zpomalení procesu uvolňování z částic. U samotných částic docházelo k rychlému uvolňování léčiv v průběhu času. Léčiva z nanovláken byla naopak uvolňována v krátkém čase v nižších koncentracích. Spojením struktur jsme dosáhli dlouhodobějšího uvolňování za delší čas, což by mohlo být značnou výhodou pro pacienta, kryt s dlouhodobějším účinkem by na ráně mohl být aplikován delší dobu.

Na závěr této práce byla nanovláknina s liposomy testována v rámci bezpečnosti. Dle MTT testu veškeré kryty podporovaly růst keratinocytů, cytotoxicita prokázána nebyla. Pro ověření byl proveden i LDH test, kdy ve většině případů výsledky korelovaly s výsledky z MTT testu. Některé vzorky dle testu LDH prokázaly mírnější cytotoxicitu, a proto se doporučuje u těchto

vzorků dalšího stanovení v rámci bezpečnosti. Kromě stanovení cytotoxicity byl proveden i test „hojení ran“, kdy se sledovala rychlost zacelení uměle vytvořeného vrypu ve vrstvě buněk. Celkově můžeme říci, že veškeré kryty podporovaly migraci buněk a zrychlily proces hojení ran. Např. u želatinového krytu s ampicilinovými PHB-částicemi byla schopnost 100% zacelení rány již po 24 hodinách.

Tato diplomová práce, resp. propojení dat z veškerých provedených experimentů, vytváří podklady/nástin pro budoucí práce, zejména co se týče kombinovaných nanovlákných materiálů s liposomy, kde je doporučeno kvalitativní prokázání přítomnosti liposomů pomocí SEM, které zde nebylo umožněno, a případné provedení dalších experimentů v rámci optimalizace přípravy PHB a želatinových krytů s liposomy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ROGER, Mathilde, Nicola FULLARD, Lydia COSTELLO, et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of Anatomy* [online]. 2019, **234**(4), 438-455 [cit. 2021-10-15]. ISSN 0021-8782. Dostupné z: doi:10.1111/joa.12942
- [2] BOER, Magdalena, Ewa DUCHNIK, Romuald MALESZKA a Mariola MARCHLEWICZ. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Advances in Dermatology and Allergology* [online]. 2016, **1**, 1-5 [cit. 2021-10-15]. ISSN 1642-395X. Dostupné z: doi:10.5114/pdia.2015.48037
- [3] LAI-CHEONG, Joey E. a John A. MCGRATH. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine* [online]. 2021, **49**(6), 337-342 [cit. 2021-10-15]. ISSN 13573039. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpmed.2021.03.001
- [4] FENNER, Justine a Richard A.F. CLARK. Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 1-17 [cit. 2021-10-17]. ISBN 9780128016541. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801654-1.00001-2
- [5] POKORNÁ, Andrea a Romana MRÁZOVÁ. *Kompendium hojení ran pro sestry*. Praha: Grada, 2012. Sestra (Grada). ISBN isbn978-80-247-3371-5.
- [6] BROWN, Thomas M. a Karthik KRISHNAMURTHY. Histology, Dermis. *StatPearls [Internet]* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021 Jan- [cit. 2021-10-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/>
- [7] AUGUSTINE, Robin, Syed Raza Ur REHMAN, Rashid AHMED, Alap Ali ZAHID, Majid SHARIFI, Mojtaba FALAHATI a Anwarul HASAN. Electrospun chitosan membranes containing bioactive and therapeutic agents for enhanced wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **156**, 153-170 [cit. 2021-10-24]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.207
- [8] LEI, Jun, Lichun SUN, Ping LI, Chenhong ZHU, Zhen LIN, Vienna MACKEY, David H COY a Quanyong HE. The Wound Dressings and Their Applications in Wound Healing and Management. *Health Science Journal* [online]. 2019, **13**(3:662) [cit. 2021-10-24]. ISSN 1791-809X. Dostupné z: doi:10.36648/1791-809X.1000662
- [9] TOTTOLI, Erika Maria, Rossella DORATI, Ida GENTA, Enrica CHIESA, Silvia PISANI a Bice CONTI. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(8) [cit. 2021-10-24]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12080735
- [10] WANG, Peng-Hui, Ben-Shian HUANG, Huann-Cheng HORNG, Chang-Ching YEH a Yi-Jen CHEN. Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association* [online]. 2018, **81**(2), 94-101 [cit. 2021-10-25]. ISSN 1726-4901. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcma.2017.11.002
- [11] REZVANI GHOMI, Erfan, Shahla KHALILI, Saied NOURI KHORASANI, Rasoul ESMAEELY NEISIANY a Seeram RAMAKRISHNA. Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2019, **136**(27) [cit. 2021-11-14]. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.47738

