

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



MECHANISMUS HOJENÍ KOŽNÍ RÁNY
PŘI ZÁNĚTU

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2020

Ing. Jana Juráňová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Ing. Jana Juráňová

MECHANISMUS HOJENÍ KOŽNÍ RÁNY
PŘI ZÁNĚTU

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitelka: Mgr. Jana Franková, Ph.D.

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2013 – 2020.

Bibliografické identifikace

Jméno a příjmení autora: Ing. Jana Juráňová

Název disertační práce: Mechanismus hojení kožní rány při zánětu

Název disertační práce anglicky: The Mechanisms Underlying Wound Healing during Inflammation

Studijní program: Lékařská chemie a klinická biochemie

Školitel: Mgr. Jana Franková, Ph.D.

Rok obhajoby: 2020

Klíčová slova v češtině: hojení ran, zánět, silymarin, NF- κ B, cytokiny, rekonstruovaná lidská epidermis

Klíčová slova v angličtině: wound healing, inflammation, silymarin, NF- κ B, cytokines, reconstructed human epidermis

Tato práce byla podpořena vnitřními granty IGA UPOL (LF_2014_014; LF_2015_007; LF_2016_012; LF_2017_011; LF_2018_012), a Národním programem udržitelnosti I (NPU I) Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSMT-7778/2014; LO 1304)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s využitím citované literatury. Použitou literaturu uvádím v příloženém seznamu literatury. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne

.....

Ing. Jana Juráňová

Poděkování

Děkuji školitelce Mgr. Janě Frankové, Ph.D. za umožnění realizace disertační práce na velmi zajímavé a aktuální téma, jakým je hojení ran. Velmi si vážím jejího odborného vedení v průběhu postgraduálního studia a cenných rad při sepsání této disertační práce.

Poděkování patří také prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., přednostce Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP, za možnost podílet se na výzkumných projektech a vypracovat disertační práci na tomto pracovišti.

Děkuji kolegům za vytvoření příjemného pracovního prostředí a velice si vážím podpory mých přátel, rodiny, partnera Ing. et Ing. Filipa Brtny a syna Vojtěcha.

SOUHRN

Předmětem předložené disertační práce je studium hojivého účinku vybraných složek standardizovaného extraktu ze semen ostropestřce mariánského (silymarinu), jmenovitě silybinu, dehydrosilybinu a kvercetinu, a také posouzení potenciálního pro-/protizánětlivého působení nanočástic stříbra, s využitím primárních kultur lidských dermálních fibroblastů či epidermálních keratinocytů.

Teoretická část práce je shrnutím současných poznatků týkajících se hojení ran a klíčových molekul zapojených do zánětlivé fáze hojení. Jsou zde diskutovány mechanismy uplatnění přírodních látek (flavonoidů) a látek synteticky vyrobených (nanočástice stříbra) v hojení kožních ran.

První část této práce je zaměřena na analýzu možného protizánětlivého účinku vybraných flavonoidních látek. Zánět byl indukován přidáním bakteriálního lipopolysacharidu ke škrábnuté monovrstvě dermálních fibroblastů. Účinek přírodních látek byl srovnáván s účinkem nesteroidního protizánětlivého léčiva indometacinu. Nejúčinnější ze studovaných látek, dehydrosilybin, působil signifikantně, avšak ne zcela jednoznačně, na jednotlivé kroky prozánětlivých signálních drah. Jeho aplikace indukovala aktivaci transkripčních faktorů NF- κ B a AP-1 následovanou zvýšením množství mRNA chemokinu interleukinu-8. Byla rovněž pozorována určitá součinnost mezi dehydrosilybinem a bakteriálním lipopolysacharidem. Na druhou stranu však působením dehydrosilybinu došlo ke snížení koncentrace prozánětlivých cytokinů produkovaných fibroblasty, infikovanými bakteriálním lipopolysacharidem.

V navazující části byly uvedené přírodní látky aplikovány na *in vitro* model rekonstruované lidské epidermis. Diferenciace keratinocytů, umožněná trojrozměrnou kultivací, je nezbytná k formování bariérových vlastností kůže a lépe simuluje skutečnou strukturu epidermis ve srovnání s monovrstvou buněk. Na trojrozměrném modelu nebyly vlivem žádné z aplikovaných látek pozorovány negativní změny v morfologii či produkci prozánětlivých interleukinů. Naopak na surfaktantem poškozené epidermis došlo po aplikaci nejnižší studované koncentrace dehydrosilybinu ke zmírnění nežádoucích morfologických změn. Efekt byl

srovnatelný s účinkem indometacinu ve stejné koncentraci. Dehydrosilybin proto představuje možnou přírodní alternativu k tradičním protizánětlivým léčivům. S ohledem na některé účinky je však třeba především u kůže postižené chronickým zánětlivým onemocněním podpořit jeho použití dalšími studiemi.

Poslední část byla věnována nanočásticím stříbra, příp. stříbrným iontům, které jsou považovány za významné mediátory účinku nanočástic. Ačkoliv jsou nanočástice již poměrně běžně topicky aplikovány, stále vzbuzují obavy, zda je jejich použití bezpečné. Za účelem posouzení bezpečnosti topické aplikace nanočástic stříbra byl využit *in vitro* model zdravé lidské epidermis. Studované koncentrace nanočástic či iontů stříbra nevyvolávaly morfologické odchylky či zvýšení prozánětlivých markerů, byly proto vyhodnoceny jako bezpečné.

