



**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

**STUDIUM TOXICITY ANTIMIKROBIÁLNÍCH KRYTŮ  
RAN A PERSPEKTIVNÍCH NOVÝCH  
NANOMATERIÁLŮ**

TOXICITY STUDY OF ANTIMICROBIAL WOUND DRESSINGS AND PERSPECTIVE NOVEL  
NANOMATERIALS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Hana Kozlíčková

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.

**BRNO 2022**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1671/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Hana Kozlíčková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Studium toxicity antimikrobiálních krytů ran a perspektivních nových nanomateriálů

### Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je vyhodnotit toxicitu komerčně dostupných i laboratorně připravených antimikrobiálních krytů ran. Pro přípravu nových antimikrobiálních krytů budou použity polykaprolaktonové nanovláčkové membrány modifikované tenkými vrstvami kovů.

1. Zpracujte rešerši antimikrobiálních krytů ran dostupných na trhu a povrchových antimikrobiálních modifikací popsaných ve vědecké literatuře, popište mechanismy antimikrobiálních účinků.
2. Zaměřte se na antimikrobiální účinky tenkých kovových vrstev (včetně směsi dvou kovů) a připravte takové vrstvy na polykaprolaktonové nanovláčkové membrány.
3. Charakterizujte upravené membrány z hlediska morfologie, chemického složení a stability ve vodném prostředí.
4. Otestujte cytotoxicitu vybraných komerčních a nově připravených krytů ran.
5. Srovnajte antimikrobiální účinky vybraných komerčních a nově připravených krytů ran.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 27. 5. 2022:

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

-----  
Hana Kozlíčková  
Studentka

-----  
doc. Mgr. Lenka Zajíčková, 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 bakalářská práce se zabývá studiem toxicity vybraných komerčních antimikrobiálních krytů ran (StopBac STERILE, obsahující ionty stříbra a Traumacel Biodress Disinfect, obsahující chlorhexidin) a antimikrobiálního nanomateriálu, poskytnutého laboratořemi CEITEC VUT Brno. V experimentální části práce je popsána příprava tohoto polycaprolaktonového nanomateriálu, na který byla následně deponována vrstva mědi magnetronovým naprašovacím systémem BESTEC (MAGNETRON). Dále byla navržena metoda pro studium cytotoxicity jednotlivých krytů s antimikrobiálními přísadami. Tyto testy byly prováděny *in vitro* na buněčných kulturách metodou luhování materiálů v laboratořích Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Zjistili jsme, že s výjimkou chlorhexidinu, nízké koncentrace účinných látek vyluhovaných z materiálů podporovaly proliferaci studovaných buněk, při vysokých koncentracích docházelo i k cytotoxickým efektům. Byla provedena i analýza jednotlivých materiálů pomocí rastrovací elektronové mikroskopie a energeticky disperzní rentgenové spektroskopie.

## ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of toxicity of selected commercial antimicrobial wound dressings (StopBac STERILE, containing silver ions and Traumacel Biodress Disinfect, containing chlorhexidine) and antimicrobial nanomaterial, provided by CEITEC BUT laboratories. The experimental part of the work describes the preparation of this polycaprolactone nanomaterial, on which a layer of copper was subsequently deposited by the magnetron sputtering system BESTEC (MAGNETRON). Furthermore, a method was designed to study the cytotoxicity of individual shelters with antimicrobial additives. These tests were performed *in vitro* on cell cultures by leaching the materials in the laboratories of the Faculty of Science, Masaryk University in Brno. We found that, with the exception of chlorhexidine, low concentrations of active substances extracted from the materials promoted the proliferation of the studied cells, while at high concentrations there were also cytotoxic effects. The analysis of individual materials was also performed using scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Nanovlákná, elektrostatické zvlákňování, rány, stříbro, měď, antimikrobiální látky, rastrovací elektronová mikroskopie, disperzní rentgenová spektroskopie.

## KEYWORDS

Nanofibres, electrospinning, wounds, silver, copper, antimicrobials, scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy.

KOZLÍČKOVÁ, Hana. *Studium toxicity antimikrobiálních krytů ran a perspektivních nových nanomateriálů* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138937>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Lenka Zajíčková.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto děkuji vedoucí této bakalářské práce doc. Mgr. Lence Zajíčkové, Ph.D. za odborné vedení, přátelský přístup a poskytnutí cenných rad při zpracovávání této bakalářské práce. Dále děkuji konzultantovi této bakalářské práce prof. RNDr. Františkovi Krčmovi, Ph.D. dále Mgr. Evě Dvořákové, Ph.D., Mgr. Jiřině Medalové, Ph.D. a Ing. Lucii Blahové, Ph.D. za ochotu, podporu a cenné rady při zpracovávání této práce.

Děkuji také Výzkumné infrastruktuře CzechNanoLab LM2018110 za umožnění exkurze a provedení experimentu depozice Cu na PCL nanovlákná v laboratořích CEITEC Brno a Oddělení fyziologie a imunologie živočichů za poskytnutí prostoru a materiálu pro biologické experimenty a Mgr. Petře Křížkové za technickou podporu.

# Obsah

1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	7
2.1 Kůže.....	7
2.2 Obecná definice poranění .....	8
2.3 Klasifikace ran .....	8
2.4 Proces hojení ran.....	8
2.5 Špatně se hojící rány .....	9
2.6 Polymerní nanovlákná a mikrovlákná.....	11
2.7 Polykaprolakton .....	12
2.8 Vrstvy nanomateriálů obsahující látky podporující léčbu .....	13
2.9 Komerční kryty ran.....	18
2.10 Použité metody .....	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
3.1 Příprava nanomateriálů s přídavkem mědi.....	28
3.2 Analýza materiálů pomocí SEM a EDX.....	29
3.3 Kultivace buněk a testování výluhů materiálů s antimikrobiálními přídavky.....	31
4. VÝSLEDKY A DISKUSE .....	37
4.1 SEM a EDX.....	37
4.2 Kultivace buněk s výluhy materiálů .....	41
5. ZÁVĚR .....	49
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	50

# 1. ÚVOD

Kůže jakožto prvotní bariéra chránící před vnějším prostředím je pro lidský život velice důležitá. Jakékoli narušení této bariéry může vést k vážným zdravotním komplikacím, případně i ke smrti. Proto je důležité neustále vyvíjet materiály, které by přispívaly k rychlejšímu a účinnějšímu hojení poranění kůže. Urychlení hojení může být jedním z klíčových faktorů pro předcházení případných komplikací.

Vývoj materiálů, které mohou pomoci k usnadnění hojení ran, se stal v nedávné době předmětem zájmu mnoha vědců a výzkumných ústavů. Užitečným pomocníkem při řešení těchto problémů se ukázala nanovláknina. Metoda jejich přípravy je již na poměrně dobré úrovni. K výhodám nanovláknin patří nízké výrobní náklady a snadné převedení z laboratorní do sériové výroby [1]. Mezi jeden z nejlepších polymerů, používaných pro výrobu nanovláknin, se řadí polykaprolakton. Použití tohoto polymeru je výhodné pro jeho relativně nízkou cenu, dobré mechanické vlastnosti a netoxičnost [2]. Tento materiál je rovněž vhodný pro elektrostatické zvlákňování. Tato vlákna jsou ideálním podkladem pro další úpravu antimikrobiálními látkami, které mohou zlepšit jejich hojivý účinek.

Pro rychlejší a účinnější hojení jsou na podklady přidávány různé látky podporující léčbu. Při hojení rány může být velkým problémem infekce způsobená různými patogenními mikroorganismy. Tyto mikroorganismy začínají způsobovat vědcům obavy z důvodu jejich narůstající rezistence vůči běžně používaným dezinfekcím či antibiotikům. Ve vědeckém světě je proto viditelná snaha o vývoj nových látek, které by byly schopny tyto mikroorganismy účinně ničit [3] [4].

Mezi zkoumané antimikrobiální látky patří například stříbro, měď nebo lignin. Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem má stříbro jako ušlechtilý kov při vývoji účinných hojivých krytů ran velký potenciál. Jeho antimikrobiální účinek spočívá v elektrostatické interakci stříbrného iontu s bakteriální membránou, což způsobí její zánik [3] [4]. Další studovanou látkou je měď. Měď je pro lidský organismus nezbytnou látkou ovlivňující mnoho enzymů i chemických reakcí [5]. V poslední době se ukázala i jako účinná antimikrobiální látka pro léčbu ran v kombinaci s vhodným podkladem. Je důležité zmínit i antimikrobiální účinky ligninu. Lignin je známý pro své výborné účinky proti bakteriím, plísním a virovým patogenům [6] [7]. Mezi výhody použití ligninu patří jeho dobrá kompatibilita s jinými chemickými látkami [8].

Nebezpečím použití těchto látek je jejich případná cytotoxicita pro buňky, tkáň a orgány. Toxicita stříbrných iontů byla do jisté míry prokázána. V rámci EU bylo proto zakázáno vnitřní užívání koloidního stříbra [3] [4]. Toxické účinky mědi nejsou příliš vysoké. Avšak i v tomto případě je nutná obezřetnost. Nadměrné užívání mědi může způsobovat buněčnou smrt [5]. U ligninu byly zjištěny cytotoxické účinky při nadměrné expozici [8]. U všech těchto látek je tedy před samotným zahájením léčby nutné provést testy cytotoxicity a zvolit ideální ředění látky v médiu či jiné látce.

Cílem této práce je popsat komerčně prodávané antimikrobiální kryty ran a jejich účinek, dále popsat antimikrobiální účinky tenkých kovových vrstev a zaměřit se na jejich toxicitu. Teoretická část popisuje problematiku špatně se hojících ran, proces hojení ran, výrobu polymerních nanovláknin a v neposlední řadě se zabývá materiály, které obsahují léčbu podporující látky, jako je například měď nebo stříbro. Práce poukazuje na některé materiály používané jako obvazové kryty, jejich výrobu a zhodnocuje účinek látek urychlujících hojení. Nejprve je v experimentální části práce provedena analýza vzorků materiálů pomocí rastrovací elektronové mikroskopie a energeticky disperzní rentgenové spektroskopie. Dále je v experimentální části práce navržena metoda testování toxicity materiálů obohacených o měď, stříbro a chlorhexidin. Pomocí metody testování toxicity materiálů jsou v experimentální části otestovány dva komerčně prodávané obvazové mikromateriálové kryty (konkrétně StopBac sterile, obsahující ionty stříbra a Traumacel Biodress Disinfect, obsahující chlorhexidin) a nanomateriál obohacený o měď, připravený magnetronovým naprašováním v laboratořích CEITEC Nano v Brně.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

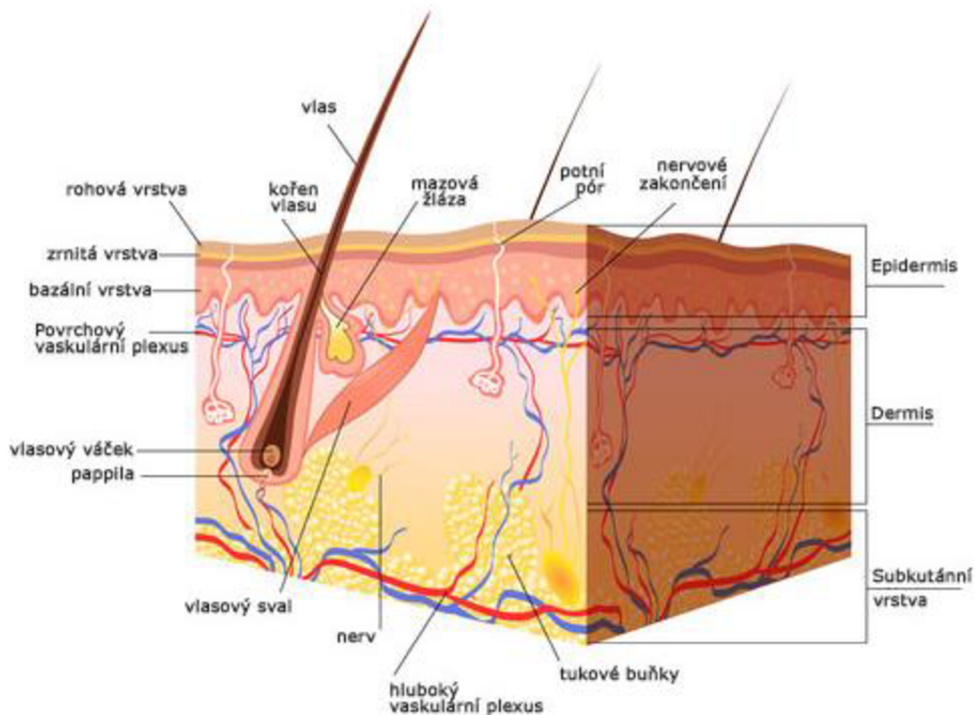
### 2.1 Kůže

Kůže je nepostradatelnou bariérou mezi vnějším a vnitřním prostředím organismu. Má řadu významných funkcí, jako je například mechanická ochrana. Je také sídlem kožních smyslů (hmat, vnímání tepla a chladu). Je důležitá při termoregulaci, látkové výměně a brání organismus před bakteriemi a plísněmi [9] [10].

Kůže se skládá ze tří základních vrstev: pokožka (epidermis), škára (dermis) a podkožní vazivo (obrázek 1). Pokožka tvoří povrchovou vrstvu kůže. Tvoří ji tlustý, mnohvrstevný dlaždicový epitel, jehož buňky se nazývají keratinocyty. V pokožce se nachází další důležité buňky: například melanocyty, určující odstín kůže, Langerhansovy buňky, uplatňující se při imunitních dějích nebo fibroblasty, schopné vytvářet všechny typy vláknité i amorfni mezibuněčné hmoty [9] [10].

Další vrstvou kůže je škára. Jedná se o 1–3 mm silnou vrstvu, tvořenou tuhým vazivem. Tato vrstva je bohatě protkána elastickými a kolagenními vlákny. Škára je také velice dobře zásobena cévami. Jsou zde také uloženy folikuly vlasů, chlupů, potní žlázy a nervová zakončení [9] [10].

Poslední vrstvou kůže je podkožní vazivo, které je tvořeno řídkým kolagenním vazivem. Je tlusté 0,5 – 10 cm, dle množství tukové tkáně. Jeho hlavní funkcí je mechanická a tepelná izolace organismu a v neposlední řadě funguje také jako zásobárna energie [9] [10].



Obrázek 1: Stavba kůže [11]

## 2.2 Obecná definice poranění

Jako primární fyzická bariéra těla proti vnějšímu světu je pokožka pravidelně vystavována vlivům okolí, a proto u ní hrozí různé druhy poranění. Ránu lze obecně definovat jako poškození nebo přerušení normální anatomické struktury kůže po fyzickém, tepelném či například chemickém úrazu nebo v důsledku lékařského zásahu. U zdravých jedinců jsou běžné kožní rány obvykle méně než 1 mm hluboké a mají schopnost spontánní regenerace. Rány, které zasahují do hlubší vrstvy dermis se však hojí pomalu a často s jizvami, což vede k trvalému poškození struktury, funkce a vzhledu pokožky [12] [13].

Doba hojení akutní rány se obvykle pohybuje v rozmezí od 5 do 30 dnů. Oproti tomu chronické rány neprocházejí procesem hojení normálním tempem, proces obnovení anatomické a funkční integrity pokožky trvá u chronické rány až 12 týdnů. Léčba chronických kožních lézí stále představuje velkou výzvu, a proto je možností urychlení jejich hojení věnována značná pozornost [12] [13].

## 2.3 Klasifikace ran

Rány můžeme rozdělit do několika tříd:

- podle hloubky (povrchové a hluboké)
- podle míry postižení (jednoduché, poškozující jen povrchové vrstvy kůže, podkožního vaziva nebo jen sliznici a rány komplikované, postihující důležité struktury jako jsou cévy, nervy, šlachy a podobně)
- podle míry znečištění (aseptické, makroskopicky čisté, mechanicky znečištěné a infikované)
- podle příčiny zranění [14].

## 2.4 Proces hojení ran

Hojení ran zahrnuje složité interakce mezi různými typy buněk, koagulačními faktory, pojivovou tkání, růstovými faktory, cytokiny a cévním systémem. Obecně platí, že proces hojení ran lze rozdělit do čtyř fází, znázorněných na obrázku 2 [15].

### *První fáze: hemostáza*

Během prvních několika minut po zranění dojde k vazokonstrikci a krevní destičky se začnou shlukovat v místě poranění. To má za následek aktivaci koagulační kaskády, která vede k vytvoření polymerní molekuly fibrinu, která vytvoří síť, do které se zachycují další krvinky, jak bílé, tak červené. Výsledná sraženina pak slouží jako těsnění rány a brání dalšímu krvácení [15].

### *Druhá fáze: zánět*

Jakmile je dosaženo hemostázy, cévy se rozšíří, aby umožnily buňkám, proteinům a živinám dostat se na místo zranění. Převládajícími buňkami, které zde pracují, jsou monocyty postupně diferencované v makrofágy, které autolyzují nekrotickou tkáň. Makrofágy spolu s neutrofily produkují cytokiny, které do místa rány přilákají lymfocyty, které usměrňují zánětlivou reakci [15].

### *Třetí fáze: proliferace*

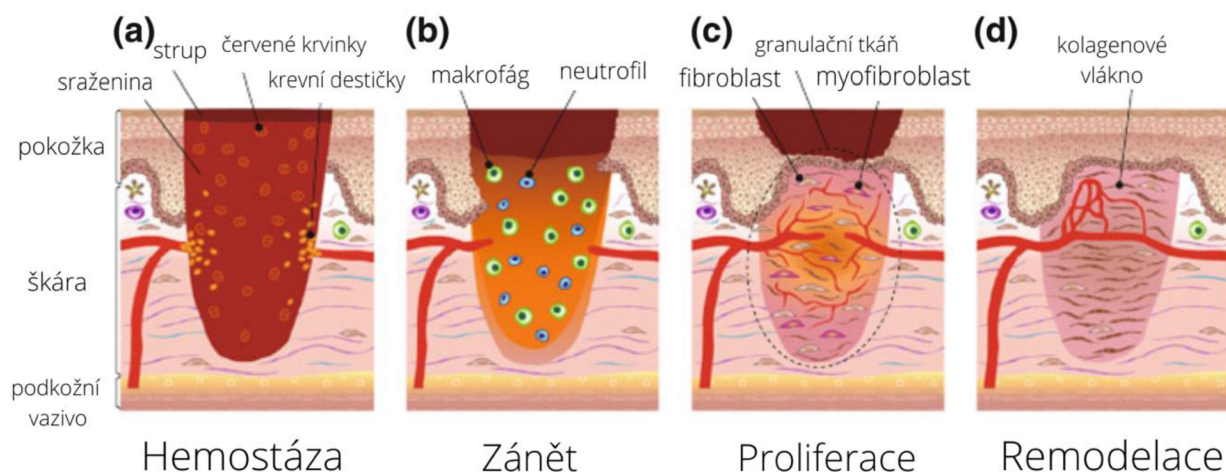
Rána je naplněna novou granulační tkání, která se skládá z extracelulární matrix (kolagen atd.). Vyvíjí se v ní nová síť krevních cév a buněk [15].

### *Čtvrtá fáze: remodelace*

Následuje závěrečná fáze, která nastává, jakmile je rána uzavřená – dochází k remodelaci kolagenu [16] [17].

Nesprávné provedení kteréhokoli z výše uvedených kroků může kriticky ovlivnit proces hojení ran a jeho úspěch [16] [17].





Obrázek 2: Fáze hojení rány. Převzato a upraveno z [18]

Proces hojení ran je obecně komplikován mnoha faktory, například přítomností ischemie, infekce, nekrotické tkáně nebo také průběhem onemocnění jako je cukrovka, rakovina, chronická onemocnění, steroidní terapie, ozařování a podvýživa. Kombinace těchto faktorů je pro vývoj hojení zranění zásadní [19].

Léčbu poranění a předcházení těmto komplikacím zprostředkovávají například výrobky regenerativní medicíny. Používá se například gel obsahující autologní/homologní plazmu bohatou na krevní destičky. Cytokiny a růstové faktory obsažené v plazmě hrají klíčovou roli v procesu hojení, kdy mohou například pomoci uzavřít ránu. Účinnost tohoto gelu byla již prokázána na modelech *in vitro* i *in vivo*. Tento gel se podílí i na regeneraci a tvorbě tkání nových cév, které by mohly zlepšit hojení kožních ran [19].

Pro lepší osvětlení a pochopení této tematiky se pro demonstraci používají anatomicky jednoduchá zvířata. Během několika posledních desetiletí bylo provedeno mnoho výzkumu na základě studia háďátka obecného, octomilky a zebřičky pruhované. Háďátko obecné je rozvíjející se modelový organismus v kontextu regenerativní medicíny. Vědci na tomto jednoduchém zvířeti zjistili například to, že poranění indukuje produkci gradientu  $H_2O_2$  závislého na  $Ca^{2+}$  duální oxidáze (DUOX), což vede k rychlému povolání leukocytů do místa rány [17].

## 2.5 Špatně se hojící rány

První pokusy o léčbu zranění pomocí bylinných přípravků sahají asi pět tisíc let zpět do minulosti, kdy si první lovci a sběrači ošetřovali svá zranění. Snažili se o objevení byliny, která by urychlila proces hojení. Později v historii došlo k vývoji obvazových krytí a šití ran. Lidé si uvědomovali nutnost hygieny a nutnost zastavení krvácení při zranění. Za posledních sto let však nedošlo k velkému vývoji v oblasti urychlování hojení ran. Došlo alespoň k zavedení antibiotik a k vývoji tkáňového inženýrství [16] [17] [20].

Obecně je oprava měkkých tkání velice náročný a citlivý proces. Skládá se z několika základních kroků, blíže popsanych v předchozí kapitole. Nedokonalé provedení jakéhokoli z těchto kroků může vést k vážným komplikacím, jako je například infekce [16] [17] [20].

Jedním ze závažných a špatně se hojících poranění je popálenina. Primárním cílem léčby popálenin je podpora a zlepšení účinnosti hojení rány a uzavírání ran procesem epitelizace. Při léčbě těžkých popálenin je nejdříve nutné odstranit nekrotickou tkáň. Následně je léčba popáleniny založena především na prevenci infekce. Teoreticky by tedy prvním krokem léčby mělo být vytvoření čistého lůžka rány. V posledních dvaceti letech dochází velice často k odstraňování nekrotické tkáně popáleniny pomocí enzymů, jako je trypsin, kolagenáza a některými dalšími proteázami místo klasického chirurgického zákroku. Některé studie ukazují, že tento postup je mnohem účinnější a výsledné zotavení rány je mnohem lepší než po chirurgickém zákroku [21].

Další skupinou pacientů trpící problematickým hojením ran jsou lidé postižení onemocněním diabetes mellitus. Tito pacienti mají horší prognózu při hojení infekcí než zdraví pacienti. Proces hojení je delší, déle trvá i případné užívání antibiotik, infekce jsou opakované a může docházet i k amputacím. Hlavním důvodem vředů a ran u pacientů s diabetem je to, že kmenové buňky se hůře dostávají do místa postižení, což bohužel vede k pomalému hojení a následně k chronickým ranám, které snižují kvalitu života. Tyto komplikace jsou způsobeny největším problémem pacientů s diabetem, což je chronická žilní nedostatečnost neboli insuficience. Jedná se o patofyziologický stav, při kterém jsou porušeny mechanismy návratu žilní krve z dolních končetin k srdci, výsledkem je zvýšený žilní tlak v dolních končetinách, což se projevuje zpočátku jen nepříjemnými příznaky, jakými jsou pocit tíhy v nohou, únava nohou, pocit napětí, noční křeče, brnění a jiné další nepříjemné pocity. Postupně dochází k přenosu žilního přetlaku i do malých cév a kapilár, což má za následek vznik otoku nohou, později i zhoršenou výživu kůže, přibývání pigmentací kůže, její oslabování a špatné hojení až po vznik bérceových vředů žilního původu. Mezi další problémy diabetiků patří neuropatie – necitlivost kůže, náchylnost k infekci, riziko lokálního opakování a sklon ke zhoršování. Proto je klíčovým faktorem předcházejícím případné amputaci čas. Důležitá je také pravidelná výměna obvazových krytí pro předcházení infekce. Používanými obvazovými kryty jsou například Apligraf®, který zahrnuje dermální vrstvu lidských neonatálních fibroblastů typu I a Dermagraft®, který je generován kultivací lidských neonatálních fibroblastů na biologicky vstřebatelný polyglaktinový nosič. Použití těchto krytí není ovšem schváleno na rány s odhaleným svalem, šlachou nebo kostí. Navíc podíl pacientů pozitivně reagujících na tato krytí je relativně malý (56 % pro Apligraf® a 30 % pro Dermagraft®) [22] [23].