- [12] MIHAI, Mara Madalina, Monica Beatrice DIMA, Bogdan DIMA a Alina Maria HOLBAN. Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control. *Materials* [online]. 2019, **12**(13) [cit. 2021-11-14]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12132176
- [13] STOICA, Alexandra Elena, Cristina CHIRCOV a Alexandru Mihai GRUMEZESCU. Nanomaterials for Wound Dressings: An Up-to-Date Overview. *Molecules* [online]. 2020, **25**(11) [cit. 2021-11-17]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25112699
- [14] SIM, Serjay a Nyet WONG. Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (Review). *Biomedical Reports* [online]. 2021, **14**(5) [cit. 2021-11-19]. ISSN 2049-9434. Dostupné z: doi:10.3892/br.2021.1418
- [15] BAIG, Nadeem, Irshad KAMMAKAKAM a Wail FALATH. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances* [online]. 2021, **2**(6), 1821-1871 [cit. 2021-11-19]. ISSN 2633-5409. Dostupné z: doi:10.1039/D0MA00807A
- [16] AZIZ, Zarith Asyikin Abdul, Hasmda MOHD-NASIR, Akil AHMAD, et al. Role of Nanotechnology for Design and Development of Cosmeceutical: Application in Makeup and Skin Care. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2019, **7** [cit. 2021-11-20]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00739
- [17] WANG, Wei, Kong-jun LU, Chao-heng YU, Qiao-ling HUANG a Yong-Zhong DU. Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2019, **17**(1) [cit. 2021-11-20]. ISSN 1477-3155. Dostupné z: doi:10.1186/s12951-019-0514-y
- [18] SALEH, Tawfik A. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation* [online]. 2020, **20** [cit. 2021-12-22]. ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2020.101067
- [19] NASKAR, Atanu a Kwang-sun KIM. Recent Advances in Nanomaterial-Based Wound-Healing Therapeutics. *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(6) [cit. 2021-12-27]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12060499
- [20] KHAN, Ibrahim, Khalid SAEED a Idrees KHAN. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2019, **12**(7), 908-931 [cit. 2021-12-27]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- [21] BELTRÁN-GRACIA, Esteban, Adolfo LÓPEZ-CAMACHO, Inocencio HIGUERA-CIAPARA, Jesús B VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ a Alba A VALLEJO-CARDONA. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnology* [online]. 2019, **10**(1) [cit. 2021-12-28]. ISSN 1868-6958. Dostupné z: doi:10.1186/s12645-019-0055-y
- [22] AJEESHKUMAR, Kizhakkeppurath Kumaran, Peruvazhipurath Appu ANEESH, Navaneethan RAJU, Mathew SUSEELA, Chandragiri Narayanarao RAVISHANKAR a Soottawat BENJAKUL. Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2021, **20**(2), 1280-1306 [cit. 2021-12-28]. ISSN 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12725