Klíčová slova: hojení ran, zánět, silymarin, NF- κ B, nanočástice stříbra, rekonstruovaná lidská epidermis

SUMMARY

The present dissertation aims to investigate the wound healing activity of selected components of milk thistle seed extract (silymarin), namely silybin, dehydrosilybin and quercetin, and to assess the pro-/anti-inflammatory potential of silver nanoparticles, using primary cell cultures consisting of epidermal keratinocytes or dermal fibroblasts.

The theoretical part of this thesis summarizes current knowledge concerning the wound healing mechanisms and key molecules that influence the inflammatory phase of healing. The thesis discusses the application of natural substances (flavonoids) and synthetically produced substances (silver nanoparticles) in skin wound healing.

The first section of the practical part is focused on the analysis of the possible anti-inflammatory activity of the selected flavonoid substances against inflammation induced by bacterial lipopolysaccharide in a scratch-wounded fibroblast monolayer model. The results have been compared to those obtained with a non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin. Despite being the most effective substance, dehydrosilybin was inconsistent in its impact on the individual steps of the pro-inflammatory signaling pathways. Dehydrosilybin's application induced activation of transcription factors NF- κ B and AP-1 followed by an increase in interleukin-8 mRNA level. Its ability to synergize with lipopolysaccharide was also observed. On the other hand, dehydrosilybin reduced the amounts of pro-inflammatory cytokines released from fibroblasts infected with bacterial lipopolysaccharide.

In the following part, these natural substances were applied topically to an *in vitro* model of reconstructed human epidermis. Three-dimensional cultivation promote keratinocyte differentiation that contributes to the establishment of skin's barrier properties. Thus, three-dimensional model more closely resembles reality compared to the monolayer cell culture model. The three-dimensional model exhibited normal morphology and no variations in levels of inflammatory biomarkers following the addition of any of the analysed substances. Actually, the

opposite was observed in a case of surfactant-damaged epidermis. At the lowest concentration, dehydrosilybin diminished undesirable morphological changes produced by surfactant. The effect was comparable to that induced by indomethacin. Therefore, dehydrosilybin represents a natural alternative to conventional anti-inflammatory medicine. However, in view of the conflicting results, its usage should be further revised, particularly in the skin affected by chronic inflammatory disease.

The last section of the practical part is devoted to silver nanoparticles and ions, which are supposed to be important mediators of nanoparticles' action. Despite the fact that nanoparticles are commonly used in topical applications, there are still concerns about the patients' safety. In this work, the *in vitro* model of healthy human epidermis was used to assess the safety of topical application of silver nanoparticles. As no morphological deformities or elevation of inflammatory markers has been observed, the silver nanoparticles are considered safe to be topically used.

Key words: wound healing, inflammation, silymarin, NF- κ B, silver nanoparticles, reconstructed human epidermis