Velký problém s hojením ran mají také pacienti trpící nemocí motýlích křídel neboli Epidermolysis bullosa congenita (EBC). Jedná se o mechanobulózní onemocnění charakterizované křehkostí kůže, vysokou náchylností k tvorbě puchýřů a v neposlední řadě také tvorbou ran i po malém stresu kůže. Toto onemocnění je způsobeno mutacemi v genu Col7A1, které vede k nedostatku nebo dysfunkci kolagenu typu VII (Col7). Oddělování vrstev kůže vede často k rozvoji lézí od kožních puchýřů po chronické rány. Kožní rány jsou často spojovány s četnými komplikacemi, včetně bolesti a svědění, infekce, sepse, dehydratace a rozsáhlých vředů na nohou. U těchto pacientů se rány nejčastěji vyskytují v místech největšího mechanického namáhání, jako jsou kolena, chodidla, ruce a lokty. Rány jsou často napadené patogenními bakteriemi, což vede k tvorbě nadměrného zánětu a k omezení hojení [24].

K léčbě poranění jsou využívána různá obvazová krytí. Jedním z nejlepších obvazových krytí jsou nanovláknenné struktury nesoucí různé enzymy a léčbu podporující látky [13]. Struktura těchto nanomateriálu je velice účinná při výměně obvazů, předchází dalšímu zranění a zajišťuje kontrolu nad vlhkostí rány. Póry nanovláken přitom nejsou dostatečně velké na to, aby docházelo k přenosu bakterií do rány. Takto připravené materiály také podporují epitelizaci a angiogenezi [21].

Další možností léčby představuje léčba kmenovými buňkami. Účinnost terapie kmenovými buňkami je primárně přičítána schopnosti sebeobnovy kmenových buněk, jejich parakrinním a imunomodulačním procesům a schopnost jejich diferenciaci, čímž se podílejí na remodelaci tkáně [23] [24].

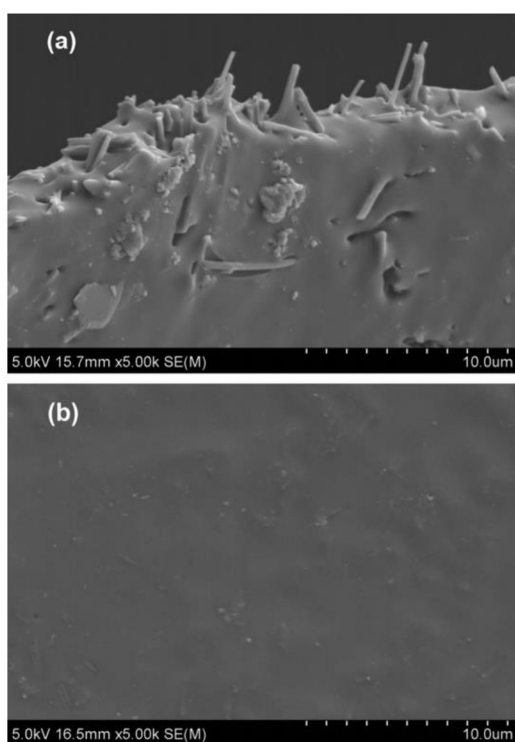
Bohužel díky komplikacím spojeným s hojením ran dochází i v současnosti k vysoké míře nemocnosti a úmrtnosti, proto je důležitý další výzkum a vývoj, aby případné nové druhy krytí ran byly dokonalejší a účinnější.

## 2.6 Polymerní nanovláknna a mikrovlákna

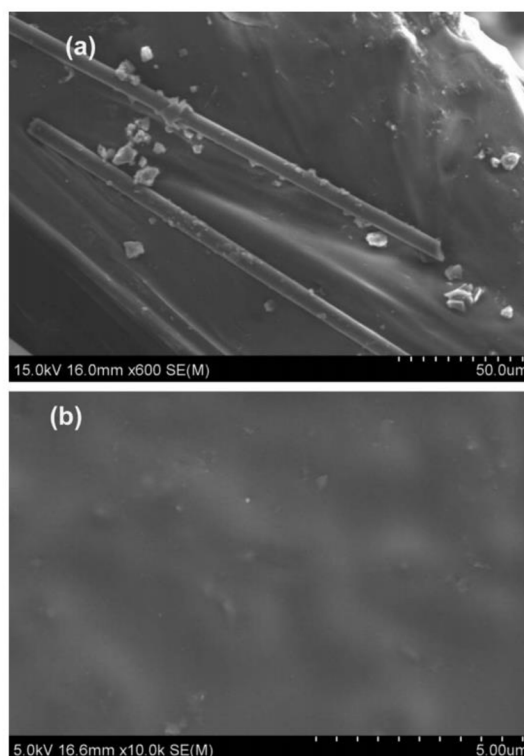
Obecně je nanovláknno útvar o velmi malém průměru, konkrétně do průměru jeden mikrometr. Nanovláknenné materiály představují velmi zajímavé struktury s jedinečnými vlastnostmi (obrázek 3). Mají vysokou poréznost (řádově tisícnásobnou oproti mikrovláknku), velký specifický povrch a dobrou prodyšnost. Dle použitého materiálu mohou vykazovat optimální mechanické vlastnosti, biokompatibilitu a biologickou rozložitelnost. Tyto vlastnosti jsou pro regeneraci kostí a tkáňové inženýrství klíčové. Nanovláknenné membrány jsou se svými jedinečnými fyzikálněchemickými vlastnostmi schopné napodobovat extracelulární matrix. Podle složení, mají tato vlákna, různou mechanickou a teplotní stabilitu, ale také elektrickou vodivost a katalytickou aktivitu. V praxi se nanovláknna téměř nevyskytují samostatná, ale většinou v podobě vyšších strukturních a prostorových celků [25] [26] [27].

Mikrovlákno je útvar o průměru menším než jeden milimetr. Výrobky z mikrovláken jsou velice měkké a jemné, na druhou stranu jsou tyto výrobky ale velice pevné (obrázek 4). Nejběžnější materiály používané pro výrobu mikrovláken jsou polyestery a polyamidy. Jednou ze zvláštních vlastností mikrovláken je, že některé z nich mají hvězdicovitý tvar průřezu [28].

V současné době je na trhu s obvazovými krytinami mnoho produktů, které ránu sice kryjí, ale nepodporují obnovení původní struktury či funkcí kůže. Z tohoto důvodu vědci v současné době vyvíjejí nové obvazy, které napomáhají zlepšit regeneraci pokožky. Jsou mezi nimi i polymerní nanovláknna, která jsou považována za slibný nástroj pro zlepšení regenerace kůže díky své strukturální podobnosti s extracelulární matrix normální pokožky, schopností podporovat růst a proliferaci buněk. V poslední době byly vyvinuty nové bioaktivní obvazy, které napodobují přirozenou strukturu pokožky a jsou kompatibilní s kůží. V závislosti na jejich schopnosti nahradit epidermis, dermis nebo obě vrstvy kůže jsou nazývány jako epidermální, dermální a epidermálně – dermální náhražky. Pozornost vědců upoutala především jednoduchost vytvořených bioaktivních obvazů a efektivnost nákladů. Kromě toho jsou tyto nanovláknenné sítě také schopné podporovat buněčnou adhezi, migraci, růst, diferenciaci i angiogenezi, které jsou životně důležité pro efektivní hojení ran [29].



Obrázek 3: Morfologie antistatického povlaku uhlíkových nanovláken: a) vzhled na lomu; b) vzhled na povrchu [28]



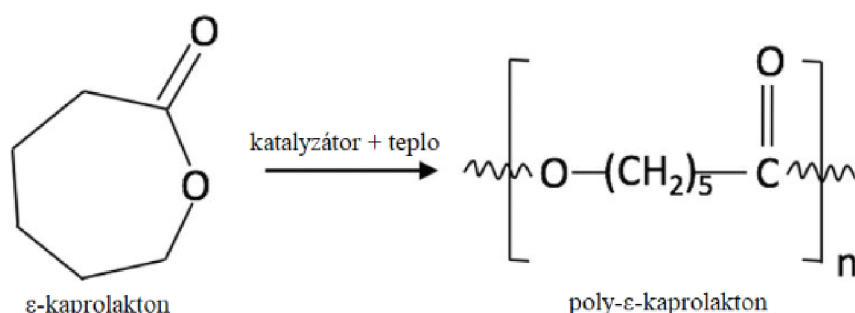
Obrázek 4: Morfologie antistatického povlaku uhlíkových mikrovláken: a) vzhled na lomu; b) vzhled na povrchu [28]

## 2.7 Polykaprolakton

Polykaprolakton (PCL, jehož vzorec je na obrázku 5) je semikrystalický alifatický polyester, který se obecně syntetizuje polymerací s otevřením kruhu monomeru kaprolaktonu. Je biologicky odbouratelný, biokompatibilní a netoxický. Z rodiny biodegradovatelných polymerů se PCL (a PLA neboli poly(lactic acid) – kyselina polymléčná) jeví jako nejatraktivnější a nejužitečnější pro obalové aplikace, protože jsou snadno dostupné, mají dobrou biologickou rozložitelnost a dobré mechanické vlastnosti. PCL vykazuje vynikající chemickou odolnost, dobrou houževnatost a má nízký skelný přechod ( $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a teplotu tání ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). PCL je tepelně stabilnější než PLA a je zcela odbouratelný prostřednictvím enzymatických aktivit. Vykazuje vynikající flexibilitu řetězce a může být syntetizován při různých molekulových hmotnostech ( $M_w$ ). Lze jej syntetizovat ve formě voskovité pevné látky nebo pevného polymeru. Při  $M_w$  15 000 g/mol je materiál křehký. Při  $M_w$  40 000 g/mol je materiál měkký a semikrystalický. Jako přísada se obvykle používá voskový PCL. Je rozpustný téměř ve všech aromatických, polárních a chlorovaných uhlovodících. Nerozpustný je v alifatických uhlovodících, alkoholech a glykolech. PCL vykazuje mechanické vlastnosti podobné vlastnostem jiných konvenčních nebibiodegradovatelných syntetických polymerů. Vysokomolekulární PCL má mechanické vlastnosti a propustnost pro kyslík srovnatelnou s polyethylenem (PE). PCL tedy není vhodný jako materiál pro kyslíkovou bariéru. Má pomalou rychlost degradace a vysokou permeabilitu, což je užitečné při aplikacích, jako jsou dlouhodobé implantáty a systémy podávání léků [30].

Díky své biologické rozložitelnosti, relativně nízké ceně, snadnému zpracování, dobrým mechanickým vlastnostem, netoxičnosti a nízké imunogenicitě je slibným polymerem pro tkáňové inženýrství. Kromě toho nanostrukturovaná morfologie PCL nanovláken, vytvořená elektrostatickým zvlákněním, vykazuje strukturní podobnost s fibrilární strukturou extracelulární matrix krevních cév. Za normálních podmínek vykazuje většina buněk hladkého svalstva cév ve zralých cévách diferencovaný kontraktilní fenotyp s nízkou rychlostí proliferace, migrace a produkce extracelulární matrix. Složitá morfologie PCL nanovláken by proto měla lépe napodobovat podmínky *in vivo*, než hladký povrch kultivačních misek z polystyrenu, které jsou široce používány pro experimenty *in vitro* [2].

Mikrocelulární pěny PCL se používají pro tkáňové inženýrství a buněčnou implantaci. Používají se také jako potenciální materiál pro aplikace kostního tkáňového inženýrství, kde jsou velmi důležité mechanické vlastnosti polymerů. Používá se jako změkčovadlo nebo jako hydrofobní činidlo pro zvýšení hydrofobity jiných biopolymerů. Dále se používá jako lepidlo v lékařství, pro snímání otisků v ortopedii a ve farmaceutickém průmyslu pro uvolňování léčiv. PCL byl také použit pro vývoj biokompozitů díky své biologické rozložitelnosti a biokompatibilitě [30].



Obrázek 5: Polymerace kaprolaktonu [31]

## 2.8 Vrstvy nanomateriálů obsahující látky podporující léčbu

Potřeba lepšího hojení ran přináší nové výzvy pro vývoj cenově dostupných a účinných antimikrobiálních materiálů, které by měly být ekologické a absolutně netoxické pro člověka. Předpokládá se, že bioaktivní nanomateriály mají díky své velikosti zlepšený dezinfekční účinek a umožňují úzkou interakci s bakteriálními membránami [3] [4].

V poslední době začíná být velkou obavou odolnost mikroorganismů vůči antibiotikům či dezinfekčním prostředkům. Anorganické baktericidy přitahují zvláštní pozornost díky své aktivitě, chemické stabilitě a tepelné odolnosti. Velké množství výzkumu je proto věnováno vyvíjení nových a účinných prostředků proti patogenním mikroorganismům. Rozvoj nanověd a nanotechnologií navíc představuje nové příležitosti pro zkoumání baktericidního účinku inovativních nanomateriálů obsahujících kovy s výraznou bioaktivitou, jako je například stříbro, měď nebo zinek [3] [4].

### Stříbro

Stříbro neboli *Argentum* (Ag) je ušlechtilý kov používaný pro své antimikrobiální účinky již od starověku. Dříve bylo stříbro využíváno především pro výrobu nádob k uchovávání potravin, jelikož zvyšovalo jejich trvanlivost. Od 20. století se stříbro využívalo jako lék na různé druhy infekcí, na ošetření popálenin či léčení kožních plísní a jiných onemocnění kůže nebo při dezinfekci pitné vody [3].

Nanočástice stříbra jsou jedním z nejatraktivnějších nanomateriálů v biomedicině díky jejich unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem. Požívají se hlavně pro své výborné antimikrobiální a protirakovinné vlastnosti, dále pro podporu hojení ran a kostí [3] [4].

Navzdory těmto terapeutickým výhodám existují u těchto nanočástic problémy s biologickou bezpečností jako je potenciální toxicita pro buňky, tkáně a orgány. Dlouhodobé celkové i lokální užívání může vést k ukládání stříbra a jeho solí do tkání. Výsledkem je nevratné šedomodré zabarvení – argyrie. Tyto nežádoucí účinky byly důvodem zákazu vnitřního užívání koloidního stříbra v rámci EU s platností od 1. 1. 2010 [3] [4].

Důležité je i studium inhibičních účinků stříbrných iontů na mikroorganismy. Antimikrobiální účinek nanočástic stříbra je dán jejich tvarem a velikostí. Čím menší jsou částice, tím vyšší je antibakteriální efekt. Některé studie uvádějí elektrostatickou interakci kladně nabitého stříbrného iontu a záporně nabitě buněčné membrány, která je klíčová pro zánik bakteriální buňky. Jiné studie uvádějí, že antimikrobiální aktivita stříbrných nanočástic na gram-negativní bakterie spočívá v koncentraci stříbrných nanočástic. Tyto studie popisují naakumulování nanočástic v buněčné stěně, což způsobí při určité koncentraci prasknutí buněčné stěny a buněčnou smrt [3] [4].

### Měď

Měď, latinsky *Cuprum* (Cu), je 26. nejrozšířenějším prvkem v zemské kůře. Člověkem je používána zhruba od roku 9000 př. n. l. a tato skutečnost z ní činí nejstarší používaný kov. Antiseptické účinky mědi byly rozpoznány různými kulturami již okolo roku 3000 př. n. l. a je o nich zmínka i v původních Hippokratových knihách a starověkých textech. První článek o antimikrobiálních účincích mědi byl v databázi Scopus vystaven v roce 1962, tedy o více než 30 let dříve než u stříbra a od té doby počet článků na toto téma neustále přibývá. Počet udělených patentů na antimikrobiální povlaky z mědi v posledních 20 letech také neustále roste [5].

Přesné mechanismy, kterými měď působí antimikrobiálně, nebyly dosud zcela objasněny. Na základě několika studií závisí mikrobicidní účinek mědi na několika faktorech, kterými jsou například fyzická forma (ionty nebo nanočástice), chemický stav (oxidační stav), koncentrace mědi v kontaktu s mikroby, vzdálenost mikrobů od povrchů obsahující měď, forma aplikace (mokrý nebo suchý), teplota aplikace a přítomnost pufrů, popř. kontaminantů v chemickém prostředí [5].

Hlavní mechanismus, kterým částice mědi ničí bakterie se nazývá depolarizace membrán. Metabolicky aktivní bakterie vykazují rozdíl elektrického potenciálu mezi vnitřní a vnější částí buňky ~100-200 mV (v závislosti na druhu bakterie), přičemž vnitřek buněk má nižší negativní potenciál. Měďnaté ionty se mohou vázat na negativně nabitě domény buněčné membrány bakterie. V důsledku navázání iontů mědi na buněčné membrány se snižuje membránový potenciál, což vede k depolarizaci membrány, která má za následek netěsnost membrány nebo dokonce prasknutí (pokud rozdíl potenciálů klesne na nulu). Rozsah poškození a membrány závisí především na morfologii bakterie [5].

Druhý mechanismus, kterým působí měď antimikrobiálně, se vyznačuje generováním reaktivních druhů kyslíku. Tento mechanismus je charakteristickým znakem nanočástic mědi, které byly internalizovány bakteriálními buňkami nebo nanočástic, které jsou navázány na bakteriální membránu. Rozsah tvorby reaktivních druhů kyslíku pomocí nanočástic mědi závisí především na oxidačním stavu mědi. I když ionty mědi mohou také generovat reaktivní druhy kyslíku, existují studie, tvrdící že rozsah tvorby reaktivních druhů kyslíku je v tomto případě obvykle mnohem nižší než u nanočástic mědi. Zvýšení intracelulárních reaktivních druhů kyslíku pomocí mědi se přičítá se především jeho schopnosti katalyzovat produkci hydroxylových radikálů. Další reaktivní druhy kyslíku mohou být vytvořeny radikálovou skupinou ze síry vzniklou při intracelulární redukci Cu(II) thiolu. Zvýšená hladina reaktivních druhů kyslíku vede k oxidativnímu poškození DNA a k peroxidaci lipidů v membránách [5].

Mimo silné antimikrobiální účinky je měď důležitá i ve stopovém množství pro růst mikroorganismů, protože se jedná o kofaktor pro mnoho enzymů. Dále je měď také nezbytná pro mnoho biochemických a fyziologických reakcí u savců (tělo dospělého člověka obsahuje přibližně 100 mg mědi). Doporučená denní dávka mědi určená Food and Nutrition Board at the National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine je 0,9 mg/d. Nadměrné množství může vést k redoxním reakcím Fentonova typu což má za následek oxidativní poškození buněk a buněčnou smrt [5].

Nitroděložní tělíska vyrobená z mědi jsou široce používána ženami jako účinná a dlouhodobá metoda antikoncepce a jsou klinicky považována za bezpečná, můžeme proto mluvit o tom, že toxicita mědi není vysoká. Nízké riziko toxicity pro buňky savců v kontaktu s mědí posiluje zájem o možném využití antimikrobiálních vlastností mědi [5].

## Chitosan

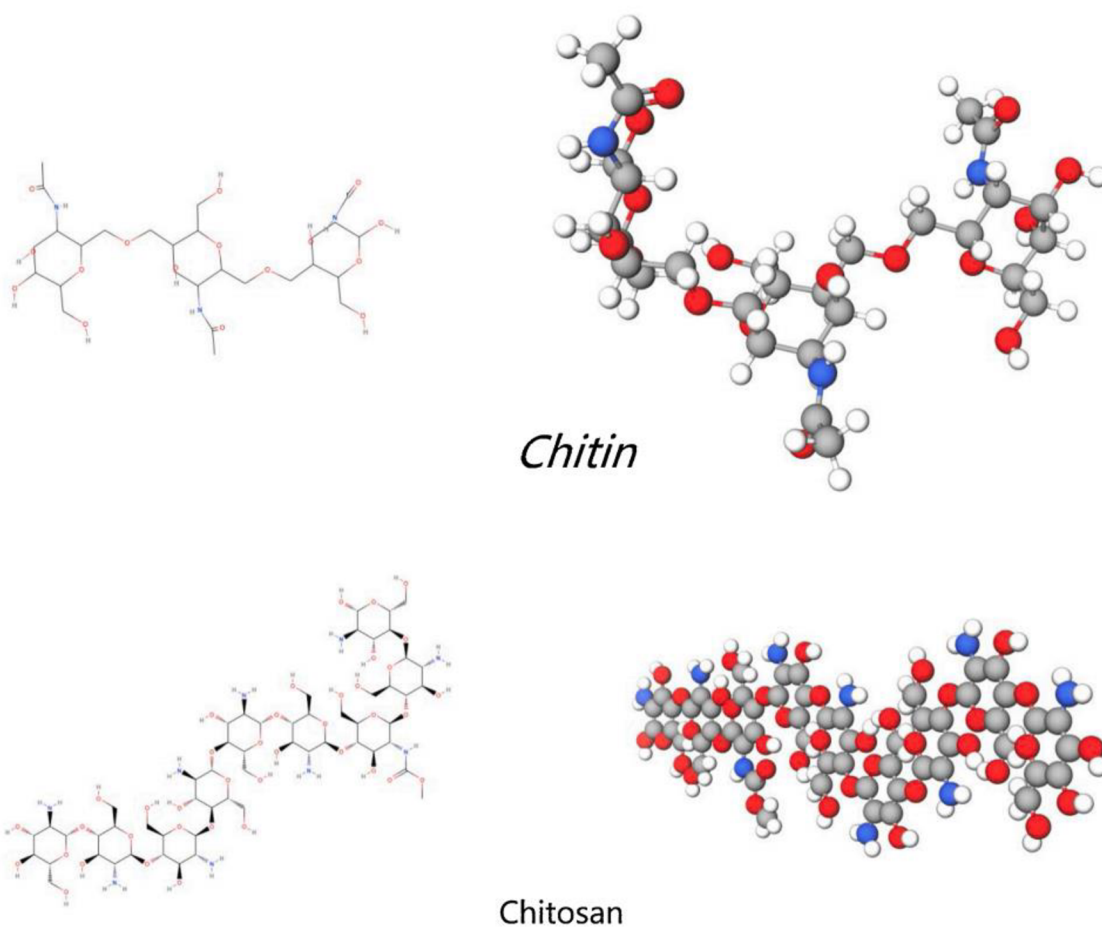
Chitosan je biokompatibilní a biologicky odbouratelný polymer, který má díky své struktuře značné možnosti pro chemickou a mechanickou modifikaci, využitelné zejména v biomedicínské oblasti. Nanomateriály na bázi chitosanu mají vynikající fyzikální a chemické vlastnosti, jako je pevnost v tahu, vodivost a fotoluminiscenční vlastnosti. Vzhledem k tomu, že hlavním zdrojem chitosanu jsou přírodní suroviny, lze výrobky na bázi chitosanu definovat jako přírodní [32] [33] [34].