- [23] MAJA, Leitgeb, Knez ŽELJKO a Primožič MATEJA. Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2020, **165** [cit. 2021-12-28]. ISSN 08968446. Dostupné z: doi:10.1016/j.supflu.2020.104984
- [24] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, **8**(1) [cit. 2021-12-28]. ISSN 1556-276X. Dostupné z: doi:10.1186/1556-276X-8-102
- [25] PAVELKOVA, Renata, Petra MATOUSKOVA, Julie HOOVA, Jaromir PORIZKA a Ivana MAROVA. Preparation and characterisation of organic UV filters based on combined PHB/liposomes with natural phenolic compounds. *Journal of Biotechnology* [online]. 2020, **324** [cit. 2021-12-29]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.btecx.2020.100021
- [26] YILMAZ, Fulya, Gizem CELEP a Gamze TETIK. Nanofibers in Cosmetics. RAHMAN, Mohammed Muzibur a Abdullah M. ASIRI, ed. *Nanofiber Research - Reaching New Heights* [online]. InTech, 2016, 2016-10-19 [cit. 2021-12-29]. ISBN 978-953-51-2528-0. Dostupné z: doi:10.5772/64172
- [27] BARHOUM, Ahmed, Kaushik PAL, Hubert RAHIER, Hasan ULUDAG, Ick Soo KIM a Mikhael BECHELANY. Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nano-spinning fabrication techniques to emerging applications. *Applied Materials Today* [online]. 2019, **17**, 1-35 [cit. 2021-12-29]. ISSN 23529407. Dostupné z: doi:10.1016/j.apmt.2019.06.015
- [28] SISTA, Deepthi. New Perspective of Nano Fibers: Synthesis and Applications. KUMAR, Brajesh, ed. *Nanofibers - Synthesis, Properties and Applications* [online]. IntechOpen, 2021, 2021-9-15 [cit. 2021-12-30]. ISBN 978-1-83968-425-8. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.97460
- [29] HUANG, Ya, Jianan SONG, Cheng YANG, Yuanzheng LONG a Hui WU. Scalable manufacturing and applications of nanofibers. *Materials Today* [online]. 2019, **28**, 98-113 [cit. 2021-12-30]. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/j.mattod.2019.04.018
- [30] KWAK, Byeong Eun, Hyo Jeong YOO, Eungjun LEE a Do Hyun KIM. Large-Scale Centrifugal Multispinning Production of Polymer Micro- and Nanofibers for Mask Filter Application with a Potential of Cospinning Mixed Multicomponent Fibers. *ACS Macro Letters* [online]. 2021, **10**(3), 382-388 [cit. 2021-12-30]. ISSN 2161-1653. Dostupné z: doi:10.1021/acsmacrolett.0c00829
- [31] LU, Yao, Ying LI, Shu ZHANG, Guanjie XU, Kun FU, Hun LEE a Xiangwu ZHANG. Parameter study and characterization for polyacrylonitrile nanofibers fabricated via centrifugal spinning process. *European Polymer Journal* [online]. 2013, **49**(12), 3834-3845 [cit. 2021-12-31]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.09.017
- [32] LURAGHI, Andrea, Francesco PERI a Lorenzo MORONI. Electrospinning for drug delivery applications: A review. *Journal of Controlled Release* [online]. 2021, **334**, 463-484 [cit. 2022-01-01]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2021.03.033
- [33] JUNCOS BOMBIN, Adrian D., Nicholas J. DUNNE a Helen O. MCCARTHY. Electrospinning of natural polymers for the production of nanofibres for wound healing

- applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2020, **114** [cit. 2022-01-01]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.110994
- [34] KHALF, Abdurizzagh a Sundararajan V. MADIHALLY. Recent advances in multiaxial electrospinning for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2017, **112**, 1-17 [cit. 2022-01-01]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.010
- [35] OKUTAN, Nagihan, Pınar TERZI a Filiz ALTAY. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids* [online]. 2014, **39**, 19-26 [cit. 2022-01-01]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2013.12.022
- [36] MEINEL, Anne J., Oliver GERMERSHAUS, Tessa LUHMANN, Hans P. MERKLE a Lorenz MEINEL. Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2012, **81**(1), 1-13 [cit. 2022-01-01]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2012.01.016
- [37] ZHANG, Cen, Fengqin FENG a Hui ZHANG. Emulsion electrospinning: Fundamentals, food applications and prospects. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2018, **80**, 175-186 [cit. 2022-01-01]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2018.08.005
- [38] MOURO, Cláudia, Ana P. GOMES, Merja AHONEN, Raul FANGUEIRO a Isabel C. GOUVEIA. Chelidoniummajus L. Incorporated Emulsion Electrospun PCL/PVA_PEC Nanofibrous Meshes for Antibacterial Wound Dressing Applications. *Nanomaterials* [online]. 2021, **11**(7) [cit. 2022-01-01]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano11071785
- [39] YAN, Li, Haoyu WANG, Hui XU, Rui ZHENG a Zhengyu SHEN. Epidermal stimulating factors-gelatin/polycaprolactone coaxial electrospun nanofiber: ideal nanoscale material for dermal substitute. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2021, **32**(1), 60-75 [cit. 2022-01-02]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2020.1816110
- [40] MARIA LEENA, M., S.K. VIMALA BHARATHI, Jeyan A. MOSES a C. ANANDHARAMAKRISHNAN. Potential Applications of Nanofibers in Beverage Industry. *Nanoengineering in the Beverage Industry* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 333-368 [cit. 2022-01-02]. ISBN 9780128166772. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816677-2.00011-9
- [41] LIU, Yan, Shiya ZHOU, Yanlin GAO a Yinglei ZHAI. Electrospun nanofibers as a wound dressing for treating diabetic foot ulcer. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2019, **14**(2), 130-143 [cit. 2022-01-02]. ISSN 18180876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajps.2018.04.004
- [42] MOKHENA, Teboho Clement, Mokgaotsa Jonas MOCHANE, Asanda MTIBE, Maya Jacob JOHN, Emmanuel Rotimi SADIKU a Jeremia Shale SEFADI. Electrospun Alginate Nanofibers Toward Various Applications: A Review. *Materials* [online]. 2020, **13**(4) [cit. 2022-01-02]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma13040934