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| Souhrn | 7 |
| Summary | 9 |
| 1 Úvod | 1 |
| 2 Současný stav problematiky | 3 |
| 2.1 Fyziologické hojení kožní rány | 3 |
| 2.1.1 Hemostáza | 4 |
| 2.1.2 Zánětlivá fáze | 5 |
| 2.1.3 Proliferační fáze | 6 |
| 2.1.4 Remodelace (maturace)..... | 7 |
| 2.1.5 Patologické hojení kožní rány..... | 7 |
| 2.1.6 Bakteriální kontaminace..... | 9 |
| 2.1.7 Nukleární faktor <i>kappa</i> B při zánětu a hojení | 11 |
| 2.1.8 Transkripční faktor AP-1 při zánětu a hojení..... | 18 |
| 2.1.9 Přístupy k léčbě kožních ran | 21 |
| 2.1.10 Polyfenoly a hojení ran | 22 |
| 2.1.11 Nanočástice stříbra a hojení ran | 29 |
| 3 Cíle disertační práce | 35 |
| 4 Experimentální část | 36 |
| 4.1 Materiál a chemikálie | 36 |
| 4.1.1 Chemikálie | 36 |
| 4.1.2 Přístrojové vybavení..... | 37 |
| 4.1.3 Ostatní laboratorní materiál..... | 38 |
| 4.1.4 Roztoky pro práci s buněčnými kulturami | 39 |
| 4.1.5 Testovaný materiál | 40 |
| 4.1.6 Biologický materiál | 41 |
| 4.2 Postup izolace a kultivace primárních kultur | 41 |
| 4.2.1 Izolace NHEK | 42 |
| 4.2.2 Izolace NHDF | 43 |
| 4.3 Experimentální <i>in vitro</i> modely hojení ran se zánětem | 43 |
| 4.3.1 Monovrstva škrábnutých kožních buněk NHDF | 43 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3.2 | Trojrozměrný <i>in vitro</i> model RHE | 44 |
| 4.4 | Metody | 46 |
| 4.4.1 | MTT test | 46 |
| 4.4.2 | ELISA (enzymově značená imunovazebná analýza) | 47 |
| 4.4.3 | Western blot..... | 47 |
| 4.4.4 | Izolace RNA a reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-qPCR)..... | 48 |
| 4.4.5 | Gelová retardační analýza (EMSA)..... | 50 |
| 5 | Výsledky | 52 |
| 5.1 | Cytotoxický profil analyzovaných přírodních látek | 52 |
| 5.2 | Vliv DHS, SB, KVE a IND na sekreci prozánětlivých cytokinů | 53 |
| 5.3 | Analýza předpokládaných cílových proteinů protizánětlivého působení DHS, SB, KVE a IND pomocí Western blotu..... | 54 |
| 5.4 | Účinek DHS, SB, KVE a IND na hladinu exprese mRNA prozánětlivých genů | 57 |
| 5.5 | Vliv DHS na hladinu mRNA I κ B α | 60 |
| 5.6 | Analýza spolupůsobení DHS a LPS pomocí Western blotu..... | 61 |
| 5.7 | Vliv DHS na DNA-vazebnou aktivitu NF- κ B..... | 62 |
| 5.8 | Využití <i>in vitro</i> 3D modelu RHE k analýze působení vybraných složek silymarinu na lidskou epidermis při zánětu..... | 63 |
| 5.8.1 | Stanovení prozánětlivých interleukinů metodou ELISA..... | 64 |
| 5.8.2 | Histologická analýza morfologických změn RHE | 65 |
| 5.9 | Využití <i>in vitro</i> 3D modelu RHE k analýze účinku AgNČ či Ag ⁺ při topické aplikaci..... | 70 |
| 5.9.1 | Charakterizace velikosti a rozložení AgNČ v experimentálním roztoku.. | 70 |
| 5.9.2 | Stanovení prozánětlivých interleukinů metodou ELISA..... | 71 |
| 5.9.3 | Histologická analýza morfologických změn RHE po aplikaci AgNČ a Ag ⁺ | 73 |
| 6 | Diskuse..... | 75 |
| 7 | Závěry | 85 |
| 8 | Seznam prací vztahujících se k disertaci..... | 88 |
| 9 | Literatura | 90 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------------------|---|
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina |
| AgNČ | Nanočástice stříbra |
| AP-1 | Aktivační faktor-1 |
| APS | Persíran amonný |
| ATB | Antibiotika |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| BSA | Hovězí sérový albumin |
| cAMP | Cyklický adenosinmonofosfát |
| cDNA | Komplementární deoxyribonukleová kyselina |
| CK II | Kasein kináza II |
| COX-2 | Cyklooxygenáza-2 |
| DHS | Dehydrosilybin |
| DMEM | Eaglovo médium modifikované Dulbeccem |
| DMSO | Dimetylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| DTT | Ditiotreitol |
| ECM | Extracelulární matrix |
| EDTA | Etylendiamintetraoctová kyselina |
| EGF | Epidermální růstový faktor |
| ELISA | Enzymově značená imunovazebná analýza |
| ERK1/2 (5) | Extracelulárním signálem regulovaná kináza 1 a 2 (5) |
| FADD | Fas-asociovaný protein s doménou smrti |
| FBS | Fetální hovězí sérum |
| GM-CSF | Granulocytární – makrofágové kolonie stimulující faktor |
| HAM F12 | Hamovo médium F12 |
| Hepes | 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonová kyselina |
| HKGS | Suplementy pro růst lidských keratinocytů |
| HRP | Křenová peroxidáza |

| | |
|---|---|
| IgG | Imunoglobulin G |
| IκB (α) | Inhibitor nukleárního faktoru <i>kappa</i> -B (α) |
| IKK (α, β, γ) | Kináza inhibitoru nukleárního faktoru <i>kappa</i> -B (α , β , γ) |
| IL-1 (-6, -8, -10) | Interleukin-1 (-6, -8, -10) |
| IL-1β | Interleukin-1 <i>beta</i> |
| IL-1R | Receptor pro interleukin-1 |
| IND | Indometacin |
| JNK | c-Jun-N-terminální kináza |
| KBM-2 | Bazální médium pro keratinocyty |
| KGF | Keratinocytový růstový faktor |
| KGM-2 | Růstové médium pro keratinocyty |
| KVE | Kvercetin |
| LOX | Lipooxygenáza |
| LPS | Lipopolysacharid |
| Lys314/315 | Lysin 314/315 |
| MAPK | Mitogenem aktivované proteinkinázy |
| MAPKK | Kináza proteinkinázy aktivované mitogenem |
| MAP3K (1, 3) | Kináza kinázy proteinkinázy aktivované mitogenem (1, 3) |
| MMP-1 (-6, -8) | Matrixové metaloproteinázy-1 (-2, -9) |
| mRNA | Mediátorová ribonukleová kyselina |
| MTT | 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid |
| MyD88 | Myeloidní diferenační faktor 88 |
| NADPH | Redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát |
| NČ | Neutrální červeň |
| NF-κB | Nukleární faktor <i>kappa</i> -B |
| NHDF | Normální lidské dermální fibroblasty |
| NHEK | Normální lidské epidermální keratinocyty |
| NK | Negativní kontrola |
| NSAID | Nesteroidní protizánětlivá léčiva |
| PAMP | Molekulární motivy asociované s patogeny |
| PBS | Fosfátový pufr |