Chitosan se získává z chitinu (obrázek 6) – jednoho z nejběžnějších organických materiálů, který je důležitou součástí exoskeletu zvířat, zejména korýšů, hmyzu a měkkýšů. Jedná se o lineární polymer konstruovaný z jednotek glukosaminu a N-acetylglukosaminu spojených  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) -glykosidickými vazbami [32] [33].

Díky své vysoké biokompatibilitě ho lze použít při hojení ran. Na rozdíl od většiny polysacharidů má pozitivní náboj a pH podobné jako u pokožky. Tyto vlastnosti mu umožňují interakci s povrchem kožních buněk (negativně nabitých). Chitosan může vytvářet povlaky zadržující vlhkost, jako jsou hydrogely, které pomáhají udržovat optimální vlhkost v postižených oblastech a přispívají k jejich následnému hojení. Hydrogely na bázi chitosanu se tvoří několika způsoby: fyzikálním spojením, koordinací s kovovými ionty nebo chemickým zesíťováním mezi chitosanem a zesíťovacím činidlem. Nerozpustné polymerní hydrogely se ve velkém měřítku používají pro výrobu obvazů. Mají významný potenciál v absorpci exsudátu z rány, regulují obsah vlhkosti a přenos kyslíku, pomáhají odstraňovat mrtvou tkáň a obnovovat pokožku. Hydrogely poskytují chladivý pocit, zmírňují bolest a minimalizují riziko infekce. Jejich průhlednost navíc umožňuje sledovat stav rány [33] [34].

Chitosan vykazuje antimikrobiální činnost vůči mnoha bakteriím (např. *Escherichia coli*). Antimikrobiální účinek funguje na principu kladně nabitých aminoskupin glukosaminových jednotek, které interagují se záporně nabitými komponentami mikrobiálních buněčných membrán. Tím se mění propustnost membrány, uniká intracelulární matrix a dochází k rozpadu buňky [35].

Toxicita nanochitosanu byla testována na potkanech. Krmení chitosanem v dávce 100 až 200 mg/kg neprokázalo žádné nepříznivé účinky na játra, ledviny a tkáň žaludku ani na hladinu biochemického a oxidačního stresu v krvi. Další testy provedené na zebřičce pruhované ukázaly, že se zvýšenou dávkou chitosanu byla pozorována nižší rychlost líhnutí a vyšší pohyblivost. Bylo zjištěno, že nanočástice s menší velikostí (200 nm) používané ve studiích zebřičky pruhované jsou toxičtější ve srovnání s nanočásticemi o větší velikosti (340 nm) a pozorovaná toxicita byla prokázána jako výsledek zvýšené apoptózy, oxidačního stresu a produkce proteinu tepelného šoku. Je tedy zřejmé, že při použití materiálu na bázi nanochitosanu může existovat druhově závislá toxicita, kterou lze minimalizovat úpravou dávky a velikosti nanočástic. Vzhledem k malé velikosti a schopnosti pronikat biologickými membránami představují nanočástice riziko vstupu do biologických systémů. Proto by měla být koncentrace a vlastnosti závislé na velikosti nanochitosanu a jeho derivátů před použitím řádně analyzovány, aby se zabránilo toxickým účinkům [32].



Obrázek 6: Struktura chitinu a chitosanu [36]

## Lignin

Lignin je polymer bohatý na polyfenoly z třídy monoligninů obsahujících p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol, který je velmi dobře známý svou antimikrobiální aktivitou. Bylo prokázáno, že lignin obsahuje široké spektrum antimikrobiálních látek, které působí proti bakteriím, plísním a virovým patogenům. Podporuje hojení ran, angiogenezi, arteriogenezi a působí jako imunitní adjuvans. Je to přírodní fenolový polymer získávaný primárně ze dřeva s výbornými vlastnostmi, jako je vysoká tuhost, odolnost proti vlhkosti a některým houbám [6] [7].

Lignin je schopen absorbovat UV záření. Kromě toho má několik potenciálně prospěšných fyzikálně – chemických vlastností, které z něj činí slibnou složku pro průmysl obnovitelné energie a další produkty na bázi ligninu. Přítomnost reaktivních funkčních skupin umožňuje modifikaci molekuly za použití cílových skupin, jako jsou peptidy nebo protilátky pro přípravu roubovaných kopolymerů. Mezi další prospěšné vlastnosti patří hydrofilní nebo hydrofobní vlastnost, která závisí na zdroji ligninu, dobré reologické vlastnosti, dobré viskoelastické vlastnosti, schopnost tvorby filmu a kompatibilita s širokou škálou průmyslových chemikálií. Přírodní lignin je téměř bezbarvý, ale po ošetření kyselinou nebo zásadami získává hnědou nebo tmavě hnědou barvu [7] [8].

Aromatická kruhová struktura ligninu obsahuje methoxy a hydroxylové funkční skupiny, které umožňují ukončení oxidačních reakcí prostřednictvím abstrakce vodíku, čímž působí jako lapače radikálů. Lignin se skládá z fenylypropanoidových jednotek – guaiacyl, syringyl a 4 – hydroxyferyl, které se liší počtem methoxyskupin ve fenylovém kruhu. Lignin s vyšším obsahem fenylypropanoidových jednotek má lepší aktivitu zachycování volných radikálů. *Orto* substituce aromatického kruhu a struktura postranního řetězce také významně ovlivňují antioxidační aktivitu [6].

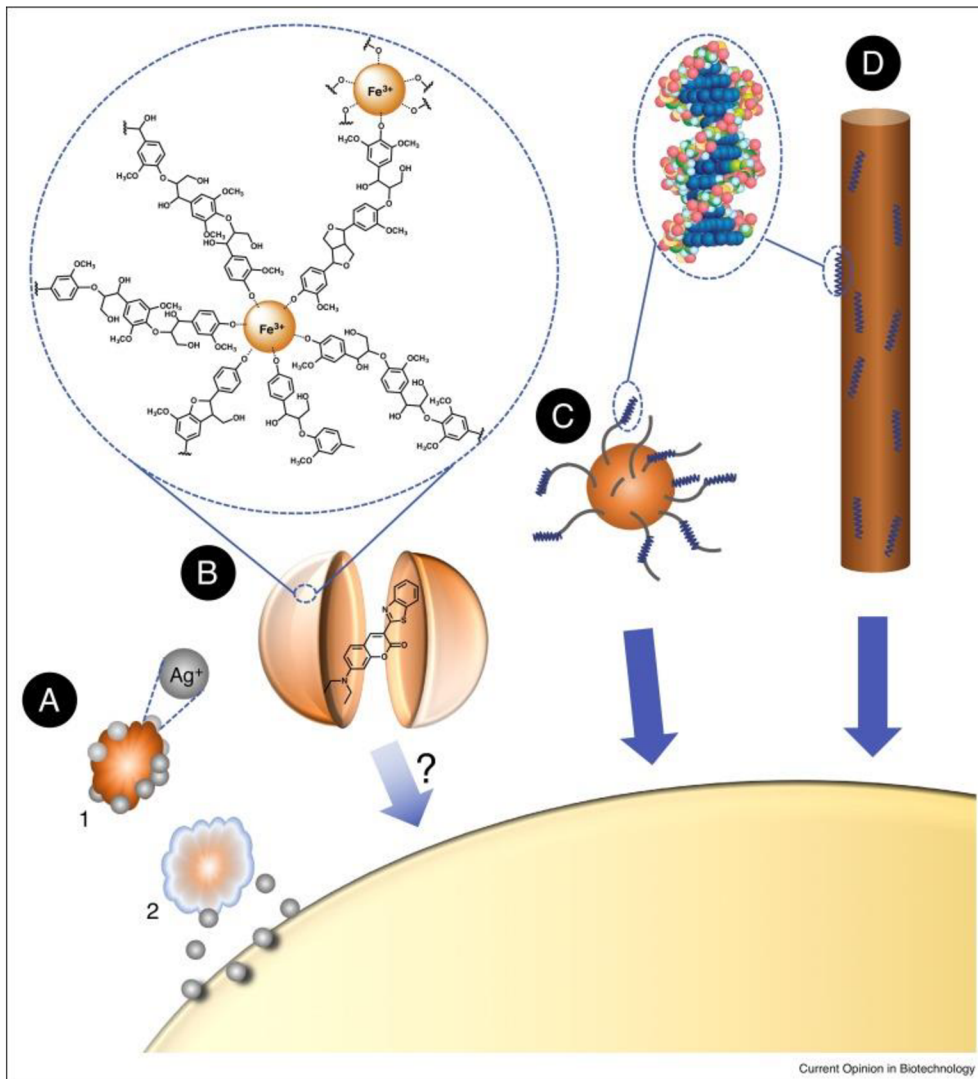
Pro testování toxicity jsou nejběžnější biologické testy buněčné cytotoxicity *in vitro*. U ligninových makromolekul byla provedena studie zabývající se podrážděním kůže, způsobené ligninem. Výsledky odhalily cytotoxické účinky na buňky lidských keratinocytů HaCaT a na myši fibroblasty 3T3 při vysoké koncentraci a delší době expozice. V jiné studii bylo zjištěno, že všechny extrahované vzorky ligninu vykazovaly cytotoxicitu způsobem závislým na dávce a čase, ale všechny vzorky ligninu byly benigní pro lidské mezenchymální kmenové buňky při nízkých koncentracích za 24 h [6] [7] [8].

### Obrázek 7:

Nanomateriály na bázi ligninu a jejich interakce s generickou buňkou (bakteriální nebo savčí), znázorněné žlutou strukturou vpravo dole na obrázku.

- a) K dodání lze použít záporně nabitě nanočástice sulfátového ligninu (v průměru 40–70 nm) napuštěné:
  1. ionty  $\text{Ag}^+$ , následně potažené vrstvou kationtového poly(diallyldimethylamoniumchloridu) (modrá skořápka).
  2. ionty  $\text{Ag}^+$ , které interferují se základními funkcemi bakteriálních buněk.
- b) Ligninové nanokapsule (průměr 0,3–6  $\mu\text{m}$ ) obsahující fluorescenční modelové léčivo kumarin-6 (zobrazené uvnitř rozřezané nanokapsle), které lze syntetizovat sonifikací směsi oleje, vody, sulfátového ligninu,  $\text{FeCl}_3$  a kumarinu nízkenergeticky.
- c) Nanočástice (průměr 100–200 nm) sestávající se z ligninového jádra (okrové koule), na které byl pomocí ATRP naroubován kationtový poly-(2-dimethylaminoethylmethakrylát) (představovaný šedými dráty) prostřednictvím elektrostatických interakcí.
- d) Duté ligninové nanotrubičky (LNT) nebo pevné ligninové nanodráty o průměru 200 nm, připravené v hliníkové šabloně mohou být použity k dodání DNA adsorbované na LNT do lidských buněk [7].





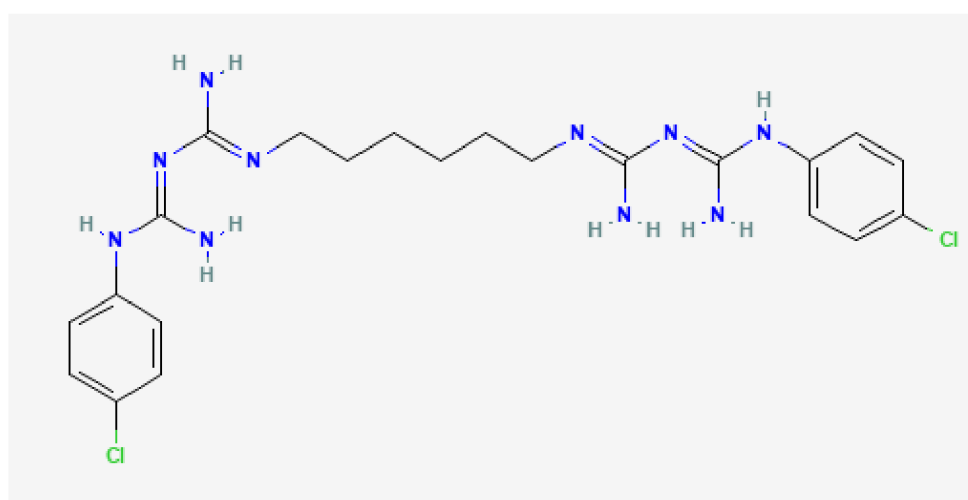
Obrázek 7: Nanomateriály na bázi ligninu a jejich interakce s generickou buňkou (bakteriální nebo savčí) [7]

## Chlorhexidin

Chlorhexidin je sloučenina používaná jako antiseptické činidlo s antibakteriální aktivitou. Nese kladný náboj a reaguje se záporně nabitým povrchem mikrobiálních buněk, čímž narušuje integritu buněčné membrány. Následně proniká do buňky a způsobuje únik intracelulárních složek vedoucí k buněčné smrti. Vzhledem k tomu, že grampozitivní bakterie nesou silnější negativní náboj, jsou na toto činidlo citlivější [37].

Samotná molekula chlorhexidinu se sestává ze dvou 4 – chlorfenylových kruhů a dvou biguanidových skupin spojených centrálním hexamethylenovým řetězcem (obrázek 8). Využívá se jako antiinfekční a antibakteriální činidlo. Patří do skupiny biguanidů a monochlorbenzenů. Je odvozený od biguanidu [37].

Používá se jako lokální antiseptikum. Ve stomatologii se využívá k léčbě zánětů způsobených mikroorganismy. V dnešní době je jedním z používanějších antiseptik kůže a sliznic. Působí proti široké škále patogenů včetně bakterií, kvasinek a virů. Byl vyvinut ve Spojeném království společností Imperial Chemical Industries na počátku 50. let a v USA byl představen v 70. letech 20. století [37].



Obrázek 8: Struktura chlorhexidinu [37]

## 2.9 Komerční kryty ran

V současné době jsou na trhu s obvazovými krytinami dostupné různé druhy kožních krytí s antimikrobiálními účinky. V následujících odstavcích je popsáno několik z nich. Konkrétně se jedná o StopBac Sterille obsahující aktivní částice nanostříbra, následně o Traumacel Biodress Disinfect od společnosti Bioster a.s., který využívá kombinaci bioaktivního sterilního absorbovatelného krytí z oxidované celulózy s chlorhexidinem jako antibakteriální sloučeninou. Dále je níže popsáno složení a použití pěnového krytí se stříbrem AQUACEL® Ag Foam a Melgisorb Ag, antimikrobiálního alginátového krytí pro mírně až silně exsudující rány [38] [39] [40] [41].

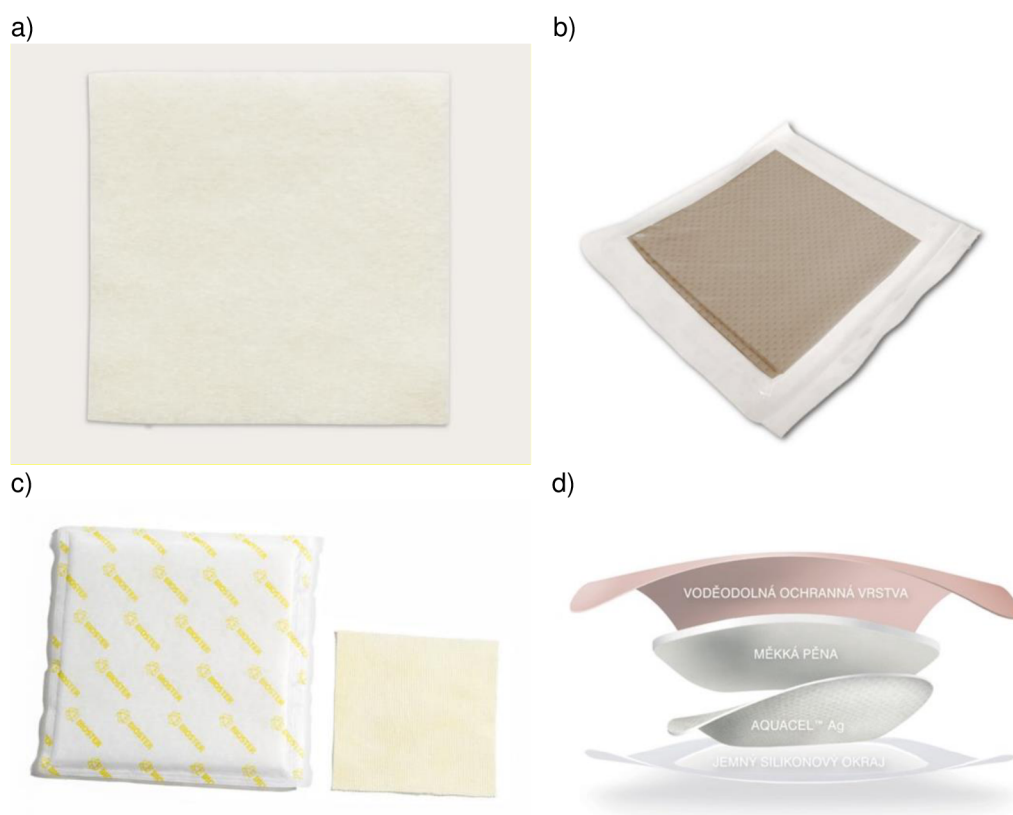
*Melgisorb® Ag* (obrázek 9a) je antimikrobiální alginátové krytí. Je určený k ošetřování všech mírně až silně exsudujících povrchových a hlubokých ran, včetně pooperačních ran, traumatických ran, vředů na nohou, dekubitů, diabetických bérkových vředů, štěpů a odběrových ploch, hlubokých ran a povrchových popálenin a popálenin II. stupně. Protože Melgisorb Ag obsahuje alginát, může pomoci při stavění slabšího krvácení z povrchových ran. Tento produkt lze používat i pod kompresními bandážemi. Melgisorb Ag se může používat při ošetřování infikovaných ran nebo ran, u nichž existuje zvýšené riziko infekce. Alginátová vlákna absorbují velké množství exsudátu a mění se na měkký gel, který vytváří vlhké prostředí a podporuje hojení ran [38].

*StopBac STERILE* (obrázek 9b) je komerční obvaz založený na antimikrobiálním účinku nanočástic stříbra. Jeho výrobcem je společnost Grade Medical, Česká republika. Tento produkt má vysokou antimikrobiální účinnost a jeho cena je ve srovnání s obdobnými produkty nízká. Obvaz je prodyšný, má vysokou absorpci exsudátu, a mění se každých 5-7 dní. Jeho cena se pohybuje kolem 78 Kč za 3 kusy 10x10 cm. Doba použitelnosti je 24 měsíců, výrobek by měl být skladován při teplotě 5–25 °C, v suchu a mimo dosah slunečního světla a zdrojů tepla [39].

*Traumacel Biodress Disinfect* (obrázek 9c) je obvaz obsahující chlorhexidin, který má funkci účinné látky, místního anestetika s lokální antibakteriální aktivitou. Jedná se o bioaktivní resorpční obvaz na rány, určený k léčbě nehojících se chronických ran. Cena tohoto výrobku je zhruba 789 Kč za 5 kusů 10x10 cm. Doba použitelnosti je 24 měsíců. Výrobek by měl být skladován na suchém místě při teplotě 5-25 °C [40].

Obvaz na ránu se skládá z bioaktivního obvazu, nepřilnavého úpletu a vysoce absorpčního obvazu. Bioaktivní část je tvořena hydrogenvápenatou solí oxidované celulózy, která je zcela vstřebatelná. Vlákna jsou vytvořena z celulózy, která slouží k přípravě tkané textilie. Neadherentní část je tvořena polyamidovou pleteninou. Načechraný textil tvoří vysoce absorpční část obvazu [40].

*AQUACEL™ Ag Foam* pěnové krytí (obrázek 9d) zajišťuje voděodolnou vrchní ochrannou krycí vrstvu, která umožňuje vypařování nadbytečné vlhkosti a zabraňuje pronikání virů a bakterií. Obsahuje Hydrofiber® vrstvu s iontovým stříbrem, která gelovává při kontaktu s exsudátem v ráně a pomáhá poskytnout optimální prostředí pro hojení ran. Jemný silikonový okraj, jehož adhezivum je šetrné k pokožce, umožňuje jednoduché odstranění a vykazuje nízké riziko podráždění kůže či vyvolání alergické reakce [41].



Obrázek 9: a) Melgisorb Ag [38] b) StopBac sterile [39] c) Traumacel Biodress Disinfect [40] d) AQUACEL® Ag Foam [41]

## 2.10 Použité metody

### Magnetronové naprašování

Depozice iontů kovu probíhá na principu rozprašování terče (katody) kladnými ionty. Na kladně nabitě anodě je umístěn substrát. Anoda může být například i vyhřívána nebo může rotovat. Po vložení vzorku do přístroje a nastavení tlaku, výkonu, průtoku, vzdálenosti, sklonu terče a dalších potřebných parametrů dochází k samotné depozici. Po zapnutí zdroje se zapálí argonový výboj. Kladně nabitě ionty argonu jsou přitahovány k záporně nabitě katodě (terči) a díky značné energii rozprašují materiál terče (zde měď). Páry mědi pak kondenzují na okolní povrchy včetně substrátů umístěných na anodě. V případě magnetronového naprašování je pod katodou navíc umístěný magnet, který omezuje pohyb elektronů, protože dochází k jejich rotaci kolem magnetických siločar. Elektrony jsou tedy lépe drženy v oblasti katody, což způsobuje zvýšení ionizace, a tedy zvýšení rozprašování kovu. Pokud chceme zvýšit rychlost rozprašování (tedy i depozice), snížíme tlak. Tím snížíme množství srážek iontů a zvýšíme jejich energii před dopadem na terč. Po skončení experimentu snížíme tlak v zařízení a vytáhneme vzorek s vrstvou naprašovaného kovu. Toto zařízení má velkou škálu využití, například i pro výrobu slitin, při které je otevřeno několik terčů současně. Nejpoužívanějším plynem pro depozici je argon, protože je cenově dostupnější než xenon, který by byl pro tyto účely díky svým vlastnostem nevhodnější.

### Výroba polymerních nanovláken

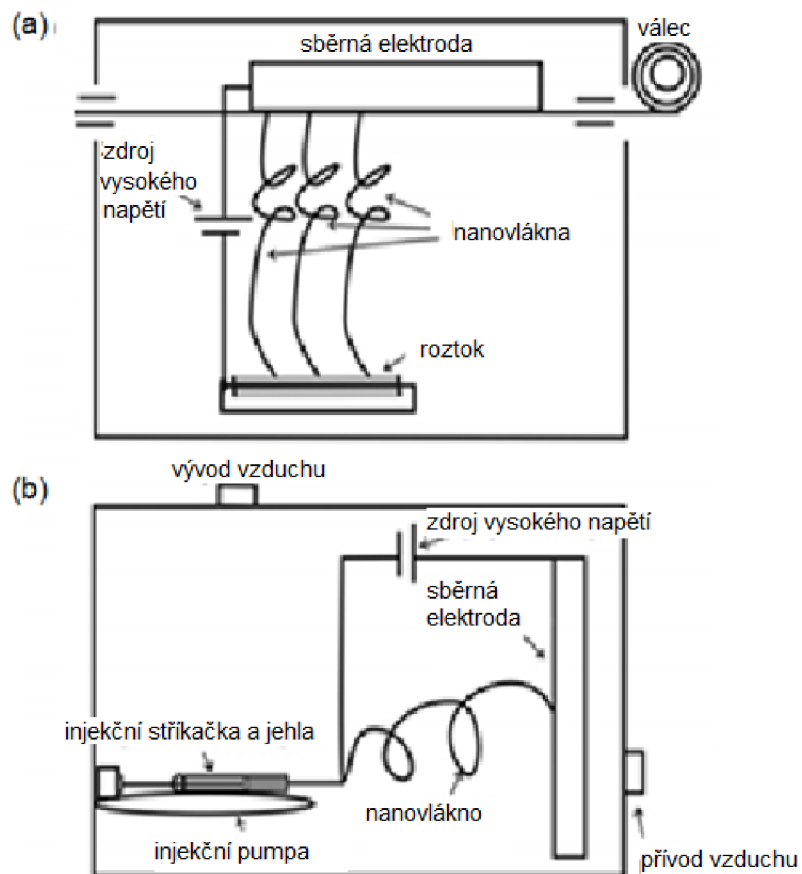
Existuje několik metod pro přípravu polymerních nanovláken. Mezi dvě nejznámější patří metoda elektrostatického zvlákňování a metoda odstředivého zvlákňování.