- [43] SAPKOTA, Sameer a Shih-Feng CHOU. Electrospun Chitosan-based Fibers for Wound Healing Applications. *Journal of biomaterials* [online]. 2020 Dec 4, **4**(2), 51-57 [cit. 2022-01-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8159176/>
- [44] AZIMI, Bahareh, Homa MALEKI, Lorenzo ZAVAGNA, Jose Gustavo DE LA OSSA, Stefano LINARI, Andrea LAZZERI a Serena DANTI. Bio-Based Electrospun Fibers for Wound Healing. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2020, **11**(3) [cit. 2022-01-10]. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi:10.3390/jfb11030067
- [45] P R., Yashavanth, Meenakshi DAS a Soumen K. MAITI. Recent progress and challenges in cyanobacterial autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), a bioplastic. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2021, **9**(4) [cit. 2022-01-10]. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2021.105379
- [46] GULSUN, Tugba, Murat INAL, Yagmur AKDAG, Nihan IZAT, Levent ONER a Selma SAHIN. The development and characterization of electrospun gelatin nanofibers containing indomethacin and curcumin for accelerated wound healing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2022, **67** [cit. 2022-01-10]. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2021.103000
- [47] GHASSEMI, Zahra a Gymama SLAUGHTER. Cross-linked electrospun gelatin nanofibers for cell-based assays. In: *2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)* [online]. IEEE, 2018, 2018, s. 6088-6091 [cit. 2022-01-10]. ISBN 978-1-5386-3646-6. Dostupné z: doi:10.1109/EMBC.2018.8513549
- [48] MICKOVA, Andrea, Matej BUZGO, Oldrich BENADA, et al. Core/Shell Nanofibers with Embedded Liposomes as a Drug Delivery System. *Biomacromolecules* [online]. 2012, **13**(4), 952-962 [cit. 2022-01-11]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm2018118
- [49] TAN, Chen, Jing WANG a Baoguo SUN. Biopolymer-liposome hybrid systems for controlled delivery of bioactive compounds: Recent advances. *Biotechnology Advances* [online]. 2021, **48** [cit. 2022-01-11]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107727
- [50] NEGUT, Irina, Valentina GRUMEZESCU a Alexandru GRUMEZESCU. Treatment Strategies for Infected Wounds. *Molecules* [online]. 2018, **23**(9) [cit. 2022-01-11]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23092392
- [51] ERFURT-BERGE, Cornelia a Regina RENNEN. Recent Developments in Topical Wound Therapy: Impact of Antimicrobiological Changes and Rebalancing the Wound Milieu. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**, 1-8 [cit. 2022-01-12]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/819525
- [52] BURNETT-BOOTHROYD, S.C. a B.J. MCCARTHY. Antimicrobial treatments of textiles for hygiene and infection control applications: an industrial perspective. *Textiles for Hygiene and Infection Control* [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 196-209 [cit. 2022-01-12]. ISBN 9781845696368. Dostupné z: doi:10.1533/9780857093707.3.196
- [53] PENG, M., S. SALAHEEN a D. BISWAS. Animal Health: Global Antibiotic Issues. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s.