| | |
|------------------------|--|
| PDGF | Destičkový růstový faktor |
| PGE₂ | Prostaglandin E2 |
| PK | Pozitivní kontrola |
| PKA | Proteinkináza A |
| PLA2 | Fosfolipáza A2 |
| PMSF | Fenylmetansulfonyl fluorid |
| PRR | Receptory rozpoznávající patogenní vzory |
| P/S | Penicilin/streptomycin |
| PTGES | Prostaglandin endoperoxid syntáza |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RHE | Rekonstruovaná lidská epidermis |
| RIP | Protein interagující s receptorem |
| RIPA | Radioimunoprecipitační analýza |
| ROS | Reaktivní formy kyslíku |
| RT-qPCR | Reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce v reálném čase |
| SB | Silybin |
| SDS | Dodecylsírán sodný |
| SDS-PAGE | Dodecylsírán sodný-polyakrylamidová gelová elektroforéza |
| SEM | Standardní chyba průměru |
| Ser529 | Serin 529 |
| TAK1 | Kináza aktivovaná transformujícím růstovým faktorem <i>beta</i> |
| TBS | Tris-pufr |
| TBS-T | Tris-pufr s Tweenem |
| TIMP | Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz |
| TEM | Transmisní elektronová mikroskopie |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin |
| TGF-β | Transformující růstový faktor <i>beta</i> |
| TLR | Toll-like receptory |
| TNF-α | Tumor nekrotizující faktor <i>alfa</i> |
| TNFR | Receptor pro tumor nekrotizující faktor |

| | |
|------------------|---|
| TRAF6 (2) | Faktor 6 (2) asociovaný s receptorem pro tumor nekrotizující faktor |
| Tris | Tris-(hydroxymetyl)-aminometan |
| VEGF | Vaskulární endotelový růstový faktor |

1 ÚVOD

Kůže jako periferní orgán těla představuje ochranou bariéru organismu před okolním prostředím [1]. Vytvořením kožní rány dochází k narušení její protektivní funkce, čímž v exponovaném organismu výrazně vzrůstá riziko vzniku infekce [2].

Již v pátém století před našim letopočtem nejvýznamnější antický lékař Hippocrates zdůraznil význam zánětu, když poukázal na důležitost odstranění infekce v procesu hojení ('Ubi pus, ibi evacua') [1, 3]. Zánět je nezbytnou složkou hojivého procesu, jež zabrňuje pomnožení patogenů v ráně. Pro zachování fyziologického hojení je však nezbytné jeho řádné ukončení. V opačném případě se stává ničivým pro okolní zdravou tkáň a může vést ke vzniku nehojící se rány [4, 5]. Chronický zánět je predispozicí k tvorbě jizev [4, 6], ale také ke vzniku nádorového onemocnění [3]. Včasný přechod zánětlivé fáze do fáze proliferační hraje klíčovou roli v úspěšném zhojení kožní rány [4].

Udržení aseptického prostředí je proto nezbytné pro udržení normálního průběhu hojení [7]. Překrytí kožní rány umožňuje částečně nahrazovat narušené bariérové vlastnosti kůže. K eliminaci infekce jsou využívány krycí materiály s obsahem antibakteriálních a protizánětlivých složek [8]. V současnosti jsou hledány alternativy k tradičním protizánětlivým látkám a antibiotikům, s vyšší účinností a nižší cenou, které by současně snížily riziko vedlejších účinků a vzniku bakteriální rezistence [2, 8, 9].

Protizánětlivé látky jsou často zacíleny na významnou prozánětlivou signální dráhu nukleárního faktoru *kappa*-B NF- κ B [10, 11]. Účinek tohoto transkripčního faktoru v kůži je velice komplexní. Zatímco na počátku zánětu indukuje expresi prozánětlivých molekul eliminujících infekci, na jeho konci přispívá k expresi protizánětlivých genů [12, 13]. Přestože je nezbytný k udržení tkáňové homeostázy, za určitých okolností přispívá k patogenezí kožního zánětu [14]. Nepřiměřená aktivita NF- κ B může v ráně udržovat zánětlivou odpověď stálou aktivací neutrofilů a bránit tak jejímu zhojení [12]. Jeho prozánětlivý efekt může být stupňován vlastními produkty této signální dráhy [1]. Přičemž může také dojít k zapojení dalšího významného transkripčního faktoru AP-1 (aktivační faktor-1) [15].

Studium mechanismu účinků látek regulujících zánětlivou odpověď, jež jsou předmětem předkládané práce, může přispět k dalšímu pochopení složitého a striktně kontrolovaného procesu hojení, eliminovat vedlejší účinky protizánětlivých látek a umožnit rozvoj nových účinnějších terapeutických přístupů.

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Obecně lze kožní rány klasifikovat na akutní a nehojící se rány. Akutní rány jsou definovány jako porušení integrity tělesného krytu. Jsou charakterizovány fyziologickým průběhem hojení, kdy procházejí jednotlivými navazujícími fázemi ve stanoveném pořadí. Zpravidla nevykazují jakékoliv znaky hojení déle než tři měsíce. Naproti tomu rány, u nichž se zlepšení neprojeví do čtyř týdnů od jejich vzniku, a průběh hojení je zatížen komplikacemi, označujeme jako nehojící se rány (např. diabetické či tlakové vředy) [8]. U nehojících se ran nedojde k obnově funkce ani po uplynutí tří měsíců [16].