#### Metoda elektrostatického zvlákňování

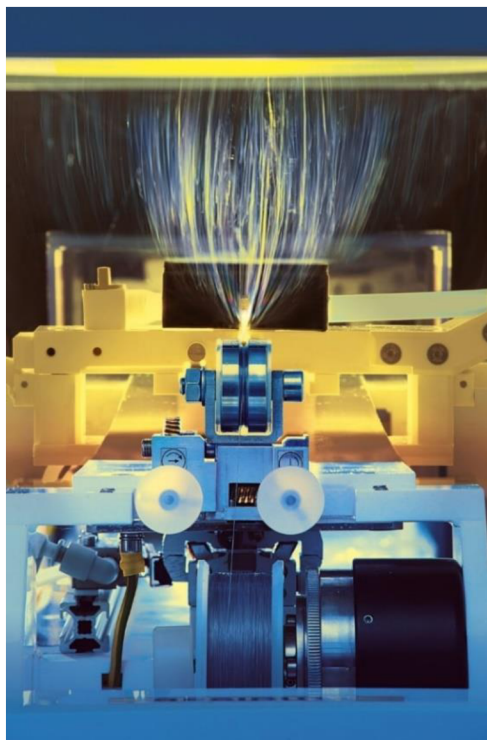
Metoda elektrostatického zvlákňování je nejpoužívanější technikou výroby nanovláken. Tato metoda se v laboratoři používá pro přípravu vláken různých průměrů. Princip této metody je založen na aplikaci elektrostatického pole a následně akumulaci elektrostatického náboje indukovaného na povrchu zvlákňovacího roztoku nebo taveniny. Pokud je elektrostatické pole dostatečně vysoké, způsobuje destabilizaci povrchové energie a tvorbu paprsků kuželovitého tvaru, známých jako Taylorův kužel. Z těchto paprsků vznikají vlákna, která jsou pomocí vysokého napětí poháněna na záporně nabitou sběrnou elektrodu (obrázek 11). Během letu se vlákna dlouží, schnou, a nakonec se ve formě nanovláken ukládají velmi náhodně na substrát pokrývající elektrodu – typicky netkaná textilie. Použitím různých kolektorů a spinneretů s různými vzory je také možné připravit koaxiální nebo jádro – skořepinová nanovlákna a také sítě orientovaných nanovláken s určitým stupněm zarovnání. Pro zvýšení produkce nanovláken se využívá zvlákňovací hlavy bez trysek ve tvaru běžného kovového válce – z komerčního hlediska je dostupný nástroj Nanospider™ (vyráběný společností Elmarco Ltd., Liberec, Česká republika – obrázek 10a) [25] [26].

Nejnovější verzí přístroje Nanospider™ funguje na principu zvlákňovací elektrody ve tvaru tenké struny a pohyblivé hlavy, která nanáší roztok polymeru po celé její délce. Následně se vlivem silného elektrostatického pole formují tenká nanovlákna [42]. Dalším výrobcem zvlákňovacích zařízení je například společnost Contipro, Česká republika (přístroj 4SPIN® – obrázek 10b) [25] [26].

Z průmyslového hlediska má však elektrostatické zvlákňování řadu nevýhod, mezi něž patří významná citlivost na sférické podmínky (jako je například vlhkost, která se dá ovšem kontrolovat a regulovat) a nutnost aplikace velmi vysokého elektrostatického pole v řádech desítek kilovoltů [25] [26]. Mezi vysoce hořlavá rozpouštědla používaná při elektrospinningu patří například aceton, dimethylformamid, ethanol, ethylacetát nebo xylen, u kterých hrozí riziko požáru [43].



Obrázek 10: Schematické znázornění nástrojů používaných pro elektrostatické zvlákňování: (a) nástroj Nanospider™, (b) nástroj 4SPIN®. Převzato a upraveno z [25]



Obrázek 11: Proces na strunové elektrodě [42]

Dalším přístrojem používaným pro elektrostatické zvlákňování je přístroj InoSPIN, vyráběný společností INOCURE. Přístroj je znázorněn na obrázku 12. Zařízení má rozměry pouze 900x890x1000 mm. Přístroj InoSPIN je dodáván s řadou kolektorů a emitorů. I přes malé rozměry obsahuje vysoce produktivní jehlovou elektrodu a roll-to-roll systém kolektoru s efektivní šířkou 400 mm, což umožňuje velkosériovou výrobu v laboratoři. Je zcela automatizovaný, což umožňuje reprodukovat všechny parametry zvlákňovacího protokolu. InoSPIN je navíc možno doplnit vysoce přesnou klimatizační jednotkou InoCOOL pro regulaci teplotních a vlhkostních podmínek [44].

Existuje několik druhů elektrod pro jednojehlové a multijehlové zvlákňování. Patří mezi ně elektroda bez jehly „Needleless“ sloužící pro metodu s vysokou produktivitou výroby vláken, lineární štěrbinová elektroda (Linear cleft electrode), která se také používá pro metodu s vysokou produktivitou výroby vláken, lineární průmyslová elektroda (Linear blade electrode) neboli elektroda sloužící pro výrobu s vysokou produktivitou výroby vláken vhodná pro průmyslovou výrobu, koaxiální elektroda používaná pro výrobu jádro/plášť „core/shell“ nanovláken a bikomponentní elektroda, která je vhodná pro výrobu dvousložkových vláken [44].

Mezi používané kolektory patří lineární deskový kolektor pro depozici na hladkém či strukturovaném podkladu, dále kolektor s navíjením, který je nejlepším řešením při výrobě s vysokou produkcí vláken, statický „gap“ kolektor pro orientovaná vlákna, rotační válcový kolektor neboli 100 mm široký bubnový kolektor pro orientovaná vlákna a rotační trubicový kolektor, který je kompatibilní s 1-10 mm trubkami [44].



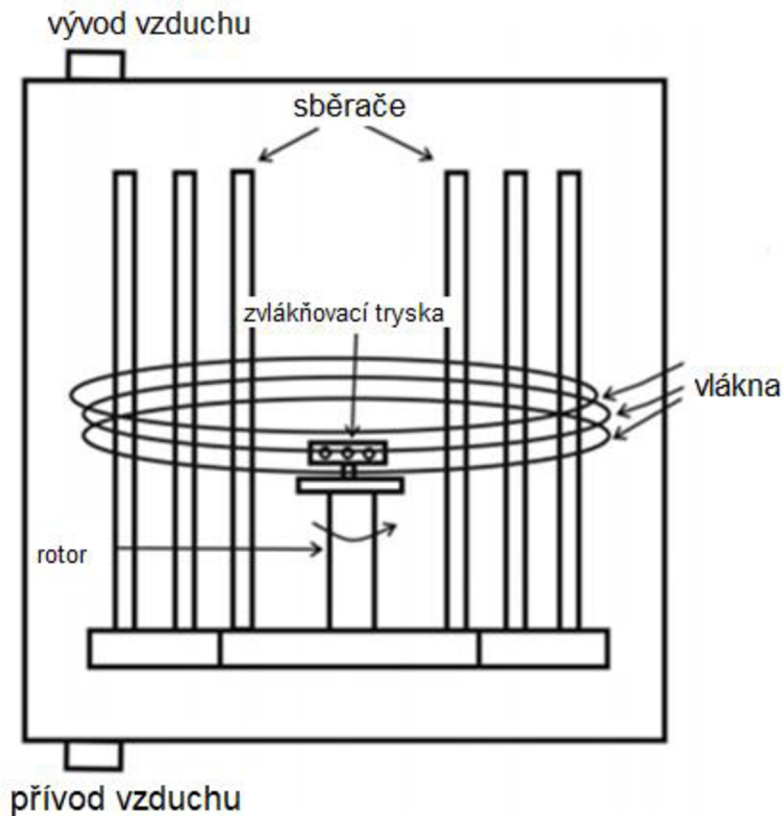
Obrázek 12: InoSPIN vyrobený společností INOCURE [44]

## Metoda odstředivého zvlákňování

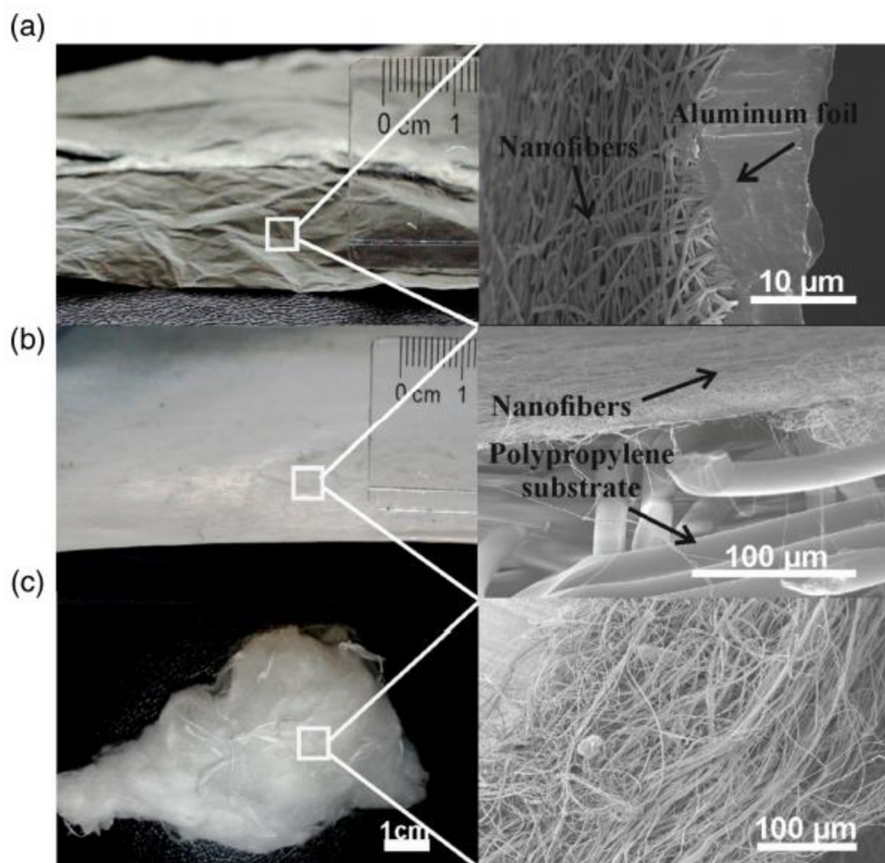
Metoda odstředivého zvlákňování je velmi moderní a průmyslově robustní technika. Spřádaná vlákna vznikají v důsledku vysoké odstředivé síly působící na roztok v rotující zvlákňovací trysce, která má určitý průměr (obvykle několik stovek  $\mu\text{m}$ ). Díky odpařování a silnému proudění vzduchu ve spřádací komoře, se nově vzniklá vlákna dostanou do sběrače vláken a zůstanou tam. Teoreticky by měl být výtěžek vláken ovlivněn hlavně rychlostí rotace zvlákňovací trysky, vzdáleností kolektoru a průměru zvlákňovací trysky. Na druhé straně morfologie a rozměry vláken závisí především na viskozitě roztoku a rychlosti odpařování. Dle parametrů procesu a zvlákňovacího roztoku, může být vyrobeno vlákno s průměrem v rozmezí několika stovek nm až několika  $\mu\text{m}$ . Metoda odstředivého zvlákňování se používá k výrobě vláken z různých polymerů, například jako polymethylmethakrylát, vinylidenfluorid, směsi polyvinylalkoholu a chitosanu s přídavkem kyseliny citronové, tříslové a dalších [25] [26].

Obrázek 13 představuje schéma odstředivého rotujícího zvlákňovacího stroje. Polymerní roztok se dává do zvlákňovací trysky (průměr 15 cm), která je upevněná na hřídeli rotoru. Zvlákňovací tryska se skládá z velkého ocelového bloku se 16 tryskami s průměrným vnitřním průměrem 150  $\mu\text{m}$  [25].

Na obrázku 14 lze porovnat vlákna připravená pomocí různých přístrojů.



Obrázek 13: Schematické znázornění odstředivého zvlákňování, přístroj Cyclon Pilot G1 (Pardam Ltd., Česká republika) [25]



Obrázek 14: Porovnání rozměrů vyráběných vláken pomocí různých nástrojů: (a) 4SPIN®, (b) Nanospider™ a (c) cyclonpilot G1 [25]

### Rastrovací elektronová mikroskopie

Elektronové mikroskopy používají elektrony pro zobrazování podobným způsobem, jako světelné mikroskopy využívají viditelné světlo. Na rozdíl od transmisních elektronových mikroskopů (TEM), které detekují elektrony, které procházejí velmi tenkým vzorkem, SEM využívají k vytvoření obrazu elektrony, které se odrážejí od oblasti blízkého povrchu vzorku. Protože vlnová délka elektronů je mnohem menší než vlnová délka světla, je rozlišení SEM lepší než u světelného mikroskopu [45].

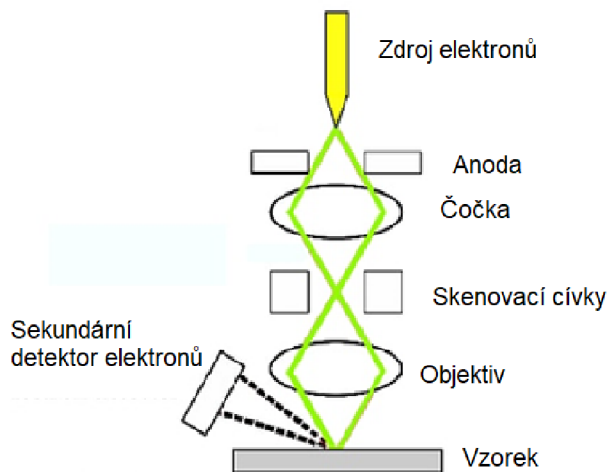
Při rastrovací elektronové mikroskopii snímá elektronový paprsek vzorek v rastrovém vzoru. Nejprve jsou elektrony generovány v horní části kolony zdrojem elektronů. Ty jsou emitovány, když jejich tepelná energie překoná pracovní funkci výchozího materiálu. Poté jsou urychlovány a přitahovány kladně nabitou anodou, jak je vidět na obrázku 15 [45].

Celý elektronový sloupec musí být ve vakuu. Stejně jako všechny součásti elektronového mikroskopu je zdroj elektronů utěsněn ve speciální komoře, aby bylo zachováno vakuum a aby byl celý proces chráněn před znečištěním, vibracemi a hlukem. Kromě ochrany zdroje elektronů před kontaminací vakuum také umožňuje uživateli získat obraz s vysokým rozlišením. V nepřítomnosti vakua mohou být v koloně přítomny další atomy a molekuly. Jejich interakce s elektrony způsobuje vychýlení elektronového paprsku a snižuje kvalitu obrazu. Vysoké vakuum také zvyšuje účinnost sběru elektronů detektory, které jsou v koloně [45].

Podobně jako u optických mikroskopů se k řízení dráhy elektronů používají čočky. Protože elektrony nemohou procházet sklem, použité čočky jsou elektromagnetické. Jednoduše se skládají z cívek drátů uvnitř kovových pólových nástavců. Při průchodu proudu cívkami vzniká magnetické pole. Elektrony jsou velmi citlivé na magnetická pole, jejich dráha uvnitř sloupce mikroskopu může být řízena těmito elektromagnetickými čočkami jednoduše úpravou proudu, který je na ně aplikován [45].



## Rastrovací elektronový mikroskop

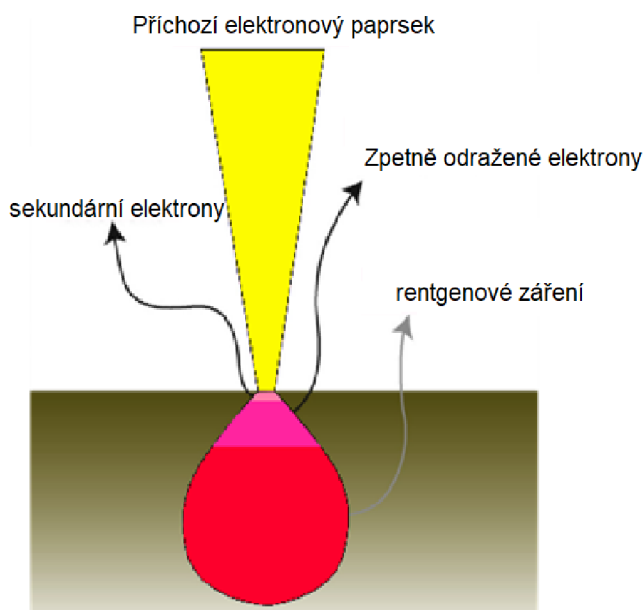


Obrázek 15: Rastrovací elektronový mikroskop. Převzato a upraveno z [45]

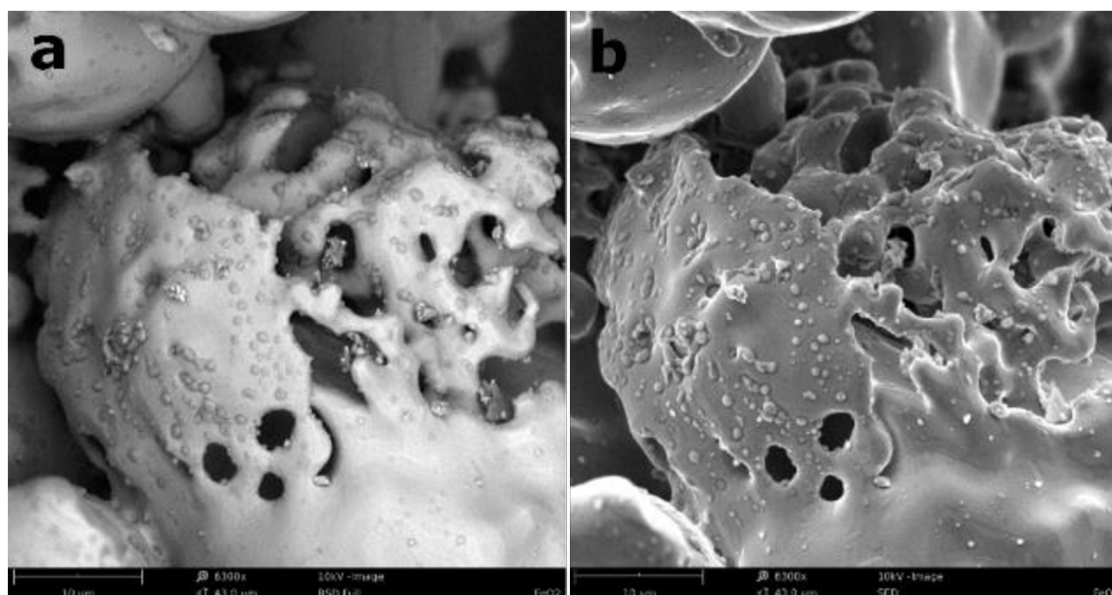
Interakce elektronového svazku se vzorkem může generovat mnoho různých typů elektronů, fotonů nebo ozařování. V případě SEM jsou používány dva typy elektronů: zpětně odražené elektrony (BSE) a sekundární elektrony (SE) (obrázek 16) [45].

BSE patří k primárnímu elektronovému paprsku a po elastických interakcích mezi paprskem a vzorkem se odrážejí zpět. Naproti tomu sekundární elektrony pocházejí z atomů vzorku; jsou výsledkem nepružných interakcí mezi elektronovým paprskem a vzorkem [45].

BSE pocházejí z hlubších oblastí vzorku, zatímco SE pocházejí z povrchových oblastí. Z tohoto důvodu nesou tyto dva druhy elektronů různé typy informací. Snímky BSE vykazují vysokou citlivost na rozdíly v atomovém čísle; čím vyšší je atomové číslo, tím jasnější je materiál na obrázku. SE zobrazení může poskytnout podrobnější informace o povrchu. Rozdíl mezi snímky získanými pomocí BSE a SE jsou vidět na obrázku 17 [45].



Obrázek 16: Princip vzniku zpětně odražených a sekundárních elektronů v materiálu po ozáření primárním elektronovým paprskem. Převzato a upraveno z [45]



Obrázek 17: Částice  $\text{FeO}_2$  – porovnání snímků elektronového mikroskopu získaných pomocí a) BSE b) SE [45]

BSE a SE jsou detekovány různými typy detektorů. Pro detekci BSE jsou detektory v pevné fázi umístěny nad vzorkem, soustředěně k elektronovému paprsku, aby se maximalizoval sběr BSE.

Pro detekci SE se používá především detektor Everhart-Thornley. Skládá se ze scintilátoru uvnitř Faradayovy klece, který je kladně nabitý a přitahuje SE [45].

### Energeticky disperzní rentgenová spektroskopie

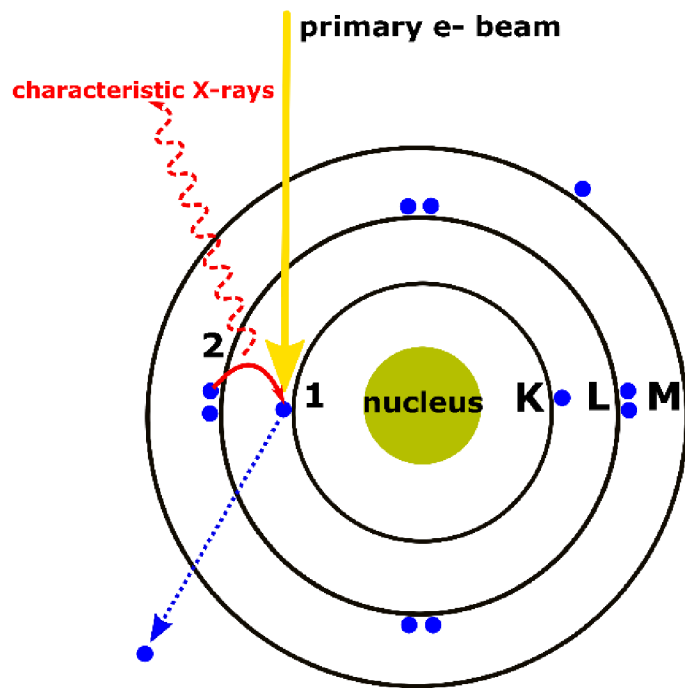
Energeticky disperzní rentgenová spektroskopie (EDX) funguje na principu nárazu elektronového paprsku na vnitřní obal atomu, vyražení elektronu z obalu a zanechání kladně nabitě elektronové díry (obrázek 18) [46].

Rentgenové záření je generováno pomocí EDX ve dvou krocích. V první části je vyražen elektron, který přijal energii a zanechá za sebou díru. V druhé fázi je pozice vyraženého elektronu vyplněna dalším elektronem z vyšší energetické slupky a uvolňuje se rentgenové záření, jehož energie odpovídá rozdílu energetických hladin. Energie tohoto rentgenového záření je jedinečná pro konkrétní prvek a přechod [46].

Rentgenové záření emitované během procesu sbírá křemíkový driftový detektor, který měří signál a interpretuje jej pomocí softwaru. V podstatě lze chemické informace vizualizovat několika způsoby, včetně elementárního mapování a řádkových skenů. Tímto způsobem lze rentgenové záření použít k identifikaci každého prvku, který je ve vzorku [46].

EDX lze použít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu, což umožňuje identifikovat jak typ přítomných prvků, tak procento koncentrace každého prvku ve vzorku. Stejně jako SEM je tato technika nedestruktivní, což znamená, že nepoškozuje vzorek [46].