- 346-357 [cit. 2022-01-12]. ISBN 9780080931395. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52512-3.00187-X
- [54] RIAZ, Luqman, Muzammil ANJUM, Qingxiang YANG, et al. Treatment technologies and management options of antibiotics and AMR/ARGs. *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 369-393 [cit. 2022-01-12]. ISBN 9780128188828. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818882-8.00023-1
- [55] NEGUT, Irina, Valentina GRUMEZESCU a Alexandru GRUMEZESCU. Treatment Strategies for Infected Wounds. *Molecules* [online]. 2018, **23**(9) [cit. 2022-01-12]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23092392
- [56] CASTLE, Sharon S. Ampicillin. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* [online]. Elsevier, 2007, 2007, s. 1-6 [cit. 2022-01-12]. ISBN 9780080552323. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008055232-3.61227-9
- [57] SWAMI, Onkar C. Ampicillin: Rise Fall & Resurgence. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [online]. 2014 [cit. 2022-01-12]. ISSN 2249782X. Dostupné z: doi:10.7860/JCDR/2014/8777.4356
- [58] GOLAR, S. K. Use and understanding of analgesics (painkillers) by Aston university students. *Bioscience Horizons* [online]. 2011, **4**(1), 71-78 [cit. 2022-01-12]. ISSN 1754-7431. Dostupné z: doi:10.1093/biohorizons/hzr009
- [59] HENA, Sufia a Hussein ZNAD. Membrane Bioreactor for Pharmaceuticals and Personal Care Products Removal From Wastewater. *Fundamentals of Quorum Sensing, Analytical Methods and Applications in Membrane Bioreactors* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 201-256 [cit. 2022-01-12]. Comprehensive Analytical Chemistry. ISBN 9780444640642. Dostupné z: doi:10.1016/bs.coac.2018.02.005
- [60] MAZALEUSKAYA, Liudmila L., Katherine N. THEKEN, Li GONG, Caroline F. THORN, Garret A. FITZGERALD, Russ B. ALTMAN a Teri E. KLEIN. PharmGKB summary. *Pharmacogenetics and Genomics* [online]. 2015, **25**(2), 96-106 [cit. 2022-01-12]. ISSN 1744-6872. Dostupné z: doi:10.1097/FPC.0000000000000113
- [61] GHERASIM, Oana, Gianina POPESCU-PELIN, Paula FLORIAN, Madalina ICRIVERZI, Anca ROSEANU, Valentina MITRAN, Anisoara CIMPEAN a Gabriel SOCOL. Bioactive Ibuprofen-Loaded PLGA Coatings for Multifunctional Surface Modification of Medical Devices. *Polymers* [online]. 2021, **13**(9) [cit. 2022-01-12]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13091413
- [62] VIDAL, M. N. P. a J. M. GRANJEIRO. Cytotoxicity Tests for Evaluating Medical Devices: An Alert for the Development of Biotechnology Health Products. *Journal of Biomedical Science and Engineering* [online]. 2017, **10**(09), 431-443 [cit. 2022-01-13]. ISSN 1937-6871. Dostupné z: doi:10.4236/jbise.2017.109033
- [63] NIKZAMIR, Mohammad, Abolfazl AKBARZADEH a Yunes PANAHI. An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2021, **61** [cit. 2022-01-13]. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2020.102316

- [64] LI, WEIJIA, JING ZHOU a YUYIN XU. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports* [online]. 2015, **3**(5), 617-620 [cit. 2022-01-13]. ISSN 2049-9434. Dostupné z: doi:10.3892/br.2015.481
- [65] BERGAL, Mathilde, Mickaël PUGINIER, Cédric GERBEIX, Hervé GROUX, Alicia ROSO, Françoise COTTREZ a Alain MILIUS. In vitro testing strategy for assessing the skin sensitizing potential of “difficult to test” cosmetic ingredients. *Toxicology in Vitro* [online]. 2020, **65** [cit. 2022-01-13]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2020.104781
- [66] CHEN, Rui, Anne-Marie SALISBURY a Steven L. PERCIVAL. In vitro cellular viability studies on a concentrated surfactant-based wound dressing. *International Wound Journal* [online]. 2019, **16**(3), 703-712 [cit. 2022-01-13]. ISSN 1742-4801. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.13084
- [67] WANG, Gang, Jianping ZHANG, Abiche H. DEWILDE, Anoop K. PAL, Dhimiter BELLO, Joel M. THERRIEN, Susan J. BRAUNHUT a Kenneth A. MARX. Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial LDH cytotoxicity assay. *Toxicology* [online]. 2012, **299**(2-3), 99-111 [cit. 2022-01-13]. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2012.05.012
- [68] PAWLAK, Justyna, Agata TRZCIONKA, Anna MERTAS, Arkadiusz DZIEDZIC, Tomasz HILDEBRANDT a Marta TANASIEWICZ. The Cytotoxicity Assessment of Novel Formulation Developed to Reduce Dentin Hypersensitivity Utilizing Dehydrogenase Assay. *Coatings* [online]. 2021, **11**(2) [cit. 2022-01-13]. ISSN 2079-6412. Dostupné z: doi:10.3390/coatings11020217
- [69] STOCKERT, Juan C., Alfonso BLÁZQUEZ-CASTRO, Magdalena CAÑETE, Richard W. HOROBIN a Ángeles VILLANUEVA. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* [online]. 2012, **114**(8), 785-796 [cit. 2022-01-13]. ISSN 00651281. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006
- [70] GRELA, Ewa, Joanna KOZŁOWSKA a Agnieszka GRABOWIECKA. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica* [online]. 2018, **120**(4), 303-311 [cit. 2022-01-13]. ISSN 00651281. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2018.03.007
- [71] VANG MOURITZEN, Michelle a Håvard JENSSEN. Optimized Scratch Assay for *In Vitro* Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2018, (138) [cit. 2022-01-17]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/57691
- [72] GRADA, Ayman, Marta OTERO-VINAS, Francisco PRIETO-CASTRILLO, Zaidal OBAGI a Vincent FALANGA. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2017, **137**(2), e11-e16 [cit. 2022-01-17]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jid.2016.11.020
- [73] LIANG, Chun-Chi, Ann Y PARK a Jun-Lin GUAN. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature*