V současné době je na hojení rány pohlíženo jako na dynamický, komplexní a ne zcela lineární systém, organizovaný do několika vzájemně regulovaných úrovní. Hojení zahrnuje spoluúčast různých buněčných typů (fibroblastů, neutrofilů, makrofágů aj.), mediátorů (cytokinů, chemokinů, růstových faktorů, hormonů), produktů biosyntézy (kolagenu, proteoglykanů atd.) a enzymů (metaloproteináz, cyklooxygenáz). Jednotlivé buňky mohou být kontrolovány stejnými mediátory autokrinně i parakrinně a výsledná reakce může být zesílena, nebo potlačena. Uvnitř buněk je prostřednictvím transmembránových receptorů (Toll-like receptory; TLR) aktivována řada molekulárních drah, které zesilují buněčnou odpověď. Často jsou přítomny signální kaskády, které působí protichůdně. Konečná odpověď je tak výsledkem komplexní souhry jejich vzájemných interakcí a zpětnovazebných regulací [17].

2.1 Fyziologické hojení kožní rány

Fyziologické hojení sestává z oddělených (částečně se však překrývajících) a vzájemně interagujících dějů [16]. Vlastní proces hojení kožní rány začíná v okamžiku jejího vzniku hemostázou (0 až několik hodin od vzniku poranění), během které je aktivována fáze zánětu (trvání obvykle 1 až 3 dny), následuje proliferace (4 až 21 dní) a remodelace (21 dní až 1 rok) [4, 6].

Poranění vyvolá koordinovaný sled událostí spojený s přesunem specializovaných buněk do poškozeného místa [18]. Na procesu hojení se podílí

více typů buněk. Převážně jsou to buňky imunitního systému, fibroblasty, buňky endotelu, makrofágy a trombocyty [7]. Nejprve se zapojují krevní destičky a zánětlivé buňky produkující signální molekuly, jakými jsou cytokiny a růstové faktory. Prostřednictvím těchto mediátorů je aktivován přísun leukocytů [19]. Infiltrované neutrofilny umožní vyčištění rány od cizorodých částic, bakterií a vlastní nekrotické tkáně a poté jsou sami fagocytovány pomocí makrofágů [18]. Jakmile je rána vyčištěna, migrují do místa poškození buňky pojivové tkáně fibroblasty, které zodpovídají za tvorbu nových kolagenních vláken potřebných k zacelení poraněné tkáně [19]. Pro obnovení bariérové funkce je nezbytná epitelizace. Epidermis (vícevrstevný dlaždicový rohovějící epitel) je obnovena pomocí keratinocytů migrujících z okrajů rány a vlasových folikulů [1, 19].

Zhojená tkáň se však nikdy nenavrátil do stavu před poraněním. Nejvýše dosahuje 70 % stupně pevnosti neporušené kůže [20].

2.1.1 Hemostáza

Hlavní funkcí hemostázy, ke které dochází bezprostředně po vzniku poranění, je zabránit krevním ztrátám z poškozených krevních cév.

Narušení cévy je doprovázeno extravazací krevních elementů. Po kontaktu s exponovaným kolagenem dochází k aktivaci vnitřní koagulační kaskády [4]. Neutrofilny a makrofágy uvolněné z krevního řečiště jsou zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS), které iniciují vnější koagulační kaskádu [8]. Aktivované trombocyty agregují a uvolňují koagulační faktory, čímž se podílejí na vzniku trombu. Současně spouští vazokonstrikci, která společně s vytvořením trombu umožní zacelení cévy. Deficit perfuze vede k místní hypoxii, zvýšení anaerobní glykolýzy a poklesu pH [4, 6, 18]. Trombus slouží rovněž jako provizorní matrix pro migraci leukocytů, keratinocytů, fibroblastů či buněk endotelu. Je také rezervoárem růstových faktorů a cytokinů [6]. Tyto cytokiny, kromě schopnosti aktivovat buňky podílející se na zánětlivé odpovědi, působí jako chemoatraktanty (chemokiny) stimulující chemotaxi, tj. migraci buněk ve směru chemotaktického gradientu [6]. V případě absence krvácení jsou vazoaktivní a chemotaktické faktory generovány bez účasti

trombocytů, a to během koagulace, aktivace komplementu, nebo aktivovanými buňkami kožního parenchymu [18].

2.1.2 Zánětlivá fáze

Typickými znaky zánětu jsou zarudnutí (*rubor*), pálení (*calor*), otok (*swelling*) a bolest (*dolor*). Významně se na nich podílejí tkáňové mastocyty (žírné buňky), které po aktivaci uvolňují do rány granula naplněná enzymy, antikoagulanty (heparin) a bioaktivními aminy (histamin, serotonin). Tyto aminy zvyšují propustnost cév a tím usnadňují přechod neutrofilům a monocytům do místa rány. Rovněž dochází k hromadění zánětlivého exsudátu v mezibuněčném prostoru [19, 20]. Během zánětlivé fáze je aktivována především nespecifická, vrozená imunita, která představuje první linii obrany vůči patogenům přítomným v ráně [4].

Vlastní zánětlivý proces je spuštěn již v průběhu hemostáze [19]. Obecně lze zánětlivý proces rozdělit na ranou fázi, doprovázenou migrací neutrofilů do místa infekce, a pozdní fázi, spojenou s přítomností monocytů a jejich následnou transformací [6].