Díky mnoha výhodám se EDX analýza stala běžnou praxí napříč průmyslovými odvětvími, od výroby nebo výzkumu přes řízení energie a zdrojů až po běžné zboží. Díky SEM a EDX analýzám mohou výzkumníci zlepšit kvalitu výroby a zároveň ušetřit čas. Pomocí EDX mohou výzkumníci rychle generovat informace o chemickém složení vzorku, včetně toho, jaké prvky jsou přítomny, stejně jako jejich distribuci a koncentraci [46].



Obrázek 18: Princip vzniku charakteristického rentgenového záření využívaného u metody EDX [46]

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Příprava nanomateriálů s přídavkem mědi

##### Příprava PCL nanovláken

Nanovláknenné materiály z polykaprolaktonu (PCL) byly připraveny elektrostatickým zvlákňováním z roztoku PCL na světle modré polypropylenové (PP) netkané textilii spunbond, která byla umístěna na kolektor pro elektrostatické zvlákňování. PCL pelety (Mn 80 000, Merck) byly rozpuštěny ve směsi kyseliny octové (99 %, Merck) a kyseliny mravenčí (98 %, Merck) v hmotnostním poměru 2:1 za získání roztoku PCL o 14 % hm. Následně byl roztok míchán při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Proces elektrostatického zvlákňování byl proveden na zařízení INOSPIN Mini (Inocure). Aplikované napětí na jehle bylo +40 kV a na sběrné elektrodě -10 kV. Použitá jehla měla průměr 16 G a průtok roztoku polymeru byl 0,35 ml/min.

##### Magnetronové naprašování

Experiment depozice tenké měděné vrstvy na PCL nanovláknenu membránu byl proveden ve výzkumném centru CEITEC Brno, konkrétně v laboratořích CEITEC Nano (součástí Czech Nanolab LM2018110). Náš experiment byl proveden na magnetronovém naprašovacím systému BESTEC (MAGNETRON), znázorněným na obrázku 19. Hlavní částí tohoto zařízení je vakuová depoziční komora, která obsahuje 8 terčů, které se mohou obměňovat dle potřeby (např. Cu, Fe, Ni, Au, Al, Ti, Co, ...). Komora s terči je znázorněna na obrázku 20. Pro náš experiment byl použit terč mědi a tloušťka deponované vrstvy byla 50 nm. Podmínky měření jsou znázorněny v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled podmínek při magnetronovém naprašování. ( $\varphi$  rotace substrátu, P výkon, p tlak v komoře,  $Q_{Ar}$  průtok inertního plynu argonu, t depoziční čas)

$\varphi$ [ot./min]	P [W]	p [Pa]	$Q_{Ar}$ [sccm]	t [s]
10	41	0,15	30	100



Obrázek 19: Magnetron [47]



Obrázek 20: Terče uložené v hlavní části magnetronu [47]

### 3.2 Analýza materiálů pomocí SEM a EDX

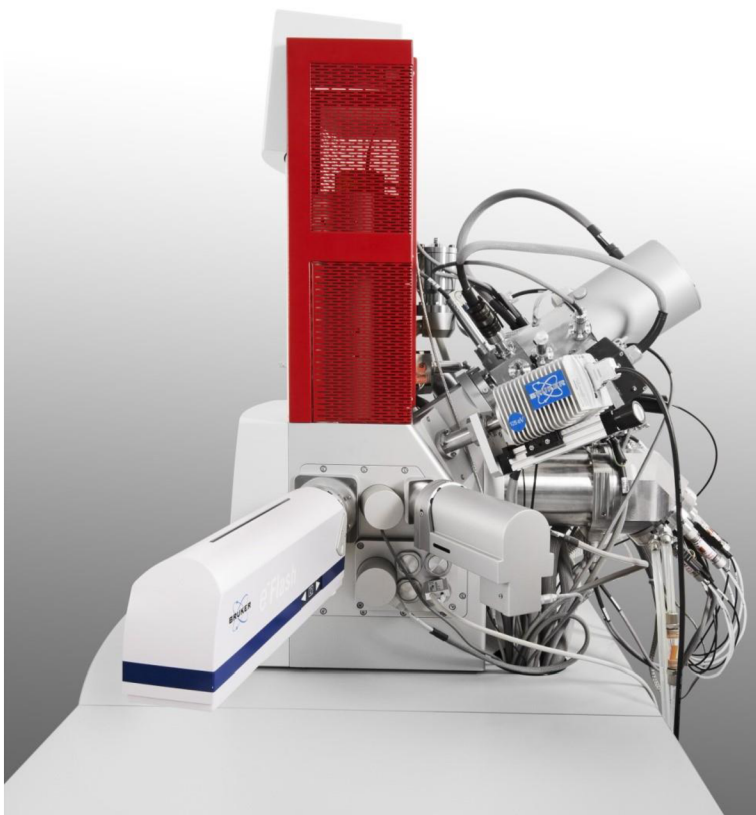
Rastrová skenovací mikroskopie a metoda energeticky disperzní rentgenové spektroskopie byly provedeny v laboratořích CEITEC Brno (Skenovací elektronový mikroskop MIRA3 XMU (MIRA3-XMU); obrázek 21 a Focused Ion Beam/Scanning Electron Microscope TESCAN LYRA3 (LYRA); obrázek 22). Byly skenovány polykaprolaktonové membrány obohacené o tenkou vrstvu mědi (připravené magnetronovým naprašováním) a komerčně prodávané mikromateriály StopBac a Traumacel. Pro snímkování pomocí SEM je nutné, aby byl povrch vzorku vodivý. Materiály StopBac a Traumacel byly z tohoto důvodu pomocí metody magnetronového naprašování opatřeny tenkou vrstvou zlata (standardně 10nm) na přístroji High vacuum coating system for electron microscopy Leica Microsystems EM ACE 600 (LEICACOAT-NANO). Podmínky pro SEM a EDX analýzu jsou popsány v tabulce 2.

Tabulka 2: Podmínky pro SEM a EDX analýzu

Materiál	Podmínky pro SEM a EDX analýzu				
	napětí [kV]	zorné pole [ $\mu\text{m}$ ]	zvětšení	pracovní vzdálenost [mm]	detekované elektrony
StopBac	20	500	1110x	15	sekundární
Traumacel	20	500	1110x	15	sekundární
PCL s Cu	10	50	5540x	9	sekundární



Obrázek 21: Skenovací elektronový mikroskop (SEM) MIRA3 XMU (MIRA3-XMU) [48]



Obrázek 22: Focused Ion Beam/Scanning Electron Microscope TESCAN LYRA3 (LYRA) [49]

### 3.3 Kultivace buněk a testování výluhů materiálů s antimikrobiálními přísadami

#### Použité chemikálie

- Phosphate Buffered Saline (PBS), pufovaný fyziologický roztok, fosfátový pufr o pH 7,4 používaný pro oplach buněk
- EDTA (kyselina diamintetraoctová), konkrétně 0,05% roztok používaný k uvolnění buněk HaCaT od povrchu misky
- Trypsin neboli enzym tenkého střeva štěpící proteiny, konkrétně ve formě 1x trypsin-EDTA (Biotech, LM-T1706/100, Onsala, Švédsko)
- Somatic cell ATP releasing reagent, lyzační pufr (Sigma Aldrich)
- ATP mix (191013 Cot, BioThema, Handen, Švédsko), obsahem je směs luciferázy s luciferinem

#### Médium používané ke kultivaci buněk

- Výrobce je společnost Gibco, jedná se o produkt Dubeccos Modified Eagle Medium.
- Médium obsahuje 4,5 g/l D-glukózu, L-glutamin, pyruvát.
- K médiu se následně přidává 10% fetální bovinní sérum pro doplnění významných organických látek (růstové faktory, vitamíny, bílkoviny, stopové prvky), dále 5 ml penicilin streptomycin z důvodu zabránění kontaminace (100 U/ml, HyClone) a 1,2 mM L-glutamin (Gibco).
- Médium se uchovává v lednici, před každým použitím je nutné ho nahřát ve vodní lázni.

#### Použité buňky

- Lidské fibroblasty (LF) tvořící výplňovou tkáň cév (dar. P. Veselého, kultivováno v FN Královské Vinohrady, Praha).
- Lidské keratinocyty (HaCaT) jsou pokožkové buňky s vysokým obsahem keratinu (ATCC).
- Potkaní Vascular smooth muscle cells (VSMC), neboli buňky cévní hladké svaloviny (izolát z laboratoře L. Bačákové z FÚ AV ČR, Praha).
- V médiu na Petriho misce se buňky uchovávají v inkubátoru HeraCell (Heraeus) při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> (obrázek 23).



Obrázek 23: Uchovávání buněk v inkubátoru

### Pasážování buněk

Pasážování se provádí, pokud jsou buňky na Petriho misce konfluentní asi ze 75 % (kontrola mikroskopicky – inverzní mikroskop CKX 41, Olympus, Tokio, Japonsko). K buňkám na Petriho misce (objem 10 ml) bylo přidáno 10 ml PBS, pomocí PBS dochází k omytí buněk od média s fetálním bovinním sérem, následně bylo vše odsáto. Byly přidány 2 ml trypsinu a miska s buňkami byla vložena do inkubátoru asi na 5 min. Po několika minutách se díky trypsinizaci buňky pustily povrchu misky a oddělily se jedna od druhé (to bylo nutno zkontrolovat pohledem, popřípadě pod mikroskopem). Následovala neutralizace 2 ml média. Následně bylo nutné spočítat množství buněk na dané misce pomocí Bürkerovy komůrky (obrázek 24). Asi 15  $\mu$ l vzorku bylo napipetováno na podložní sklíčko Bürkerovy komůrky a bylo vloženo pod mikroskop. Buňky v Bürkerově komůrce se počítaly jako obsah čtverečku a dvě boční strany k tomu. Výsledná hodnota byla následně vložena do vzorce:

Rovnice 1: Počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky

$$\text{počet buněk na 1 ml} = \frac{\text{počet spočítaných buněk} \cdot 250 \text{ (objem 1 počítaného čtverečku)}}{\text{počet spočítaných čtverečků}} \cdot 1000$$

Dle výsledku lze spočítat, kolik ml odebrat z původní pasážované misky, aby byl počet buněk v nové pasáži cca 400 000 buněk. Pro experimenty byla použita koncentrace 5 000 buněk na jamku (96 – jamková destička), celkový objem byl 100  $\mu$ l. Příslušný počet jamek (viz obrázek 25) byl vyset a po 24 hodinách následoval další krok – výměna růstového média za výluh.





Obrázek 24: Bürkerova komůrka s buňkami

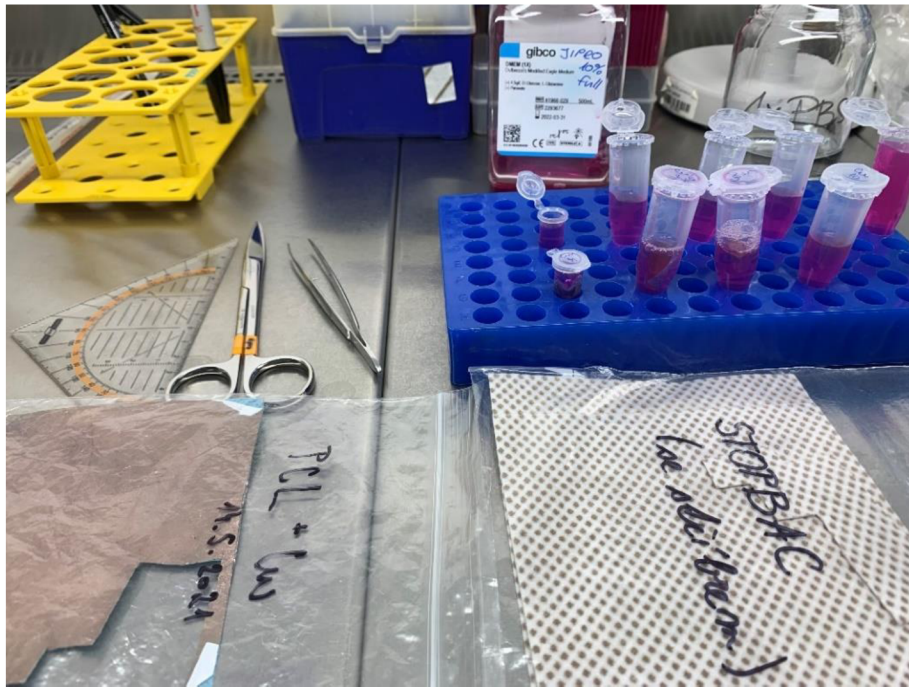
### Příprava výluhů

Během experimentů se pracovalo se dvěma variantami přípravy výluhů. První varianta byla připravena vyluhováním materiálů v inkubátoru 37 °C po dobu 24 hodin. Druhá varianta nebyla na 24 hodin uložena do inkubátoru, ale na třepačku vyhřívanou na 37 °C při rychlosti třepání 150 otáček za minutu. Díky dvěma odlišným variantám přípravy výluhů byl sledován případný vliv třepání a tím potenciálního uvolnění více účinných molekul do roztoku, které by mohly mít vliv na množení buněk.

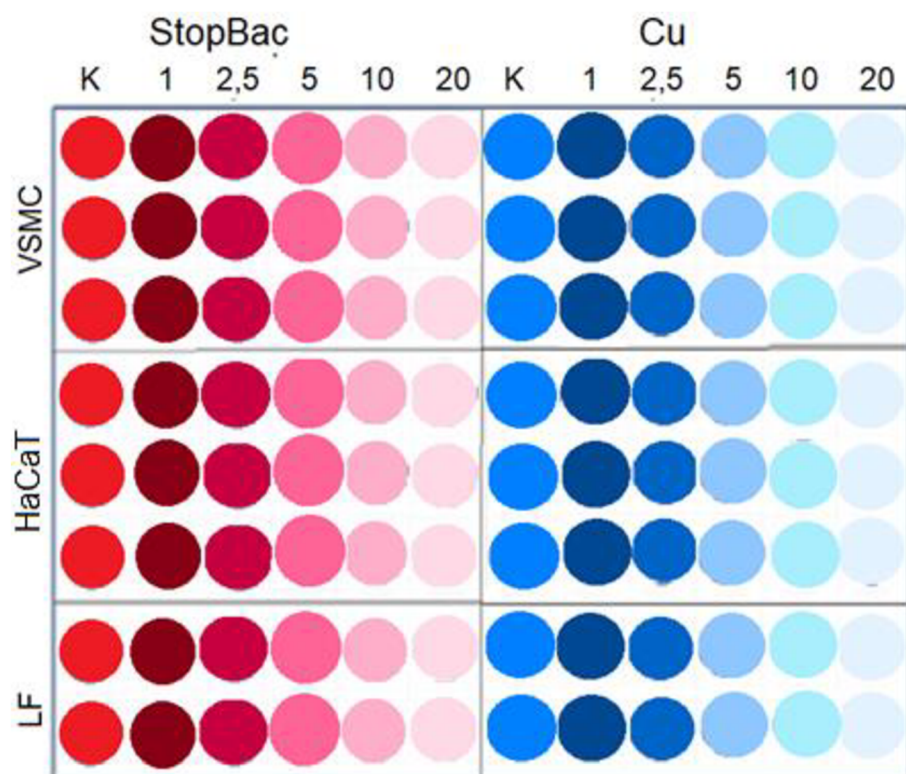
Abychom kvantifikovali toxicitu účinných látek uvolněných po 24hodinové inkubaci, vytvořili jsme sérii „ředění“ (obrázek 25) tj. luhovali jsme materiál ve více objemech (tabulka 3). Po 24 hodinách luhování byly výluhy přepipetovány k předem vyšetým buňkám na destičku (obrázek 26) a to tak, že bylo odsáto médium a bylo napipetováno 100  $\mu$ l konkrétního výluhu, další inkubace probíhala jeden a tři dny (obrázek 27).

Tabulka 3: Příprava výluhů materiálů

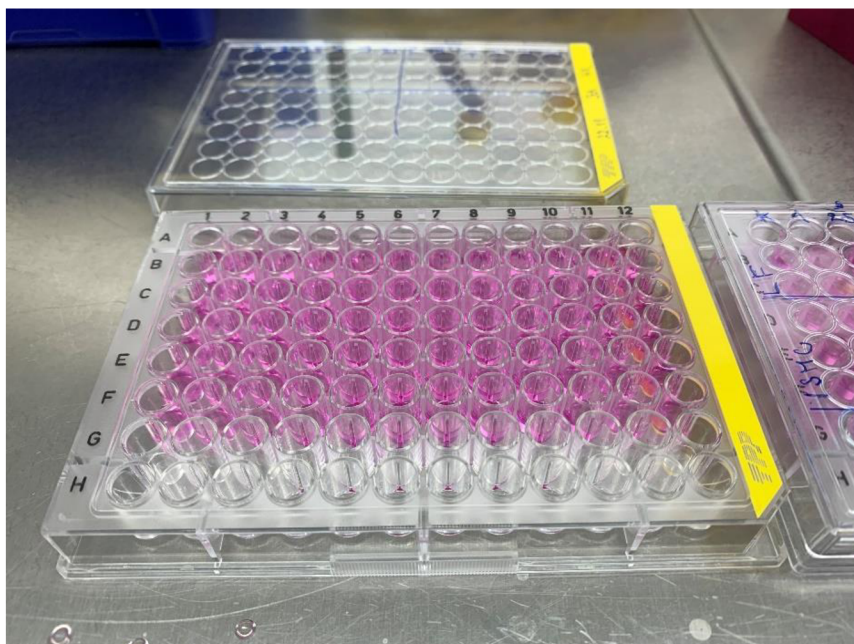
Označení	Poměr materiál [cm <sup>2</sup> ]: médium [ml]	Plocha materiálu [cm <sup>2</sup> ]	Množství média [ml]
1	1:1	1	1
2,5	1:2,5	0,5	1,25
5	1:5	0,5	2,5
10	1:10	0,25	2,5
20	1:20	0,25	5



Obrázek 25: Příprava výluhů



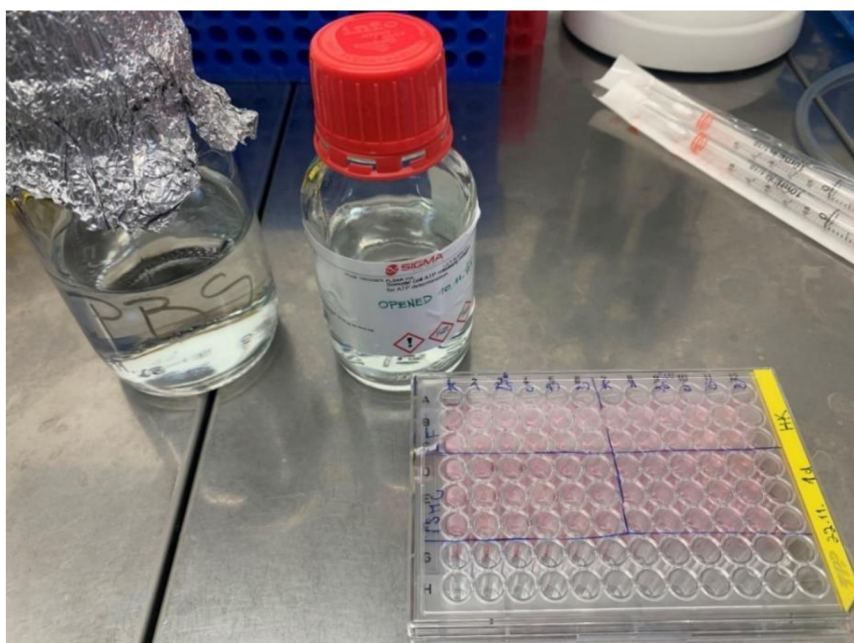
Obrázek 26: Schéma destičky; jednotlivé řádky označují typ buňky, sloupce označují ředění přidávaného výluhu (K-kontrolní sloupec, bez přidávání výluhu)



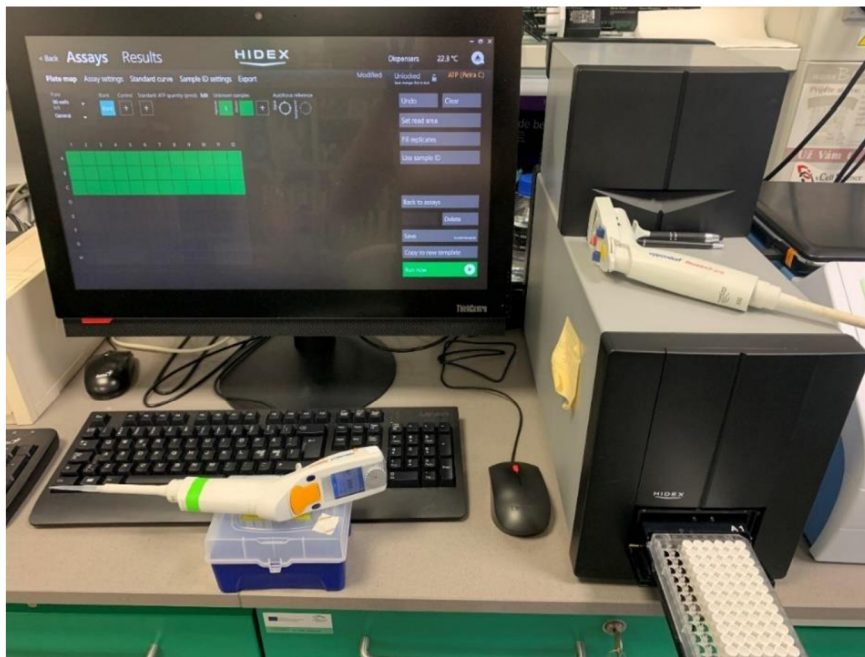
Obrázek 27: Inkubace buněk s výluhy

### Vyhodnocení metodou ATP assay

Po 24 hodinách kultivace bylo z jamek odsáto médium a buňky byly opláchnuty 100  $\mu$ l PBS. Do každé jamky bylo napipetováno 50  $\mu$ l ATP releasing reagentu (dochází k prasknutí buňky a uvolnění ATP do roztoku; obrázek 28) a destička byla 10 minut třepána na třepáčce. Následně bylo z každé jamky přepipetováno 20  $\mu$ l do nové destičky určené k měření v luminometru a bylo přidáno 20  $\mu$ l substrátu luciferázy s luciferinem. V závislosti na množství ATP, tedy na množství buněk dochází k aktivitě luciferázy, která katalyzuje oxidaci luciferinu, čímž se stává chemiluminiscenčním. Intenzita chemiluminiscence odpovídající množství uvolněného ATP a tím i množství buněk byla stanovena v luminometru značky Hidex Sense Microplate Reader (Hidex, Turku, Finland) pomocí programu Hidex (obrázek 29). Stejný postup byl opakován i třetí den.