- Protocols* [online]. 2007, 2(2), 329-333 [cit. 2022-01-17]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2007.30
- [74] ECCLES, Suzanne A., Carol BOX a William COURT. *Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery* [online]. Elsevier, 2005, 2005, s. 391-421 [cit. 2022-01-17]. *Biotechnology Annual Review*. ISBN 9780444519528. Dostupné z: doi:10.1016/S1387-2656(05)11013-8
- [75] HOSSAIN, Mohammad Forhad a Mustafijur RAHMAN. Preparation and Characterization of the Electrospun Alginate Nanofibers. *Journal of Textile Science and Technology* [online]. 2021, 07(02), 91-100 [cit. 2022-01-18]. ISSN 2379-1543. Dostupné z: doi:10.4236/jtst.2021.72008
- [76] LEUNG, Victor, Ryan HARTWELL, Sanam Salimi ELIZEI, Heejae YANG, Aziz GHAHARY a Frank KO. Postelectrospinning modifications for alginate nanofiber-based wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2014, 102(3), 508-515 [cit. 2021-11-22]. ISSN 15524973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.33028
- [77] WANG, Peng, Yang LI, Cen ZHANG, Fengqin FENG a Hui ZHANG. Sequential electrospinning of multilayer ethylcellulose/gelatin/ethylcellulose nanofibrous film for sustained release of curcumin. *Food Chemistry* [online]. 2020, 308 [cit. 2022-01-19]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2019.125599
- [78] BALÁŠOVÁ, Patricie. Příprava a charakterizace moderních krytů ran. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131443>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Matoušková.
- [79] PROCHÁZKOVÁ, Lucie. *Enkapsulace aktivních látek do nanovláken a možnosti jejich aplikace*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138744>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Skoumalová.
- [80] ZHANG, Ming, Dolly AGUILERA, Chandra DAS, Hernan VASQUEZ, Peter ZAGE, Vidya GOPALAKRISHNAN a Johannes WOLFF. Measuring Cytotoxicity: A New Perspective on LC50. *ANTICANCER RESEARCH* [online]. 2007, 27(1A), 35-38 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://ar.iiarjournals.org/content/anticancer/27/1A/35.full.pdf>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
BHI	Brain Heart Infusion Medium
CC	cell control
CVD	chemical vapour deposition
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dymethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
HaCaT	human keratinocytes cell line
HPLC	high performance liquid chromatography
INT	2-p-jodfenyl-3-p-nitrofenyltetrazoniumchlorid
ISO	International organisation for standardization
LDH	laktátdehydrogenáza
MLV	multilamellar vesicles
MTT	3-(4,5-dimetyltiazo-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid
NAD	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NB	Nutrient Broth Medium
Nano-DDS	nano-drug delivery system
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PAL	povrchově aktivní látky
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
PC	positive control
PEO	polyethylenoxid
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
PVA	polyvinylalkohol
PVD	physical vapour deposition
SA	alginát sodný
SAS	supercritical antisolvent
SPRE	supercritical reverse-phase evaporation
SDS	dodecylsírán sodný
TFA	trifluoroctová kyselina
ULV	large unilamellar vesicle
UV	ultrafialové záření

9 PŘÍLOHY

Příloha 1 Názvy a k nim označení připravených materiálů

označení	celý název krytu
kryt č. 1	PHB kryt + částice s ampicilinem
kryt č. 2	PHB kryt + ibuprofen + částice s ampicilinem
kryt č. 3	PHB kryt + ampicilin + částice s ibuprofenem
kryt č. 4	želatinový kryt + částice s ampicilinem
kryt č. 5	želatinový kryt + PHB-částice s ampicilinem
kryt č. 6	želatinový kryt + ibuprofen + částice s ampicilinem
kryt č. 7	želatinový kryt + ibuprofen + PHB-částice s ampicilinem
kryt č. 8	želatinový kryt + ampicilin + částice s ibuprofenem
kryt č. 9	želatinový kryt + ampicilin + PHB-částice s ibuprofenem