Neutrofilů jsou přítomny v ráně převážně během prvních 24 hodin od vzniku poranění. Jejich hlavní funkcí je eliminace přítomných bakterií prostřednictvím produkce antimikrobiálních peptidů a ROS. Neutrofilů rovněž odstraňují cizorodý materiál a odumřelou nefunkční tkáň pomocí sekrece proteolytických enzymů a schopnosti pohlcovat pevné částice (fagocytózy) [19]. Pokud rána není infikována, neutrofilů přetrvávají v ráně po dobu 2 – 5 dní [4]. Během zánětu uvolňují tumor nekrotizující faktor *alfa* (TNF- α), interleukin-1 *beta* (IL-1 β) a interleukin-6 (IL-6). Tyto prozánětlivé cytokiny přispívají k intenzitě zánětlivé reakce a také k produkci dalších významných mediátorů, jakými jsou chemokin interleukin-8 (IL-8) nebo vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF)[6].

Přibližně po 48 hodinách se monocyty uvolněné z krevních kapilár diferencují v kožní tkáni na aktivní makrofágy. Tyto buňky významně přispívají k rezoluci zánětlivé fáze a k plynulému přechodu do následující fáze proliferace. Aktivní makrofágy fagocytují nežádoucí zbytky cizorodé i vlastní tkáně a také apoptotické neutrofilů po intracelulární likvidaci patogenů. Prostřednictvím

produkce cytokinů a růstových faktorů podporují migraci a proliferaci buněk kožní tkáně a syntézu molekul extracelulární matrix (ECM) nezbytnou pro regeneraci rány [6, 19, 21]. Přítomnost makrofágů v ráně značí terminační fázi zánětlivé odpovědi a nástup proliferační fáze [19]. Důležitá je rovněž přítomnost TGF- β , který je považován za stop signál pro zánětlivou fázi [8].

2.1.3 Proliferační fáze

Proliferační fáze je souborem několika dějů nezbytných pro novotvorbu kožní tkáně; neoangiogeneze, tvorby granulační tkáně, depozice ECM a reepitelizace [22] a obvykle trvá asi týden [8]. Na rozdíl od ostatních fází hojení průběh proliferační fáze není časově vymezen a částečně probíhá souběžně s navazujícími fázemi [23].

Fibroblasty a epiteliální buňky na okrajích rány proliferují a migrují do místa poranění, aby zaplnily narušenou oblast. Pod strupem se tak formuje nová kožní tkáň [24]. Makrofágy v ráně přecházejí z prvotní produkce prozánětlivých cytokinů na tvorbu růstových faktorů stimulujících vznik granulační tkáně [18]. Okolo 5. až 7. dne začínají fibroblasty novotvorbu kolagenu a glykosaminoglykanů, které vytvářejí v ráně síť a pomáhají ji tak stabilizovat [23]. Kontrolním signálem podporujícím fibroblasty v syntéze komponent ECM je TGF- β . Růstový faktor VEGF stimuluje proliferaci buněk endotelu, čímž přispívá k angiogenezi, zajišťující zdroj kyslíku pro energeticky náročné procesy během hojení [18, 22]. Vrůstáním krevních kapilár a lymfatických cév do vazivové tkáně je tvořena tzv. granulační tkáň [24]. Reepitelizace začíná migrací epiteliálních buněk z okrajů rány. Nejprve je vytvořena tenká svrchní vrstva, která se postupně zesiluje a zpevňuje [23]. V buněčné vazivové tkáni převažují zejména fibroblasty, které se tak stávají dominujícími buňkami v průběhu proliferační fáze [19]. Proliferace fibroblastů a syntéza kolagenu přetrvává až po dobu dvou týdnů, kdy dojde ke snížení krevního zásobení a ústupu otoku [24].

2.1.4 Remodelace (maturace)

Dva až tři týdny od vzniku rány přechází její hojení do fáze remodelace, kdy je kolagen charakteristický pro hojení (typ III) nahrazován běžným kolagenem typu I, který má vyšší pevnost v tahu, ale jeho depozice je pomalejší [4, 20]. Fibroblasty vlivem růstových faktorů diferencují v myofibroblasty, které exprimují aktinová vlákna hladké svaloviny, umožňující kontrakci rány, nebo podléhají apoptóze [4, 16]. Dochází k postupnému zesíťování a reorganizaci pojivové tkáně, kdy je postupně nahrazována buněčná granulační tkáň bezbuněčnou hmotou. Dochází tak ke zpevnování vrstvy epitelu. To určuje vzhled a vlastnosti výsledné jizvy [24]. V této fázi má apoptóza buněk značný význam. Pokud neprobíhá v dostatečné míře, dochází k rozvoji hypertrofických jizev či keloidů [16]. Remodelační fáze může probíhat simultánně s proliferační fází, kdy je zahájena přibližně 3 až 4 dny od jejího počátku, a obvykle trvá 3 týdny [8]. Přítomnost chemokinu IL-8 v této fázi je jedním z faktorů inhibujících kontrakci rány, a tedy jednou z příčin neschopnosti řádného zacelení nehojících se ran [25, 26].

2.1.5 Patologické hojení kožní rány

Průběh hojení může být narušen hypoxií, edémem tkáně, infekcí či defekty v syntéze kolagenu. Tyto jevy mohou být komplikovány systémovým onemocněním, např. diabetes, hypertenzí, chronickým zánětlivým onemocněním nebo chronickým stresem organismu spojeným s podvýživou či kouřením [16, 23].

Za patologických stavů, jakými jsou například nehojící se diabetické či tlakové vředy, dochází k narušení řízeného průběhu hojení. Rána přechází do stavu chronického zánětu s nadměrnou infiltrací neutrofilů doprovázenou zvýšením ROS, zánětlivých cytokinů a destruktivních enzymů [17, 19].