Obrázek 28: PBS používané k oplachu buněk a ATP releasing reagent používaný k homogenizaci směsi



Obrázek 29: Měření výsledků luminiscence v luminometru Hidex

### Statistické vyhodnocení výsledků

1. Měření vzorků a kontroly se průměrovala v rámci jednoho dne (protože mezi dny nejsou nutně porovnatelná).
2. Hodnoty z jednoho dne se normalizovaly na kontrolu toho dne a vypočítaly se odhady standardních odchylek s použitím Studentova koeficientu se spolehlivostí 68,3 %.
3. Výsledky z různých dnů se kombinovaly jako vážený aritmetický průměr, s váhami danými převrácenými čtverci standardních odchylek), čímž se potlačil vliv dílčích výsledků zatížených velkou chybou). Standardní odchylka celkových průměrů byla odhadnuta pomocí zákona šíření chyb.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

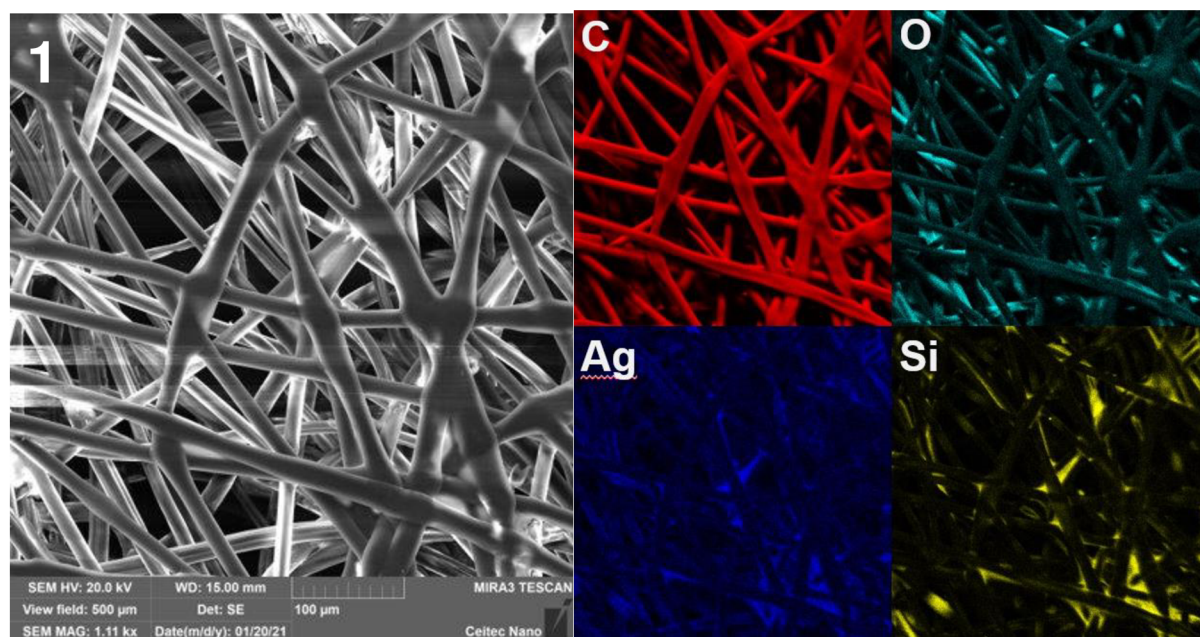
### 4.1 SEM a EDX

Cílem bakalářské práce bylo mimo jiné připravit metodou elektrostatického zvlákňování polykaprolaktonová nanovlákna potažená antimikrobiální vrstvou Cu a porovnat je s komerčně prodáványými mikromateriály StopBac a Traumacel. Pomocí metody SEM byla zobrazena vlákna všech tří studovaných materiálů. Díky této metodě byl stanoven průměr jednotlivých vláken. Pro materiálovou analýzu byla použita metoda EDX. U všech vzorků byla provedena analýza procentuálního zastoupení jednotlivých prvků, které se v materiálu vyskytovaly. Výsledky EDX analýzy jsou zaznamenány v tabulce 4. Ve všech materiálech se vyskytoval uhlík a kyslík. Množství uhlíku je poměrně srovnatelné, ale nejvyšší zastoupení tohoto prvku můžeme pozorovat u StopBacu (84,3 %). Výsledky procentuálního zastoupení kyslíku jsou ovšem rozdílné. Nejvíce kyslíku obsahoval Traumacel (20,5 %), nejméně nanomateriál PCL s Cu (8,8 %), kdy se výsledky procentuálního obsahu navzájem poměrně lišily. Další prvky byly charakteristické pro jednotlivé materiály. StopBac obsahoval křemík a stříbro, Traumacel chlor (pocházející z chlorhexidinu) a nanomateriál PCL s Cu obsahoval dle očekávání měď (která byla nadeponována pomocí magnetronu).

Tabulka 4: Výsledky EDX analýzy pro jednotlivé materiály

Materiál	Obsah prvku v % hm.					
	C	O	Si	Ag	Cl	Cu
StopBac	84,3	14,4	0,8	0,5	-	-
Traumacel– nepřílnavá část	79,0	20,5	-	-	0,5	-
PCL s Cu	75,8	8,8	-	-	-	15,4

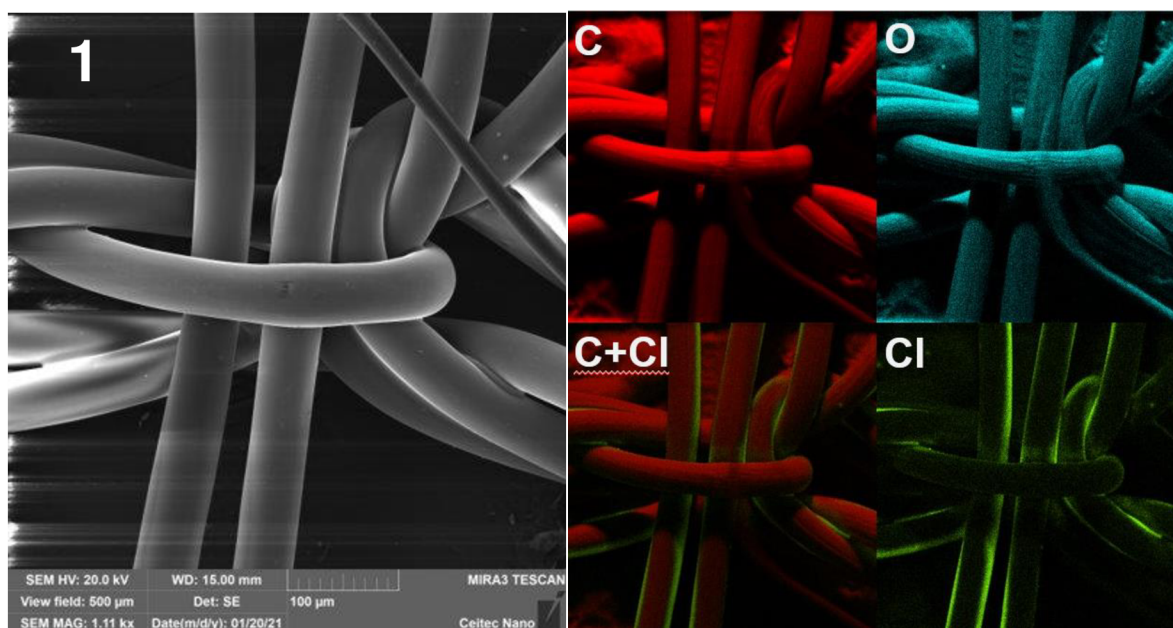
## StopBac



Obrázek 30: EDX analýza C, O, Ag a Si na mikromateriálu StopBac; 1 – snímek ze SEM; ostatní snímky zobrazují prvkové mapy stejného místa.

Na obrázku 30 jsou znázorněny výsledky SEM a EDX analýzy vláken StopBac. První obrázek znázorňuje snímek SEM, na kterém je vidět morfologie studovaných mikrovláken. Průměr vláken byl stanoven na  $16.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ . Bylo také pozorováno „slepování“ nanovláken v pravidelných intervalech. Pomocí EDX analýzy byla odhalena procentuální zastoupení jednotlivých prvků v mikromateriálu (tabulka 4). Jednou z možností výskytu křemíku ve vzorku mohlo být způsobeno přítomností tohoto prvku v koloidním roztoku pro proces sol-gel. Částice stříbra se vyskytovaly vždy ve stejných oblastech jako částice křemíku – na povrchu mikrovláken, vlákna byly Ag ionty impregnovaná. Porovnáním snímků Ag a O lze vidět jejich vzájemný překryv. Zvýšená koncentrace iontů stříbra vyskytující se v mikromateriálu byla způsobena přítomností krystalů  $\text{AgNO}_3$ . Dle výrobce je hypoalergenní chirurgické krytí ran StopBac STERILE založené na nanotechnologii sol. Organicko-anorganický hybridní oligomer s kationty stříbra vázanými v koloidním roztoku s obsahem dusičnanu stříbrného zajišťuje dlouhodobý antimikrobiální efekt. Nositeli vlastního antimikrobiálního účinku jsou jak kationty stříbra, které způsobují ireversibilní změny bakteriálních buněk a buněčnou smrt, tak i samotný sol, čímž se účinek synergicky zvyšuje [39]. Samotný mikromateriál je tvořen karboxymethylcelulóзовými vlákny [50]. Z výsledků EDX analýzy byl stanoven poměr C : O na  $84,3 : 14,4 \rightarrow 281 : 48$ .

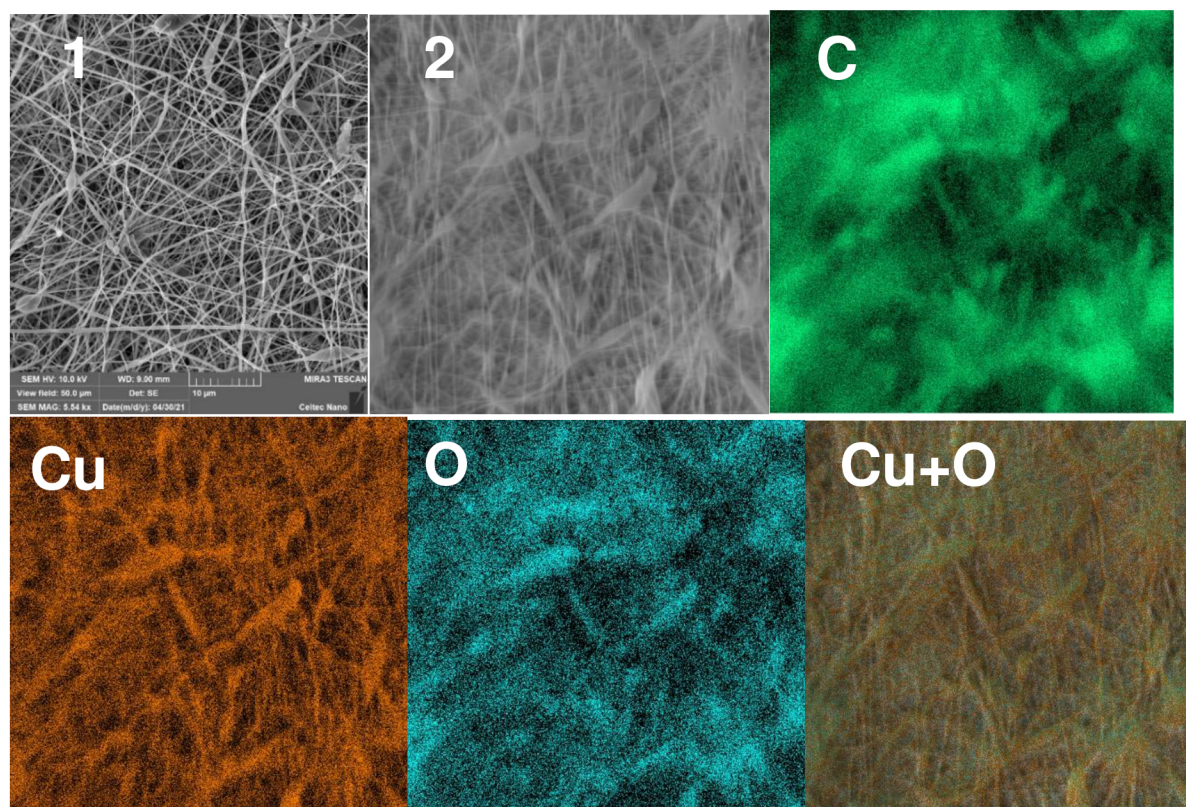
## Traumacel



Obrázek 31: EDX analýza C, O, C+Cl a Cl na mikromateriálu Traumacel; 1 – snímek ze SEM; ostatní snímky zobrazují prvkové mapy stejného místa.

Pomocí SEM analýzy byly zkoumány tři typy vláken materiálu Traumacel: vlákna bioaktivní části, vlákna absorpční části a vlákna nepřilnavé části obsahující chlorhexidin. Na obrázku 31 je znázorněna nejzajímavější část – nepřilnavá část mikromateriálu s účinnou látkou. Byl stanoven průměr jednotlivých vláken. Vlákna absorpční části měla průměr  $12.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$ , vlákna absorpční části  $19.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$  a vlákna nepřilnavé části s chlorhexidinem  $42.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ . Metodou EDX bylo zjištěno, že Cl pokrývá povrch nanovláken homogenně. Tmavá místa na obrázku s uhlíkem lze doplnit pro úplnost chlorem, jak je vidět na obrázku C+Cl. Nepřilnavá část Traumacelu je tvořena vlákny na bázi oxidované celulózy [40]. Pomocí EDX analýzy byl stanoven poměr C : O nepřilnavé části materiálu na  $79,0 : 20,5 \rightarrow 158 : 41$ .

## PCL s Cu



Obrázek 32: EDX analýza C, Cu, O a Cu+O na nanomateriálu PCL s Cu; 1 – snímek ze SEM (Morfologie vláken z přístroje InoSPIN s nanosenou vrstvou Cu); 2 – SEM studovaného místa; ostatní snímky zobrazují prvkové mapy stejného místa [1].

Analýza vláken PCL s Cu je znázorněna na obrázku 32. Pro vizuální kontrolu vláken byla provedena SEM analýza. Na žádném ze snímků nebyla pozorována deformace nanovláken ani případné shluky částic mědi. Průměr analyzovaných vláken se pohyboval okolo 180 nm, což potvrzuje homogenní nanosení vrstvy mědi. Pro detailnější analýzu byla vlákna podrobena EDX analýze. Touto metodou byla potvrzena přítomnost Cu, která pokrývá jednotlivá vlákna, což dokazuje úspěšnou depozici. Na snímcích lze pozorovat, že vlákna jsou tvořena kyslíkem a uhlíkem, což je v souladu s jeho chemickým složením [1]. Poměr C a O v nanomateriálu z měření EDX analýzy vychází v poměru  $C : O = 75,8 : 8,8 \rightarrow 379 : 44$ . Sumární vzorec kaprolaktonu je  $C_6H_{10}O_2$  [31] (poměr  $C : O = 6 : 2$ ). Z porovnání našeho měření a sumárního vzorce vyplývá, že v našem vzorku bylo obsaženo větší množství uhlíku, než by mělo být za standardního stavu. Tato skutečnost je zřejmě způsobena z důvodu lokální kontaminace.



## 4.2 Kultivace buněk s výluhy materiálů

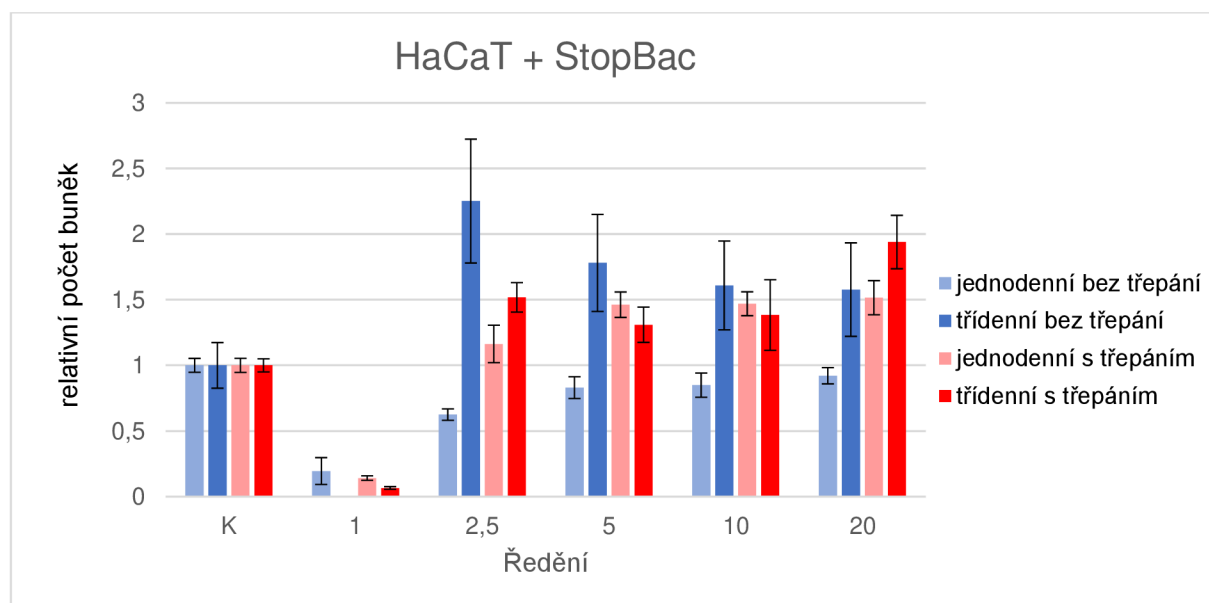
V předběžných experimentech materiálů s buňkami byly materiály přímo pokládány k buňkám a byly také zavěšovány do cell crown. Tyto výsledky ovšem vykazovaly v případě Traumacelu a StopBacu vysokou toxicitu, proto jsme přistoupili k testování materiálů pomocí výluhů. Pomocí těchto testů byla sledována proliferace buněk ve výluzech připravených z materiálů. Pro testy byly zvoleny tři typy buněk, konkrétně buňky HaCaT, VSMC a LF a tři typy mikromateriálů, StopBac, Traumacel a nanomateriál PCL s Cu.

V této kapitole jsou uvedeny grafy s výsledky jednotlivých kultivací buněk s materiály. Jsou zde popsány rozdíly mezi jednodenními a třídenními kultivacemi buněk s výluhy, dále také vliv třepání na množení buněk a závislost ředění výluhů na množení a růstu buněk.

Osa x u grafů označuje ředění výluhu. Osa y znázorňuje hodnoty výsledků luminiscence z luminometru Hidex normalizované k hodnotě kontroly. Statistické zpracování těchto výsledků je popsáno v kapitole Statistické vyhodnocení výsledků.

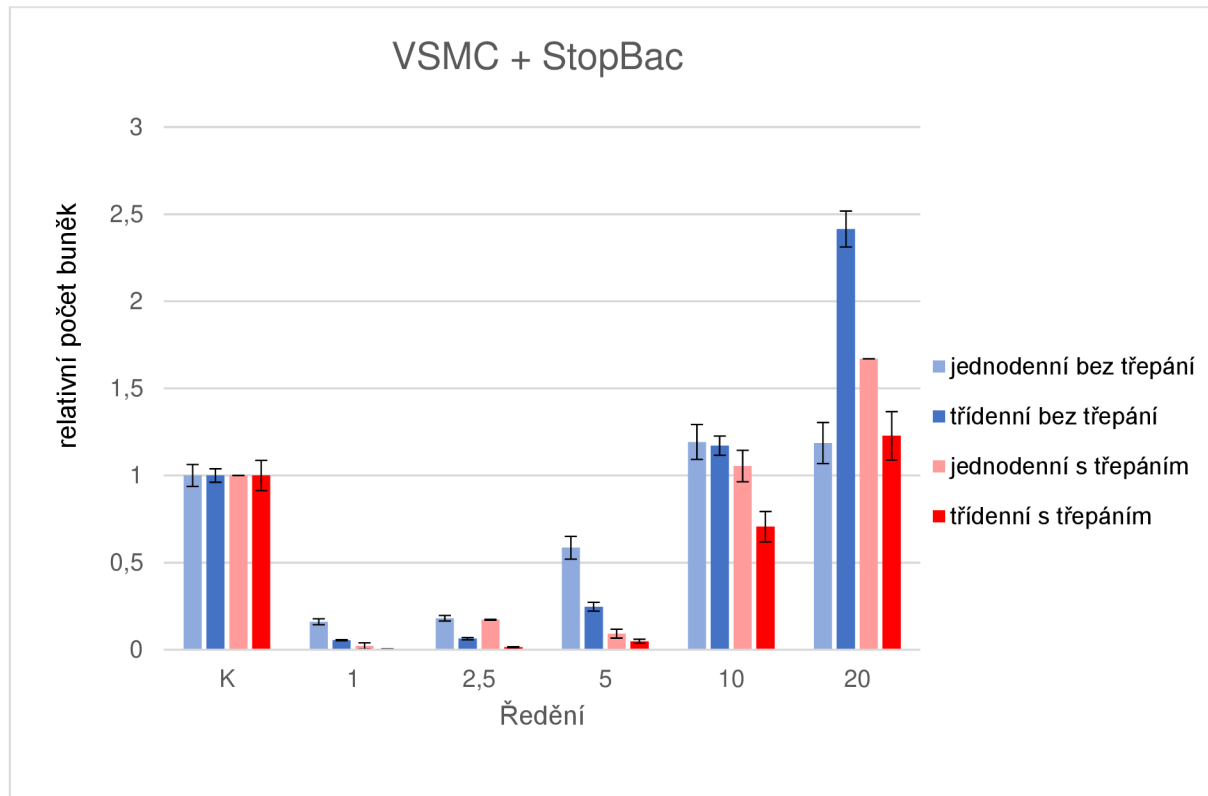
Materiál StopBac dle literatury [51] vytváří prostředí vhodné pro hojení, kde je díky prodlouženému uvolňování stříbrných iontů kontrolována nežádoucí mikrobiální kontaminace. Ionty stříbra prokazatelně vykazují inhibiční účinek proti grampozitivním i gramnegativním bakteriálním kmenům. Antibakteriální účinek iontů stříbra je také způsoben jejich vysokým potenciálem pro přerušení transportu a uvolňování draselných iontů ( $K^+$ ) z bakteriálních buněk a blokování syntézy adenosintrifosfátu. Hybridní nanovrstvy připravené metodou thesol-gel na bázi 3-trimethoxy-silylpropyl-methakrylátu obsahující iontově vázané kationty stříbra zavedené ve formě roztoku dusičnanu stříbrného, vykazují vysoké antibakteriální účinky a jsou vhodné pro lékařské aplikace [51].

Z grafu na obrázku 33 znázorňujícího kultivaci buněk HaCaT s mikromateriálem StopBac vyplývá, že nejvyšší proliferace buněk, tj. nejlepší výsledek indikující potenciální zrychlení procesu hojení, byla vyhodnocena při ředění 2,5 v třídenním měření bez třepání i navzdory nejvyšší relativní chybě měření. Při porovnání třepací a netřepací metody u buněk HaCaT v kombinaci se StopBacem je prokazatelné, že mimo ředění 20 jsou výsledky proliferace buněk při třídenních měřeních lepší při metodě bez třepání. Naopak při jednodenních měřeních jsou výsledky proliferace lepší (mimo ředění 1) u metody se třepáním. Z toho vyplývá, že pro jednodenní měření je lepší výluh se třepáním, který pravděpodobně obsahuje optimální množství iontů stříbra a lépe podporují proliferaci. Z výsledků třídenních měření se třepáním a bez třepání lze vyvodit, že pro třídenní inkubaci s buňkami je lepší výluh, který obsahuje nižší koncentraci léčivé látky. Ze všech výsledků je patrné, že StopBac nevykazuje známky cytotoxicity při správně zvolených ředěních. Mimo ředění 1 a jednodenní metodu bez třepání převyšují všechny hodnoty proliferace buněk hodnotu kontroly.