Příloha 2 Množství uvolněného ampicilinu z PHB krytů s obsahem liposomů

doba uvolňování	prostředí	množství uvolněného ampicilinu [mg/ml]		
		kryt č. 1	kryt č. 2	kryt č. 3
30 minut	destilovaná voda	0,0000515 ± 0,0000014	0,0000620 ± 0,0000031	0,00538 ± 0,00013
	fyzilogický roztok	0,0000482 ± 0,0000006	0,0000233 ± 0,0000012	0,00495 ± 0,00012
1 hodina	destilovaná voda	0,0004652 ± 0,0000033	0,0000326 ± 0,0000016	0,00711 ± 0,00011
	fyzilogický roztok	0,0000617 ± 0,0000007	0,0000318 ± 0,0000012	0,00681 ± 0,00010
2 hodiny	destilovaná voda	0,0000727 ± 0,0000029	0,0000301 ± 0,0000021	0,00748 ± 0,00011
	fyzilogický roztok	0,0000581 ± 0,0000017	0,0000427 ± 0,0000019	0,00601 ± 0,00009
6 hodin	destilovaná voda	0,0000857 ± 0,0000043	0,0000378 ± 0,0000025	0,00817 ± 0,00012
	fyzilogický roztok	0,0000465 ± 0,0000011	0,0000499 ± 0,0000019	0,00787 ± 0,00012
24 hodin	destilovaná voda	0,0001393 ± 0,0000084	0,0000311 ± 0,0000019	0,01045 ± 0,00016
	fyzilogický roztok	0,0000530 ± 0,0000009	0,0000388 ± 0,0000015	0,00959 ± 0,00014
2 dny	destilovaná voda	0,0000656 ± 0,0000033	0,0000300 ± 0,0000020	0,00917 ± 0,00014
	fyzilogický roztok	0,0000913 ± 0,0000046	0,0000401 ± 0,0000016	0,00403 ± 0,00061
4 dny	destilovaná voda	0,0000965 ± 0,0000027	0,0000469 ± 0,0000019	0,00763 ± 0,00011
	fyzilogický roztok	0,0000556 ± 0,0000010	0,0000376 ± 0,0000021	0,00157 ± 0,00000

Příloha 3 Množství uvolněného ibuprofenu z PHB krytů s obsahem liposomů

doba uvolňování	prostředí	množství uvolněného ibuprofenu [mg/ml]		
		kryt č. 1	kryt č. 2	kryt č. 3
30 minut	destilovaná voda	/	0,7681 ± 0,0091	0,0224 ± 0,0011
	fyziologický roztok	/	0,6300 ± 0,0058	0,0228 ± 0,0006
1 hodina	destilovaná voda	/	0,2112 ± 0,0032	0,0213 ± 0,0007
	fyziologický roztok	/	0,1524 ± 0,0023	0,0214 ± 0,0007
2 hodiny	destilovaná voda	/	0,1994 ± 0,0030	0,0211 ± 0,0006
	fyziologický roztok	/	0,1862 ± 0,0028	0,0215 ± 0,0008
6 hodin	destilovaná voda	/	0,0647 ± 0,0010	0,0212 ± 0,0001
	fyziologický roztok	/	0,0594 ± 0,0009	0,0212 ± 0,0004
24 hodin	destilovaná voda	/	0,1792 ± 0,0027	0,0211 ± 0,0009
	fyziologický roztok	/	0,5328 ± 0,0080	0,0213 ± 0,0010
2 dny	destilovaná voda	/	0,5238 ± 0,0079	0,0210 ± 0,0009
	fyziologický roztok	/	0,5328 ± 0,0080	0,0209 ± 0,0005
4 dny	destilovaná voda	/	0,0191 ± 0,0003	0,0208 ± 0,0007
	fyziologický roztok	/	1,0121 ± 0,0052	0,0210 ± 0,0009

Příloha 4 Množství uvolněného ampicilinu ze želatinových krytů s obsahem liposomů, 1. část tabulky (ND – nedetekováno)

doba uvolňování	prostředí	množství uvolněného ampicilinu [mg/ml]		
		kryt č. 4	kryt č. 5	kryt č. 6
30 minut	destilovaná voda	0,0000402 ± 0,0000010	ND	0,0002390 ± 0,0000087
	fyziologický roztok	0,0000536 ± 0,0000013	ND	0,0001838 ± 0,0000067
1 hodina	destilovaná voda	0,0000391 ± 0,0000010	ND	0,0001646 ± 0,0000060
	fyziologický roztok	0,0000316 ± 0,0000008	0,0000416 ± 0,0000012	0,0000494 ± 0,0000018
2 hodiny	destilovaná voda	0,0000526 ± 0,0000013	0,0000364 ± 0,0000011	ND
	fyziologický roztok	0,0000432 ± 0,0000011	ND	0,0000568 ± 0,0000021
6 hodin	destilovaná voda	0,0000424 ± 0,0000010	0,0000607 ± 0,0000018	0,0000150 ± 0,0000005
	fyziologický roztok	0,0000324 ± 0,0000008	ND	ND
24 hodin	destilovaná voda	ND	ND	ND
	fyziologický roztok	0,0000597 ± 0,0000015	ND	ND
2 dny	destilovaná voda	0,0000479 ± 0,0000012	ND	ND
	fyziologický roztok	0,0000392 ± 0,0000010	ND	ND
4 dny	destilovaná voda	ND	ND	ND
	fyziologický roztok	0,0000289 ± 0,0000007	ND	ND