Nehojící se rány jsou charakteristické zvýšenými hladinami prozánětlivých mediátorů TNF- α , IL-1, IL-6 a IL-8, zodpovědnými za chemotaxi leukocytů, přetrvávající expresi a zvýšenou aktivitu proteáz (zejména matrixových metaloproteináz MMP-2 a MMP-9), nedostatečnou depozici a kontrakci kolagenu [27, 28].

Makrofágy v ráně exprimují proteázy degradující ECM, mezi něž patří enzymy s kolagenolytickou aktivitou, tzv. kolagenázy (např. MMP-1), gelatinázy (MMP-2, MMP-9) aj. Tyto proteolytické enzymy vedle degradace ECM kontrolují také aktivitu prozánětlivých cytokinů a chemokinů prostřednictvím odštěpení jejich fragmentu, čímž je převádějí na aktivní formu [20, 24]. Například MMP-9 odstraněním specifické N-terminální sekvence zvyšuje u chemokinu IL-8 desetinásobně jeho aktivitu [29]. V případě nadměrné aktivity MMP může docházet k destruktivnímu účinku vůči zdravé tkáni. Výsledkem je zhoršení stavu rány produkující další parametry zánětu, čímž zánětlivá fáze přetrvává, a je neschopná progrese do následujících fází [16, 17]. Makrofágy ale také podporují prostřednictvím růstových faktorů migraci a proliferaci fibroblastů, čímž přispívají k fibróze způsobené depozicí nadměrného množství kolagenu [20]. Růstový faktor TGF- β také potlačuje sekreci MMP a naopak stimuluje jejich fyziologické antagonisty, tzv. tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMP) [19].

Obecně převažuje model zánětlivého profilu nehojící se rány, kdy dochází k posunu rovnováhy ve směru degradace tkáně [17]. Nehojící se rána je totiž udržována ve fázi přetrvávajícího zánětu obvykle v důsledku časté infekce v ráně či hypoxie a prostřednictvím nadměrné produkce zánětlivých mediátorů [8]. Fibroblasty přítomné v nehojící se ráně syntetizují zvýšené množství kolagenních vláken, která jsou nedostatečně a chaoticky deponována.

Přítomnost nadměrného počtu aktivovaných neutrofilů a makrofágů produkujících velké množství proteáz způsobuje degradaci nově vytvořených makromolekul pojivové tkáně i růstových faktorů. Je tak zabráněno formování jizvy a produkty degradace dále přispívají k intenzitě zánětlivé odpovědi. Nehojící se rána se tak hojí výrazně déle. Proteolytické mikroprostředí může dokonce přispívat k rozšíření poškozené plochy [17].

Tabulka 1. Významné cytokiny a jejich role během hojení [27-31].

| | TNF- α | IL-1 | IL-6 | IL-8 | IL-10 | TGF- β | PDGF* | GM-CSF |
|------------------------------|---------------|-----------|------------|------|-------|--------------|-----------|--------|
| Chemotaxe leukocytů | ↑ | ↑ | | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ | |
| Aktivace leukocytů | | | | | | | | ↑ |
| Stimulace exprese MZ | ↑ | ↑ | | | ↓ | | | |
| Fibroplazie | ↓ | ↑ | ↑ | | | ↑ | ↑ | |
| Angiogeneze | ↑ | ↑ | | ↑ | | | ↑ | |
| Depozice kolagenu | ↓ | | | | | ↑ | | |
| Kontrakce Rány | | | | ↓ | | ↑ | ↑ | |
| Proliferace keratinocytů | | ↑ | ↑ | ↑ | | ↓ | | ↑ |
| Reepitelizace | | ↑ | | ↑ | | ↑ | | |
| Degradace ECM/ Remodelace | ↑ ↑MMP | ↑ ↑MMP | ↓ ↑TIMP | | | ↓ ↑TIMP | ↑ ↑MMP | |
| Nehojící se rána | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | | ↓ | | ↓ |

Poznámka: * růstový faktor, který bývá zařazován i do kategorie cytokinů, protože se významně podílí na zánětlivých procesech [27]; MZ mediátory zánětu

2.1.6 Bakteriální kontaminace

Bakteriální infekce je považována za jeden z hlavních předpokladů patologického průběhu hojení rány a vzniku nehojící se rány [7, 21]. Je doprovázena přítomností mono- či polymikrobiálního biofilmu s charakteristickou rezistencí k antimikrobiálním látkám [16, 32]. Bakteriální biofilm, který je tvořen

agregovanými bakteriemi v jimi produkované polysacharidové matrix, usnadňuje množení bakterií a chrání proti obranným mechanismům hostitelského organismu. Biofilm snižuje pH prostředí a vytváří fyzikální bariéru bránící migraci hostitelských buněk a průniku protilátek či antibiotik [4, 23]. Zatímco v prvotní fázi infekčního procesu se uplatňují především grampozitivní bakterie (*Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*), přechod rány do chronického stadia je doprovázen infiltrací gramnegativních kmenů (*Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*), které pronikají do hlubších vrstev kůže a způsobují její významné poškození. U poloviny nehojících se ran se nacházejí také kmeny stafylokoků a streptokoků.