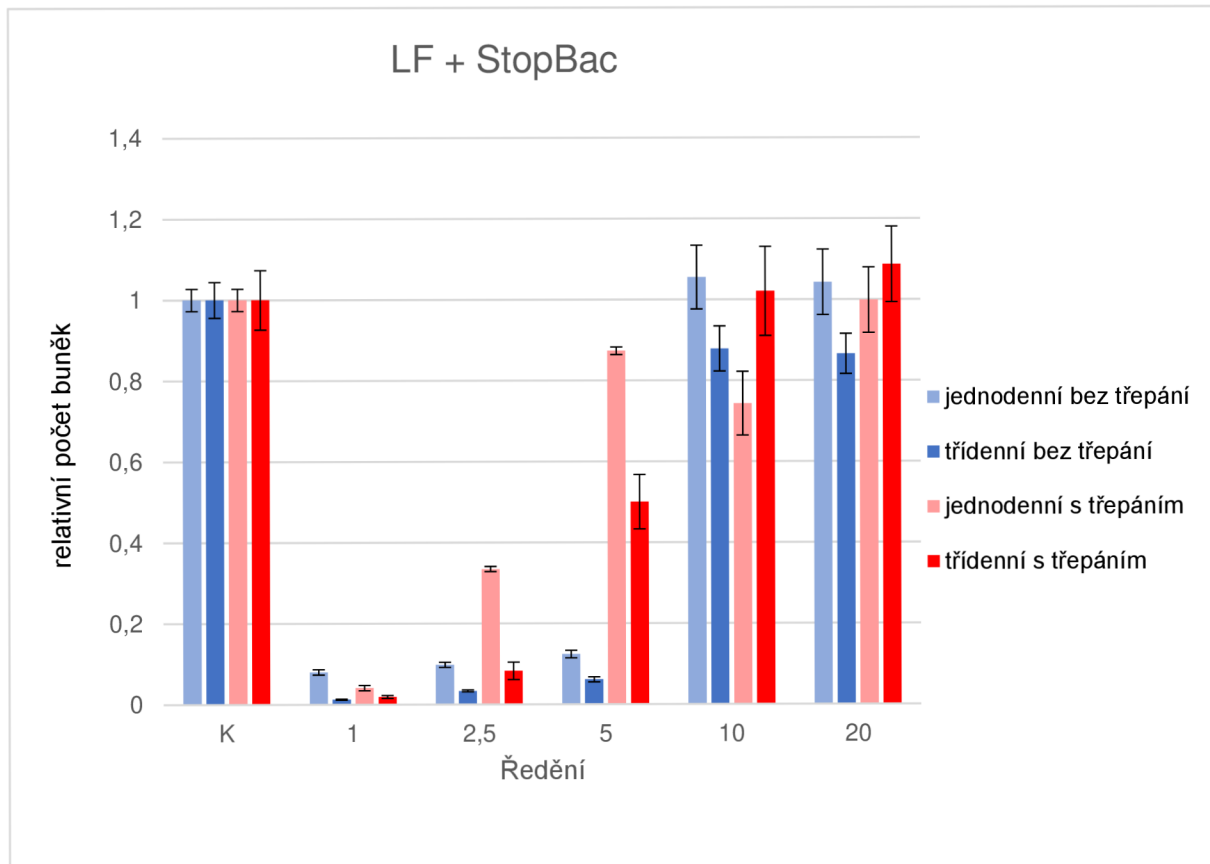
Obrázek 33: Výsledky kultivace buněk HaCaT s výluhy ze StopBacu. Materiály byly luhovány 1 a 3 dny metodou s třepáním a bez třepání.

Obrázek 34 znázorňuje výsledky kultivace buněk VSMC se StopBacem. Pro tento typ buněk je vhodné větší ředění výluhů. Pro ředění 1; 2,5 a 5 jsou výsledky proliferace špatné, hodnoty jsou i s relativní chybou výrazně nižší než hodnota kontroly. Z čehož vyplývá, že pro tento typ buněk je lepší vyšší ředění výluhu, například 10, kdy se výsledky alespoň blíží hodnotě kontroly nebo ředění 20, kdy výsledek třídního měření bez třepání téměř 2,5x převyšuje hodnotu kontroly.



Obrázek 34: Výsledky kultivace buněk VSMC s výluhy ze StopBacu. Materiály byly luhovány 1 a 3 dny metodou s třepáním a bez třepání.

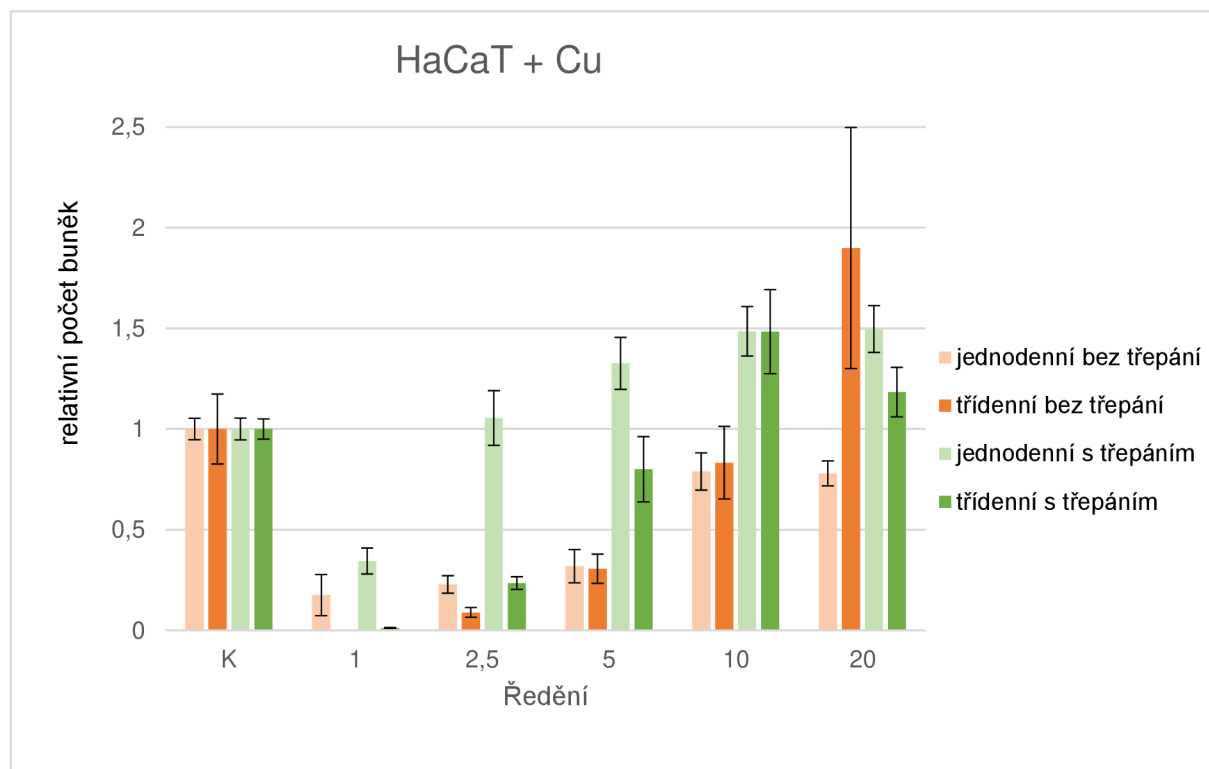
U buněk LF v kombinaci se StopBacem (obrázek 35) jsou výsledky obdobné jako u buněk VSMC. Srovnatelných výsledků, jako je hodnota kontroly, dosahují pouze ředění 10 a 20. U nízkých ředění se uvolnilo příliš aktivní látky. Pro tento typ buněk není mikromateriál StopBac pravděpodobně vhodný nebo by bylo nutné ještě větší zředění.



Obrázek 35: Výsledky kultivace buněk LF s výluhy ze StopBacu. Materiály byly luhovány 1 a 3 dny metodou s třepáním a bez třepání.

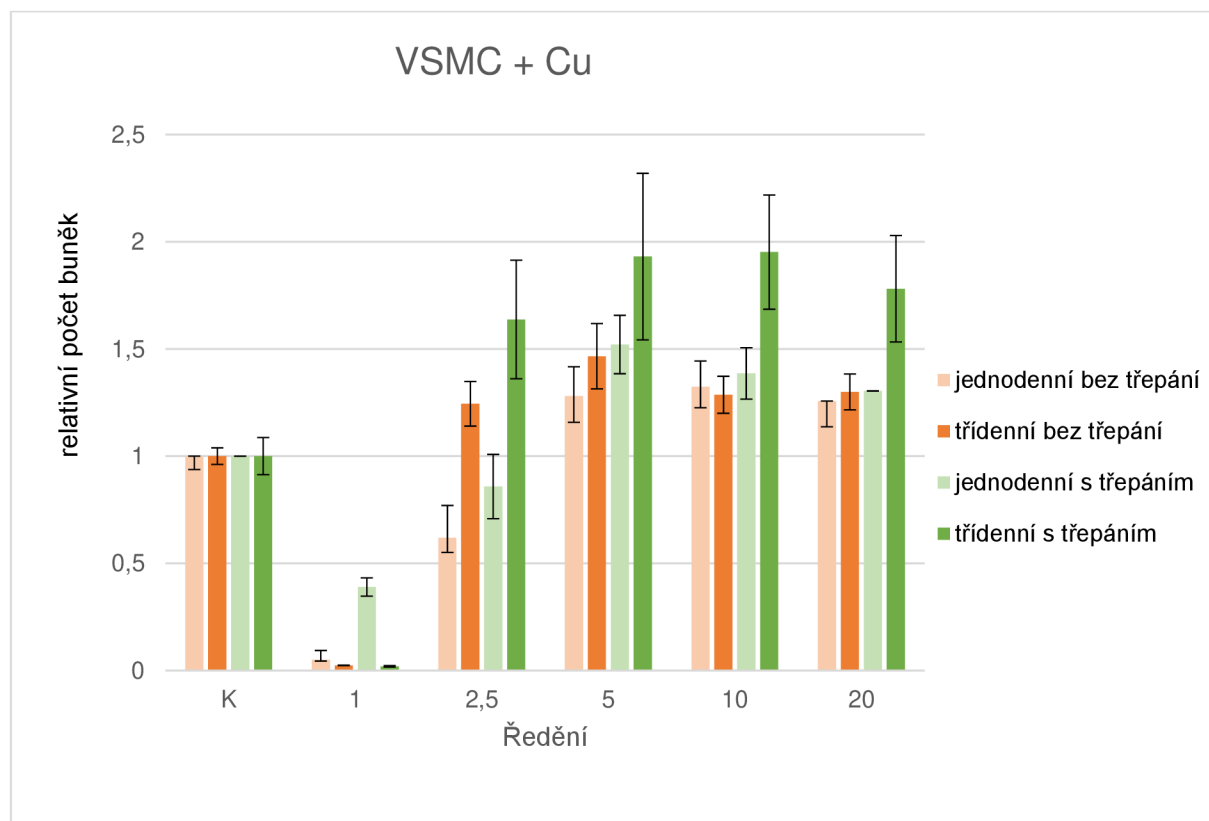
Dalším studovaným vzorkem byl polykaprolaktonový nanomateriál připravený elektrostatickým zvlákněním na přístroji InoSPIN obohacený o vrstvu mědi připravenou magnetronovým naprašováním pomocí naprašovacího systému BESTREC (MAGNETRON) v laboratořích CEITEC Brno.

Pro buňky HaCaT kultivované s výluhem z nanomateriálu PCL obsahující měď dle obrázku 36 vyplývá, že jednodenní měření bez třepání je pro tuto kombinaci nevhodné. Jako jediné měření ani jednou nepřevyšuje hodnotu kontroly. Naopak jednodenní měření s třepáním vykazuje dle grafu nejlepší výsledky ve všech ředěních. Nejvyšší hodnoty oproti kontrole vykazuje ředění 20 při třídní metodě bez třepání. Tento výsledek není ovšem spolehlivý, jelikož je zatížen velkou chybou způsobenou nepřesným pipetováním. Pro buňky HaCaT je po porovnání obrázků 33 a 36 lepší mikromateriál StopBac, kde dochází k výborné proliferaci téměř při všech ředěních.



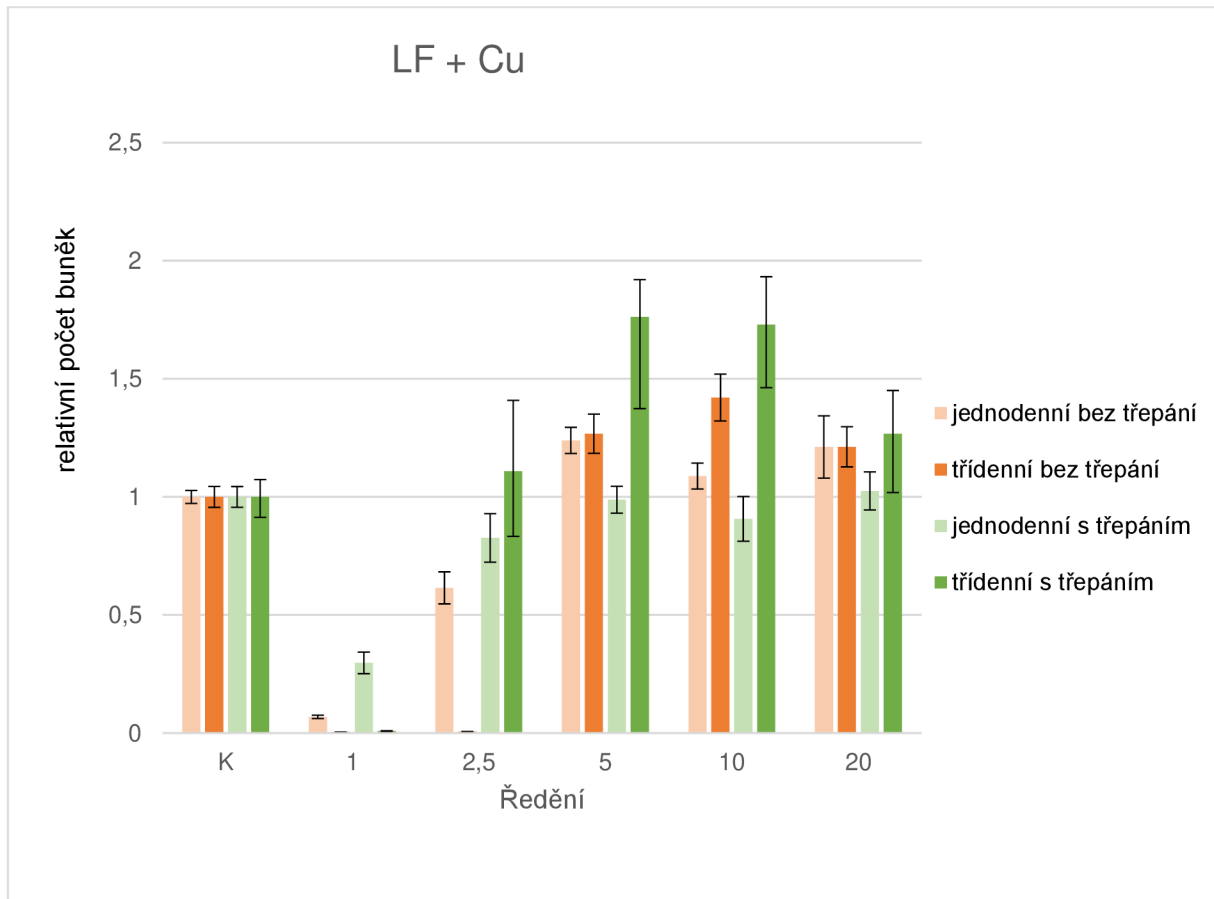
Obrázek 36: Výsledky kultivace buněk HaCaT s výluhy z PCL s Cu. Materiály byly luhovány 1 a 3 dny metodou s třepáním a bez třepání.

Na obrázku 37 jsou znázorněny výsledky kultivace buněk VSMC s výluhy z nanomateriálu PCL s Cu. Z grafu je patrné že tento nanomateriál je pro tento typ buněk vhodnější než mikromateriál StopBac. Nejlepších výsledků dosahuje třídenní metoda se třepáním, která při ředěních 5 a 10 téměř dvakrát převyšuje hodnotu kontroly. I u jednodenních měření dosahuje lepších výsledků metoda se třepáním. Při třepací metodě se do roztoku pravděpodobně uvolňuje větší množství léčivé látky. Pokud se však podíváme na proliferaci v rámci ředění výluhů, vidíme, že u ředění 1, kdy je obsah mědi ve výluhu vysoký, proliferace je velmi špatná. Proto je zvláštní, že se buňkám daří při třepací metodě, kdy je ve výluhu více léčivé látky než u metody bez třepání. Pro pochopení této problematiky by byla potřeba analýza jednotlivých výluhů a jejich porovnání, což by mohlo být předmětem dalšího výzkumu.



Obrázek 37: Výsledky kultivace buněk VSMC s výluhy z PCL s Cu. Materiály byly luhovány 1 a 3 dny metodou s třepáním a bez třepání.

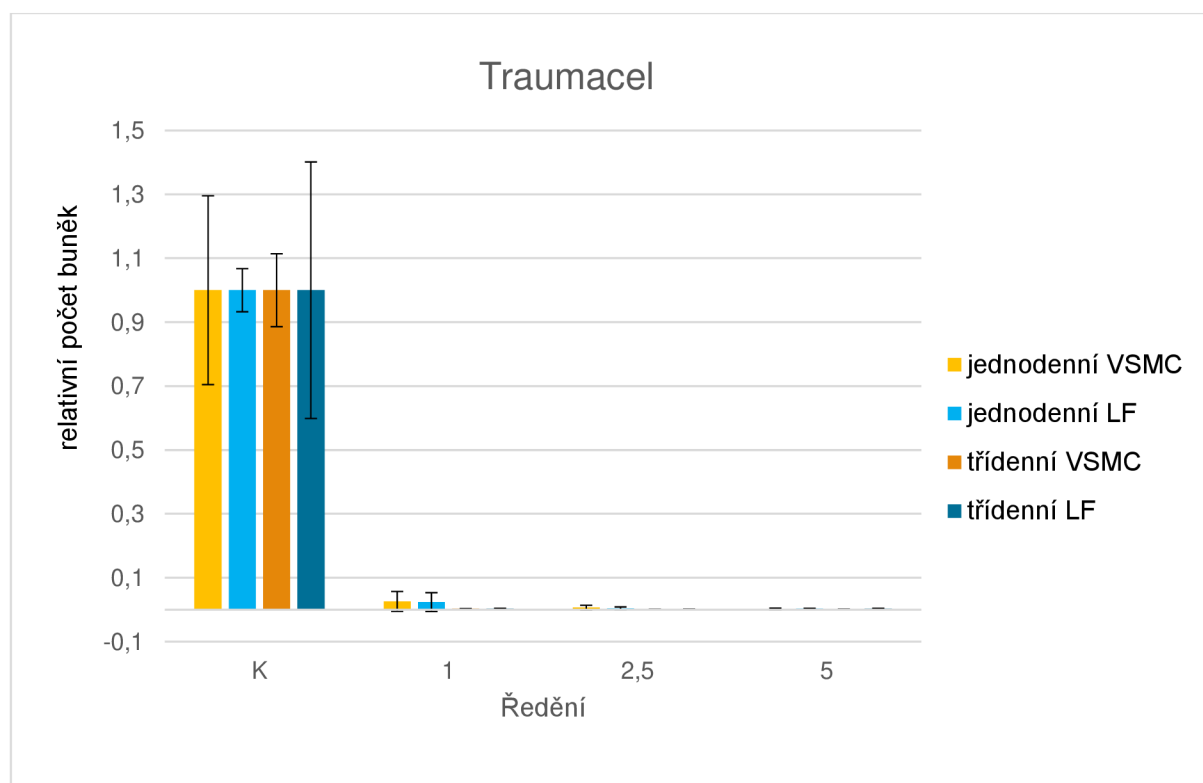
U buněk LF v kombinaci s nanomateriálem PCL s Cu (obrázek 38) jsou vidět opět lepší výsledky než u těchto buněk s mikromateriálem StopBac. U ředění 5; 10 a 20 je vidět, že při třídním měření jsou výsledky proliferace lepší při metodě s třepáním. U jednodenních měření je proliferace naopak lepší při metodě bez třepání. Při porovnání jednodenních a třídních měření je u tohoto typu buněk lepší proliferace při třídních měřeních.



Obrázek 38: Výsledky kultivace buněk LF s výluhy z PCL s Cu. Materiály byly luhovány 1 a 3 dny metodou s třepáním a bez třepání.

Posledním testovaným materiálem této práce byl Traumacel obsahující chlorhexidin (obrázek 39). Tento mikromateriál se ukázal jako nejvíce toxický. Výsledky proliferace buněk byly velmi špatné. Nedocházelo k téměř žádnému množení buněk. Z těchto výsledků lze vyvodit vysokou toxicitu tohoto mikromateriálu. V jiných studiích, kde byl tento materiál použit pro léčbu zranění u konkrétních pacientů jsou výsledky nejasné. V některých případech došlo ke zlepšení hojení, k zacelení rány a uzdravení pacienta. V jiných případech nebyly výsledky hojení příliš znatelné [52]. Naopak oproti publikaci [53] jsou naše výsledky velice odlišné. Publikace [53] označuje mikromateriál Traumacel jako výborný prostředek pro léčbu ran. V těchto publikacích je popisováno signifikantní snížení cytokínu TNF- $\alpha$ , který se účastní první fáze hojení ran. Ve větším množství je přítomen i při chronických onemocněních, kde stimuluje produkci MMP a tím znesnadňuje zavření rány. Signifikantní snížení TNF- $\alpha$  znamená snížení zánětlivé odpovědi a potlačení produkce MMP a tím spojené rychlejší uzavření rány [53].

Oproti našim měřením, která probíhala *in vitro* v laboratořích byla měření těchto studií prováděna *in vivo* na pacientech, což je příčinou rozdílných výsledků. I tato studie ovšem naznačuje nejednoznačnost výsledků, proto je studium a testování tohoto materiálu velice důležité a je nutné provádění dalších testů, aby mohly být cytotoxické účinky tohoto komerčně prodáváného mikromateriálu zcela vyloučeny.



Obrázek 39: Výsledky kultivace buněk VSMC a LF s výluhy z Traumacelu. Materiály byly luhovány 1 a 3 dny metodou s třepáním a bez třepání.

Po shrnutí výsledků nanomateriálu PCL s Cu byly pozorovány cytotoxické účinky jen při malých zředěních výluhů. Tento nanomateriál má velký potenciál pro uplatnění v biomedicíně, jelikož při správně zvolených ředěních vykazuje dobré biokompatibilní vlastnosti a podporuje regeneraci buněk. Ionty mědi jsou pro organismus mimo jiné potřebné i pro syntézu kolagenu, pro stimulaci produkce vaskulárního endotelového růstového faktoru a pro posílení angiogeneze [54].

Při srovnání citlivosti jednotlivých linií k iontům stříbra a mědi je zřetelné, že nejodolnější vůči toxickému působení stříbra ve vyšších koncentracích je linie HaCaT. Tento jev již byl pozorován dříve [54] a je spojen se schopností akumulovat značné množství stříbra bez následků. Proto je překvapivým výsledkem to, že podobná schopnost není vůči iontům mědi, kdy je linie HaCaT naopak nejvíce citlivá.

I v publikaci [54] byly mimo jiné zkoumány antimikrobiální vlastnosti nanovláken PCL s Cu. Antimikrobiální aktivita byla studována vůči nejčastějším patogenním mikroorganismům, konkrétně vůči Gram-negativním *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* a vůči Gram-pozitivní *S. aureus*. Testy byly prováděny kultivováním jednotlivých kmenů mikroorganismů (koncentrace mikroorganismů byla  $0.675\text{--}2.5 \cdot 10^5$  kolonií na ml) se vzorky nanomateriálu (kruhové vzorky o průměru 0,5 cm) v 300  $\mu\text{l}$  média po dobu 24 hodin. Množství životaschopných bakterií bylo po 24 hodinách kultivace stanoveno sečtením jednotlivých živých kolonií. Získané výsledky ukázaly, že nanomateriály na bázi PCL – Cu a PCL – Cu – COOH (obsahující aktivní COOH skupiny) spolehlivě zpomalují růst bakterií *E. coli* a *S. aureus*. Naopak proti bakteriím *S. typhimurium* a *P. aeruginosa* neměly nanomateriály s Cu významné antimikrobiální účinky. Tento jev pravděpodobně souvisí s rozdílnou citlivostí mědi vůči různým bakteriálním kmenům. Bakterie mají řadu rozdílných obranných mechanismů proti toxickým účinkům iontů mědi. Koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  vyluhovaná z připravených vrstev PCL-Cu je tedy pravděpodobně nedostatečná pro vyvolání antibakteriálních účinků proti *S. typhimurium* a *Ps. aeruginosa* [54].