Příloha 5 Množství uvolněného ampicilinu ze želatinových krytů s obsahem liposomů; 2. část tabulky (ND – nedetekováno)

doba uvolňování	prostředí	množství uvolněného ampicilinu [mg/ml]		
		kryt č. 7	kryt č. 8	kryt č. 9
30 minut	destilovaná voda	ND	0,00305 ± 0,00008	0,00740 ± 0,00020
	fyziologický roztok	0,000056 ± 0,0000024	0,00645 ± 0,00016	ND
1 hodina	destilovaná voda	0,0001067 ± 0,0000046	0,00661 ± 0,00017	0,00420 ± 0,00011
	fyziologický roztok	0,0000667 ± 0,0000029	0,00535 ± 0,00014	0,01091 ± 0,00003
2 hodiny	destilovaná voda	0,0001023 ± 0,0000044	0,00611 ± 0,00016	0,00266 ± 0,00007
	fyziologický roztok	ND	0,00749 ± 0,00020	0,00352 ± 0,00010
6 hodin	destilovaná voda	ND	0,00280 ± 0,00007	0,00192 ± 0,00005
	fyziologický roztok	ND	0,00234 ± 0,00006	0,00060 ± 0,00002
24 hodin	destilovaná voda	ND	0,00528 ± 0,00014	0,00194 ± 0,00005
	fyziologický roztok	ND	0,00989 ± 0,00025	0,00401 ± 0,00011
2 dny	destilovaná voda	ND	0,00435 ± 0,00011	0,00210 ± 0,00006
	fyziologický roztok	ND	0,00590 ± 0,00013	0,00134 ± 0,00004
4 dny	destilovaná voda	0,0000318 ± 0,0000014	ND	ND
	fyziologický roztok	ND	ND	ND

Příloha 6 Množství uvolněného ibuprofenu ze želatinových krytů s obsahem liposomů

doba uvolňování	prostředí	množství uvolněného ibuprofenu [mg/ml]			
		kryt č. 6	kryt č. 7	kryt č. 8	kryt č. 9
30 minut	destilovaná voda	6,08 ± 0,22	6,50 ± 0,20	0,0233 ± 0,0010	0,0247 ± 0,0011
	fyziologický roztok	6,30 ± 0,23	6,34 ± 0,11	0,0214 ± 0,0009	0,0231 ± 0,0011
1 hodina	destilovaná voda	6,95 ± 0,25	6,58 ± 0,00	0,0218 ± 0,0001	0,0222 ± 0,0001
	fyziologický roztok	6,12 ± 0,12	6,06 ± 0,09	0,0220 ± 0,0011	0,0219 ± 0,0012
2 hodiny	destilovaná voda	6,45 ± 0,09	5,72 ± 0,11	0,0213 ± 0,0012	0,0214 ± 0,0013
	fyziologický roztok	5,69 ± 0,23	5,56 ± 0,17	0,0258 ± 0,0010	0,0214 ± 0,0010
6 hodin	destilovaná voda	6,00 ± 0,01	5,38 ± 0,01	0,0217 ± 0,0010	0,0246 ± 0,0010
	fyziologický roztok	5,44 ± 0,01	6,37 ± 0,02	0,0256 ± 0,0003	0,0225 ± 0,0010
24 hodin	destilovaná voda	5,44 ± 0,20	6,12 ± 0,10	0,0279 ± 0,0015	0,0225 ± 0,0002
	fyziologický roztok	5,41 ± 0,19	5,42 ± 0,01	0,0225 ± 0,0002	0,0209 ± 0,0003
2 dny	destilovaná voda	5,61 ± 0,02	6,46 ± 0,20	0,0292 ± 0,0027	0,0219 ± 0,0006
	fyziologický roztok	5,40 ± 0,02	6,02 ± 0,01	0,0282 ± 0,0001	0,0216 ± 0,0012
4 dny	destilovaná voda	5,45 ± 0,10	5,15 ± 0,06	0,0241 ± 0,0010	0,0213 ± 0,0018
	fyziologický roztok	5,43 ± 0,12	5,50 ± 0,07	0,0215 ± 0,0011	0,0210 ± 0,0017