Protože materiály vyvinuté v této práci mají velký potenciál pro biomedicínské použití, včetně regenerativní medicíny, musí vykazovat biokompatibilitu a schopnost aktivace regenerační činnosti buněk. Proto byly v publikaci [54] prováděny také testy kultivace buněk s výluhy z nanomateriálů obsahující Cu, podobné testům prováděným v této bakalářské práci. Pro testy této studie byly použity lidské mezenchymální stromální buňky extrahované z kostní dřeni. Tyto buňky byly podrobeny testům přímé kultivace s nanomateriály. Při dalších testech byly buňky vysety na 96 – jamkovou destičku (v množství 7000 buněk/jamka) společně s výluhy z nanomateriálů (které byly připraveny luhováním kruhových vzorků nanomateriálů o průměru 0,5 cm v 200  $\mu\text{l}$  média po dobu 1 hodiny) a následně byly inkubovány 72 hodin v 5 % atmosféře  $\text{CO}_2$ . Výsledky byly získány pomocí metody MTT a metody fluorescenční mikroskopie (při vlnové délce 570 nm). Pro metodu fluorescenční mikroskopie byly vzorky inkubovány při 37 °C ve tmě s barvicím roztokem po dobu 30 minut. Živé buňky se vyznačovaly přítomností zelené fluorescence. Výsledky přímé kultivace PCL-Cu a PCL-Cu-COOH s buňkami měly vysokou úmrtnost v důsledku vysoké koncentrace iontů mědi. Další výsledky ukázaly, že při koncentracích mědi v roztoku nižších než 0,87 g/l dosahuje přežití buněk 80 %. Kultivací mezenchymálních stromálních buněk s výluhy z nanomateriálů po dobu 1 hodiny prokázalo zvýšení biokompatibility, jelikož počet adherovaných buněk na povrchu nanomateriálu byl výrazně vyšší. Funkční aktivita buněk, hodnocená fluorescenčním barvivem byla ovšem nízká. Z toho důvodu byly prováděny další experimenty kultivací buněk s výluhy, ve kterých byla zkoumána různá ředění výluhů. Výsledky těchto testů ukázaly, že přežití buněk se významně zvyšuje se zvyšujícím se ředění výluhu [54].

Závěrem této studie bylo ověřeno, že mědi potažená PCL nanovláknem vykazovala antibakteriální účinek proti *E. coli* a *S. aureus* díky rychlému uvolňování iontů  $\text{Cu}^{2+}$  (při koncentraci až 3,4 g/ml) a vykazovala také dostatečnou biokompatibilitu. Tato vlákna mohou tedy vykazovat zajímavý efekt při hojení ran. Na jedné straně rychlé uvolnění iontů mědi zabíjí bakterie, na druhé straně stimuluje regeneraci a aktivaci imunitních buněk. Do budoucna by bylo vhodné snížit koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  na optimální úroveň. Vliv mědi na regeneraci tkání byl obrovský, nanovláknem vyvinuté v této práci mají vynikající vyhlídky pro budoucí výzkum [54].



## 5. ZÁVĚR

Výzkum a vývoj materiálů, které by usnadnily hojení ran je v současné době velmi diskutovaným tématem. Kožní onemocnění postihují mnoho lidí, ať už se jedná o rány akutní způsobené popálením, pořezáním či jiným zraněním nebo o rány chronické způsobené nemocemi jako je lupénka nebo jako vedlejší účinek onemocnění diabetes mellitus. Všechna tato poranění jsou velice nepříjemná a bolestivá. Materiály, které by usnadnily jejich hojení, by mohly zlepšit kvalitu života mnoha pacientů.

V současné době je na trhu již několik produktů, které jsou na bázi antimikrobiálního nanovlákněného materiálu obsahujícího léčbu podporující látky. Mezi tyto léčbu podporující látky patří například chitosan, lignin, měď nebo stříbro. Výrobci těchto produktů se snaží o začlenění léčbu podporujících látek na nanovlákněné membrány. Možnou metodou výroby je magnetronové naprašování.

Negativní stránkou těchto produktů je jejich možná toxicita. Před uvedením na trh je nutné tyto materiály podrobit testům toxicity, aby došlo k vyloučení možného rizika pro pacienta.

V experimentální části této práce byl připraven antimikrobiální kryt na bázi polykaprolaktonu obohacený o ionty mědi metodou magnetronového naprašování v laboratořích CEITEC Nano v Brně.

V další části této bakalářské práce byly studovány tři materiály. Konkrétně se jednalo o komerční produkty StopBac sterile, který obsahuje ionty stříbra a Traumacel Biodress Disinfect obsahující chlorhexidin. Dále byl zkoumán nanomateriál produkovaný laboratořemi CEITEC Nano v Brně, obsahující ionty mědi. Tyto materiály byly podrobeny SEM a EDX analýzám, pomocí kterých byla zkoumána morfologie a složení jednotlivých materiálů. Dále byly prováděny testy těchto materiálů s lidskými fibroblasty, lidskými keratinocyty a potkaními buňkami cévní hladké svaloviny pomocí výluhů z materiálů. Cílem práce bylo otestovat především toxicitu jednotlivých materiálů a srovnat komerčně prodávané antimikrobiální kryty ran s námi připraveným nanomateriálem.

Výsledky ukázaly toxicitu jednotlivých produktů při různých ředěních. V rámci experimentální části byl studován vliv doby inkubace a vliv třepání výluhu na množení buněk. Materiály s nejlepšími výsledky proliferace buněk s výluhy při ideálních ředěních byly materiály Stopbac a nanomateriál PCL obsahující ionty mědi. Nejvyšší míru cytotoxicity vykazoval mikromateriál značky Traumacel.

Dle mého názoru mají materiály obsahující ionty stříbra a mědi velký potenciál do budoucna, jelikož nejsou dosud na trhu obvazové a jiné krycí materiály, které by vykazovaly takové antimikrobiální účinky jako tyto látky. Do budoucna by vývoj těchto materiálů mohl velice přispět k efektivnějšímu, účinnějšímu a rychlejšímu léčení kožních poranění a onemocnění. Je ovšem nutné zajistit v této oblasti dostatečný výzkum před uvedením na trh, abychom mohli na sto procent vyloučit možné toxické účinky na lidské zdraví. Důležitý je i výzkum možných kombinací antimikrobiálních látek s jinými, pro lepší a účinnější vlastnosti těchto krytů.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DVOŘÁK, Pavel. *Biomedicínské aplikace polykaprolaktonových nanovláknenných membrán*. [online] Brno, 2021 [cit. 2. února 2021]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/132039>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Lenka Zajíčková
- [2] NĚMČÁKOVÁ, Ivana, Lucie BLÁHOVÁ, Petr RYŠÁNEK, Andreu BLANQUER, Lucie BAČÁKOVÁ a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Behaviour of Vascular Smooth Muscle Cells on Amine Plasma-Coated Materials with Various Chemical Structures and Morphologies. Brno, 2020. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*. **21**(24). Dostupné z: doi:10.3390/ijms21249467
- [3] VEČEŘOVÁ, Renata. *Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita*. Olomouc, 2016 [online]. [cit. 5. února 2021] Ústav mikrobiologie LF UP v Olomouci. *KLINICKÁ FARMAKOLOGIE A FARMACIE*. **30**(3): 18-20. Dostupné na www: <https://www.solen.cz/pdfs/far/2016/03/04.pdf>
- [4] XU, Li, Yi-Yi WANG, Jie HUANG, Chun-Yuan CHEN, Zhen-Xing WANG a Hui XIE. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. Changsha, Hunan, China, 2020. *Theranostics*. **10**(20), 8996-9031. Dostupné z: doi:10.7150/thno.45413
- [5] MITRA, Debirupa, En-Tang KANG a Koon Gee NEOH. Antimicrobial Copper-Based Materials and Coatings: Potential Multifaceted Biomedical Applications. Kent Ridge, Singapore, 2019. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **19**(12), 21159–21182. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.9b17815
- [6] LIU, Rui, Chuanling SI, Chunyang ZHENG, Kai WANG, Chunlin XU a Lin DAI. Lignin-Based Micro – and Nanomaterials and their Composites in Biomedical Applications. China, 2020. *CHEMSUSCHEM*. **13**(17), 4266–4283. Dostupné z: doi:10.1002/cssc.202000783
- [7] GROSSMAN, Adam a Wilfred VERMERRIS. Lignin-based polymers and nanomaterials. Gainesville, USA, 2019. *CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY*. (56), 112-120. Dostupné z: doi: 10.1016/j.copbio.2018.10.009
- [8] FIGUEIREDO, Patrícia, Hélder A. SANTOS, Mauri A. KOSTIAINEN, Jouni T. HIRVONEN a Kalle LINTINEN. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. Helsinki, Finland, 2018. *PROGRESS IN MATERIALS SCIENCE*. (93), 233-269. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pmatsci.2017.12.001
- [9] *Oficiální výukové stránky Fakulty sportovních studií Masarykovy univerzity v Brně* [datovába online]. [cit. 25. února 2021]. Dostupné z URL: [https://is.muni.cz/do/fsps/elearning/zaklady\\_anatomie/zakl\\_anatomiell/pages/kuze.html](https://is.muni.cz/do/fsps/elearning/zaklady_anatomie/zakl_anatomiell/pages/kuze.html)
- [10] FLEISCHMANN, Jaroslav a Rudolf LINC. *Anatomie člověka II*. 2. vyd. Brno, 1964. ISBN 14-375-73.
- [11] Selavis: *Kůže* [online]. [cit. 2. dubna 2021]. Dostupné z: <https://www.selavis.cz/kuze/#&gid=1&pid=1>.
- [12] LOOMIS, Kristin H., Susan K. WU, Amanda ERNLUND, Kristina ZUDOCK, Allison RENO, Kianna BLOUNT a David K. KARIG. A mixed community of skin microbiome representatives influences cutaneous processes more than individual members. Clemson, USA, 2021. *MICROBIOME*. **9**(22). Dostupné z: doi: 10.1186/s40168-020-00963-1

- [13] FUCHS, Christiane, Linh PHAM, Jermaine HENDERSON, Katherine J. STALNAKER, R. Rox ANDERSON a Joshua TAM. Multi-faceted enhancement of full-thickness skin wound healing by treatment with autologous micro skin tissue columns. Boston, USA, 2021. *SCIENTIFIC REPORTS*. (11). Dostupné z: doi: 10.1038/s41598-021-81179-7.
- [14] KOSTKA, Rodomil. *Druhy ran, operační rána, poruchy hojení: Studijní materiál k přednášce Chirurgické obory*. Univerzita Karlova, Praha, 6 s.
- [15] WALD, Martin. Hojení ran za patologických podmínek. Chirurgická klinika UK, 2. LF a FN Motol Praha, 2002. *INTERNÍ MEDICÍNA PRO PRAXI*. (10), 494–498. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2002/10/04.pdf>
- [16] ITO, Daisuke, Hiroyasu ITO, Takayasu IDETA, Kanbe AYUMU, Soranobu NINOMIYA a Masahito SHIMIZU. Systemic and topical administration of spermidine accelerates skin wound healing. Gifu City, Japan, 2021. *CELL COMMUNICATION AND SIGNALING*. **19**(1). Dostupné z: doi:10.1186/s12964-021-00717-y
- [17] MA, Yicong, Jing XIE, Wijaya CHANDRA SUGIARTO a Suchong XU. From wound response to repair – lessons from *C. elegans*. Hangzhou, China, 2021. *CELL REGENERATION*. **10**(1). Dostupné z: doi: 10.1186/s13619-020-00067-z
- [18] KAWASUMI, Aiko, Natsume SAGAWA, Shinichi HAYASHI, Hitoshi YOKOYAMA a Koji TAMURA. Wound Healing in Mammals and Amphibians: Toward Limb Regeneration in Mammals. Sendai, Japan, 2013. *CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY*. Dostupné z: doi:10.1007/82\_2012\_305.
- [19] PALUMBO, V.D., Stefano RIZZUTO, Giuseppe DAMIANO, Salvatore FAZZOTTA, Andrea GOTTARDO, Giuseppina MAZZOLA a Attilio Ignazio LO MONTE. Palermo, Italy, 2021. Use of platelet concentrate gel in second-intention wound healing: a case report. *JOURNAL OF MEDICAL CASE REPORTS*. **15**(1). Dostupné z: doi:10.1186/s13256-020-02649-6
- [20] MATTER, Martin T., Sebastian PROBST, Severin LAEUCHLI a Inge K. HERRMANN. Uniting Drug and Delivery: Metal Oxide Hybrid Nanotherapeutics for Skin Wound Care. Zurich, Switzerland, 2020. *PHARMACEUTICS*. **12**(8), 780. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12080780
- [21] KETABCHI, Najmeh, Rassoul DINARVAND, Mandi ADABI, Mandi GHOLAM, Saman FIROOZI, Bentolhoda AMANZADI a Reza FARIDI-MAJIDI. Study of Third-Degree Burn Wounds Debridement and Treatment by Actinidin Enzyme Immobilized on Electrospun Chitosan/PEO Nanofibers in Rats. Teheran, Iran, 2020. *BIOINTERFACE RESEARCH IN APPLIED CHEMISTRY*. **11**(3), 10358-10370. Dostupné z: doi:10.33263/BRIAC113.1035810370
- [22] ARAGON-SANCHEZ, Javier, Gerardo VIQUEZ-MOLINA, Maria Eugenia LOPEZ-VALVERDE, Jose Maria ROJAS-BONILLA a Christian MURILLO-VARGAS. Surgical Diabetic Foot Infections: Is Osteomyelitis Associated with a Worse Prognosis? Spain, 2021. *INTERNATIONAL JOURNAL OF LOWER EXTREMITY WOUNDS*. Dostupné z: doi:10.1177/1534734620986695
- [23] LAIVA, Ashang L., Fergal J. O'BRIEN a Michael B. KEOGH. SDF-1 alpha Gene-Activated Collagen Scaffold Restores Pro-Angiogenic Wound Healing Features in Human Diabetic Adipose-Derived Stem Cells. Dublin, Ireland, 2021. *BIOMEDICINES*. **9**(2). Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines9020160
- [24] PHLLIPS, Taylor, HUITEMA, Rodrigo CEPEDA, et al. Aberrant recruitment of leukocytes defines poor wound healing in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. 2020. *JOURNAL OF DERMATOLOGICAL SCIENCE*. **100**(3), 209–216. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.10.009

- [25] RIHOVA, Martina, Ahmet Erdem INCE, Veronika CICMANCOVA, Ludek HROMADKO, Klara CASTKOVA, David PAVLINAK, Lucy VOJTOVA, Jan M. MACAK. Water-born 3D nanofiber mats using cost-effective centrifugal spinning: comparison with electrospinning process: A complex study. Brno, 2020. *JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE*. Dostupné z: doi: 10.1002/app.49975
- [26] KODALI, Deepa, Farooq SYED, Shaik J. EELANI, Vijaya K. RANGARI. Fabrication and characterization of forcespun polycaprolactone microfiber scaffolds. USA, 2020. *MATERIALS RESEARCH EXPRESS* 7(12). Dostupné z doi: 10.1088/2053-1591/abcac1
- [27] PETRÁŠ, David, Dušan KIMMER, Karel SOUKUP a Petr KLUSOŇ. Bezpečná nanovlákná [online]. Ústav chemických procesů, Akademie věd České republiky, Praha, 2009. *CHEMICKÉ LISTY*. (103), 1009-1016. Dostupné z: <https://adoc.pub/bezpena-nanovlakna-david-petra-a-duan-kimmer-a-karel-soukup-.html>
- [28] ZHU, Mengna, Meijie YU, Qiong MAO a Chengguo WANG. Comparison of Structure and Electrical Properties between Carbon Nanofibers and Microfibers. Jinan, China, 2016. *JOURNAL OF SOLID STATE SCIENCE AND TECHNOLOGY*. 5(7). Dostupné z: doi: 10.1149/2.0251607jss
- [29] MIGUEL, Sónia P., Daniela R. FIGUEIRA, Déborah SIMÕESA, Ilídio J. CORREIA, Paula FERREIRA, Paula COUTINHO a Maximiano P. RIBEIRO. Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. Portugal, 2018. *COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES*. (169), 60–71. Dostupné z: doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.05.011
- [30] DESHKMUKH, K., M. BASHEER AHMED, R.R. DESHKMUKH, S.K. KADHEER PASHA, P.R. BHAGAT a K. CHIDAMBARAM. 3 - Biopolymer Composites With High Dielectric Performance: Interface Engineering. India, 2017. *BIOPOLYMER COMPOSITES IN ELECTRONICS*. 27-128. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809261-3.00003-6
- [31] MÜLLEROVÁ, Senta. *Inkorporace antibiotik do biodegradabilních nanovláknenných vrstev pro nové medicínské aplikace*. 2021, Liberec. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.
- [32] IL'INA, Alla V., Balzhima Ts. SHAGDAROVA, Alexey P. LUNKOV a Valery P. VARLAMOV. The formation of hydrogels based on chitosan and its water-soluble derivatives. Moscow, Russia, 2020. *PROGRESS ON CHEMISTRY AND APPLICATION OF CHITIN AND ITS DERIVATIVES*. (25). Dostupné z: doi:10.15259/PCACD.25.001
- [33] BANDARA, Subhani, Hongbo DU, Laura CARSON, Debra BRADFORD a Raghava KOMMALAPATI. Agricultural and Biomedical Applications of Chitosan-Based Nanomaterials. Prairie View, USA, 2020. *NANOMATERIALS*. (10). Dostupné z: doi:10.3390/nano10101903
- [34] SHUKLA, Sudheesh K., Ajay K. MISHRA, Omotayo A. AROTIBA a Bhekia B. MAMBA. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. Johannesburg, South Africa, 2013. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*. (59), 46-58. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043.
- [35] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace [online]. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2009. *CHEMICKÉ LISTY*. (103), 56-65. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_01\\_56-65.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf)
- [36] RASHKI, Somaye a Kasra ASGARPOUR, et al. Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections. 2021. *CARBOHYDRATE POLYMERS*. (251). Dostupné z: doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117108

- [37] PUbChem, *Chlorhexidine* [online]. [cit. 10. května 2022]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorhexidine#section=2D-Structure>
- [38] Melgisorb Ab, *Antimikrobiální alginátové krytí pro mírně až silně exsudující rány* [online]. [cit. 15. dubna 2021]. Dostupné z: <https://www.molnlycke.cz/produkty-reseni/melgisorb-ag/>
- [39] StopBac STERILE Kompres na chronické rány [online]. [cit. 15. dubna 2021]. Dostupné z: <https://www.stopbac.cz/stopbac-sterile-kompres-na-chronicke-rany-10x10-cm-5-ks/>
- [40] Použití inovovaného Traumacelu Biodress při léčbě chronických ran [online]. [cit. 15. dubna 2021]. Dostupné z: <http://www.traumacel.cz/aktuality/jedinen-komfort-v-lb-ran-traumacel-biodress-comfort-a-disinfect>
- [41] AQUACEL® Ag Foam [online]. [cit. 15. dubna 2021]. Dostupné z: <https://www.convatec.cz/hojeni-ran/aquacel/aquacel-ag-foam/#>
- [42] TECHNOLOGIE NANOSPIDER™ [online]. [cit. 29. dubna 2021]. Dostupné z: <https://www.elmarco.cz/ns-technologie>
- [43] Metodické centrum konzervace Technického muzea v Brně, *Jednoduché metody identifikace polymerů v muzejní praxi* [online]. [cit. 30. dubna 2021]. Dostupné z: <https://mck.technicalmuseum.cz/wp-content/uploads/2017/12/Polymery.pdf>
- [44] INOSPIN [online]. [cit. 19. května 2022]. Dostupné z: <https://inocure.cz/cs/nanotechnology-devices/?#inospin>
- [45] What is SEM? Scanning Electron Microscopy Explained [online]. [cit. 19. května 2022]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/blog/microscopy/what-is-sem-scanning-electron-microscopy-explained/>
- [46] EDX Analysis with SEM: How Does it Work? [online]. [cit. 19. května 2022]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/blog/microscopy/edx-analysis-with-sem-how-does-it-work/>
- [47] Magnetron sputtering system BESTEC (MAGNETRON) [online]. [cit. 10. května 2021]. Dostupné z: <http://nano.ceitec.cz/magnetron-sputtering-system-bestec-magnetron/>
- [48] Skenovací elektronový mikroskop (SEM) MIRA3 XMU (MIRA3-XMU) [online]. [cit. 15. května 2022]. Dostupné z: <https://www.ceitec.cz/skenovaci-elektronovy-mikroskop-sem-mira3-xmu/e1538>
- [49] Focused Ion Beam/Scanning Electron Microscope TESCAN LYRA3 (LYRA) [online]. [cit. 15. května 2022]. Dostupné z: <https://www.ceitec.cz/focused-ion-beam-scanning-electron-microscope-tescan-lyra3/e1153>
- [50] Vlákna StopBac [online]. [cit. 24. května 2022]. Dostupné z: <https://www.stopbac.cz/chronicke-rany/>
- [51] OLIVERIUS, M, DROZD, J, BRATKA, P, WHITLEY, A, MOHLENIKOVA DUCHONOVA, B, GÜRLICH, R. A new silver dressing, StopBac, used in the prevention of surgical site infections. 2022. *INTERNATIONAL WOUND JOURNAL*. (19), 29–35. Dostupné z doi: 10.1111/iwj.13593
- [52] HOFMAN, D., J. WILSON, S. POORE, G. CHERY a T. RYAN. Can Traumacel be used in the treatment of chronic wounds? Oxford, UK, 2000. *JOURNAL OF WOUND CARE*. 9(8). Dostupné z: doi:10.12968/jowc.2000.9.8.26280

- [53] FRÁNKOVÁ, Jana, Veronika PIVODOVÁ a Jitka ULRICHOVÁ. *Porovnání vlivu Traumacelu Biodressu, vlhké terapie a klasické terapie na produkci matrixových metaloproteináz a TNF- $\alpha$  (pilotní studie)* [online]. Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc; Ústav translační medicíny LF UP Olomouc. Dostupné z: <http://www.hojeniran.cz/moderni-lecba/infekce/Dr.%20Frankov%C3%A1,%20%C4%8DI%C3%A1nek%20o%20MMP%20do%20Hojen%C3%AD%20ran.pdf>
- [54] MANAKHOV, A.M.; SITNIKOVA, N.A.; TSYGANKOVA, A.R.; ALEKSEEV, A.Y.; ADAMENKO, L.S.; PERMYAKOVA, E. BAIDYSHEV, V.S.; POPOV, Z.I.; BLAHOVÁ, L.; ELIÁŠ, M.; et al. Electrospun Biodegradable Nanofibers Coated Homogenously by Cu Magnetron Sputtering Exhibit Fast Ion Release. Computational and Experimental Study. Brno, 2021. *MEMBRANES*. (11), 965. Dostupné z doi.:10.3390/membranes11120965
- [55] PERDE-SCHREPLER, MARIA, ADRIAN FLOREA, IOANA BRIE, PIROSKA VIRAG, EVA FISCHER-FODOR, ANGELA VÂLCAN, EUGEN GURZĂU, COSMIN LISENCU, ALMA MANIU, "Size-Dependent Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Cochlear Cells *In Vitro*". 2019. *JOURNAL OF NANOMATERIALS*. Dostupné z: doi: 10.1155/2019/6090259