Ve zdravé tkáni je infekci zabráněno aktivací imunitního systému. Makrofágy migrující do místa rány brání invazi patogenů prostřednictvím jejich destrukce ve fagolyzozomu nebo produkcí oxidu dusnatého. V případě, že imunitní systém není schopen eliminovat přítomnost patogenů, vzniká infekce, která během zánětlivé fáze hojení vyčerpává komplementový systém a snižuje tak chemotaxi. V průběhu proliferační fáze pak ničí granulační tkáň, růstové faktory a složky extracelulární matrix. Také inhibuje proliferaci fibroblastů a migraci keratinocytů, potlačuje reepitalizaci a potlačuje depozici a zesíťování kolagenu. Bakteriální kontaminace je považována za primární příčinu vzniku chronického zánětu [4, 21]. Například popáleniny produkují značné množství exsudátu, který podporuje růst bakterií, zejména rodu *Pseudomonas* [21, 33]. Tyto mikroorganismy exprimují povrchové virulentní faktory umožňující jejich adhezi, získávání živin, destrukci leukocytů a infiltraci do krevního oběhu [21]. Produkují endotoxiny podporující expresi zánětlivých cytokinů jako IL-1 a TNF- α prodlužující zánětlivou odpověď hostitelského organismu také prostřednictvím zvýšení proteolytických enzymů MMP a potlačením produkce růstových faktorů [4, 21].

Bakterie rovněž uvolňují během proteosyntézy odpadní tripeptid N-formylmetionyl-leucyl-fenylalanin rozpoznávaný povrchovými receptory hostitelských buněk [19]. Tento tripeptid patří mezi tzv. molekulární motivy asociované s patogeny (PAMP), mezi něž lze zařadit také jiné strukturální komponenty bakterií (polysacharidy, polynukleotidy), které aktivují receptory

označované jako PRR (receptory rozpoznávající patogenní vzory). Tyto receptory jsou exprimované na povrchu rezidentních buněk (keratinocyty, tkáňové makrofágy, dendritické a žírné buňky) a patří k nim především nejlépe prostudované Toll-like receptory (TLR) [4, 34]. Aktivované TLR receptory spouštějí intracelulární signální kaskády, a to především dráhu nukleárního faktoru *kappa*-B (NF- κ B) a kaskádu mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK) vedoucích k expresi celé řady prozánětlivých genů, včetně cytokinů, chemokinů a antimikrobiálních peptidů [4].

Na druhou stranu, jestliže bakterie ránu pouze kolonizují, k narušení hojivého procesu nedochází [2]. Subinfekční úroveň bakteriální kolonizace naopak může hojení urychlovat [4, 16] tím, že napomáhá infiltraci neutrofilů a monocytů/makrofágů, tvorbě granulační tkáně a angiogenezi [4]. Například studie účinků ROS formovaných v buňkách epitelu, exponovaných netoxickým koncentracím lipopolysacharidu (LPS), uvádí stimulaci hojení, a to prostřednictvím aktivace redox-labilního transkripčního faktoru NF- κ B a jeho pro-proliferčních účinků [35].

V případě, že bakteriální osídlení kriticky naroste, dojde ke vzniku infekce a následnému zpomalení hojení [2, 35]. To je doprovázeno hromaděním zánětlivého exsudátu, rozšířením poškozené tkáně a nárůstem bolestivosti rány [2]. Vznik infekce je určován množstvím a patogenitou bakteriálního kmenu, ale také obranyschopností hostitelského organismu [4].

2.1.7 Nukleární faktor *kappa* B při zánětu a hojení

Signální dráha transkripčního faktoru NF- κ B hraje významnou roli v patogenezi různých zánětlivých onemocnění, dokonce přispívá ke vzniku kožních nádorů [36]. Nepřiměřenou aktivaci lze často pozorovat u buněk imunitního i neimunitního původu v tkáních postižených chronickým zánětem. Podstatou prozánětlivého účinku NF- κ B je schopnost indukovat expresi mediátorů zánětlivé odpovědi [12, 14]. Některé z nich, především TNF- α či IL-1, navíc mohou prostřednictvím pozitivní zpětné vazby vést ke konstitutivní aktivaci NF- κ B [1, 37,

38]. Výsledkem je přetrvávající exprese prozánětlivých molekul udržujících v ráně chronický zánět, který poškozuje okolní tkáň [12, 14, 39].

Jaderný faktor *kappa* B představuje souhrnný termín pro pětičlennou rodinu transkripčních faktorů, mezi něž patří RelA (také p65), RelB, c-Rel, p50 a p52 [10]. Všechny proteiny rodiny NF- κ B sdílejí Rel homologickou doménu, zodpovědnou za vazbu na DNA a dimerizaci [40]. Funkční jednotka tvořená homo- či heterodimery těchto proteinů po vazbě na regulační DNA sekvence aktivuje transkripci cílových genů [14].

Dráha NF- κ B indukuje expresi značného množství genů regulujících imunitní a zánětlivou odpověď, buněčnou diferenciaci, proliferaci a přežití [14, 40]. Rozmanitost účinků transkripčního faktoru NF- κ B reflektuje široké spektrum faktorů, které tuto dráhu aktivují. Signální dráha NF- κ B je spuštěna v prostředí bakteriální či virové infekce kontaktem exogenních či endogenních antigenů a zánětlivých cytokinů s příslušnými buněčnými receptory, nebo v odpovědi na oxidační stres vyvolaný fyzikálními či fyziologickými faktory [40, 41].

2.1.7.1 Aktivace NF- κ B při zánětu

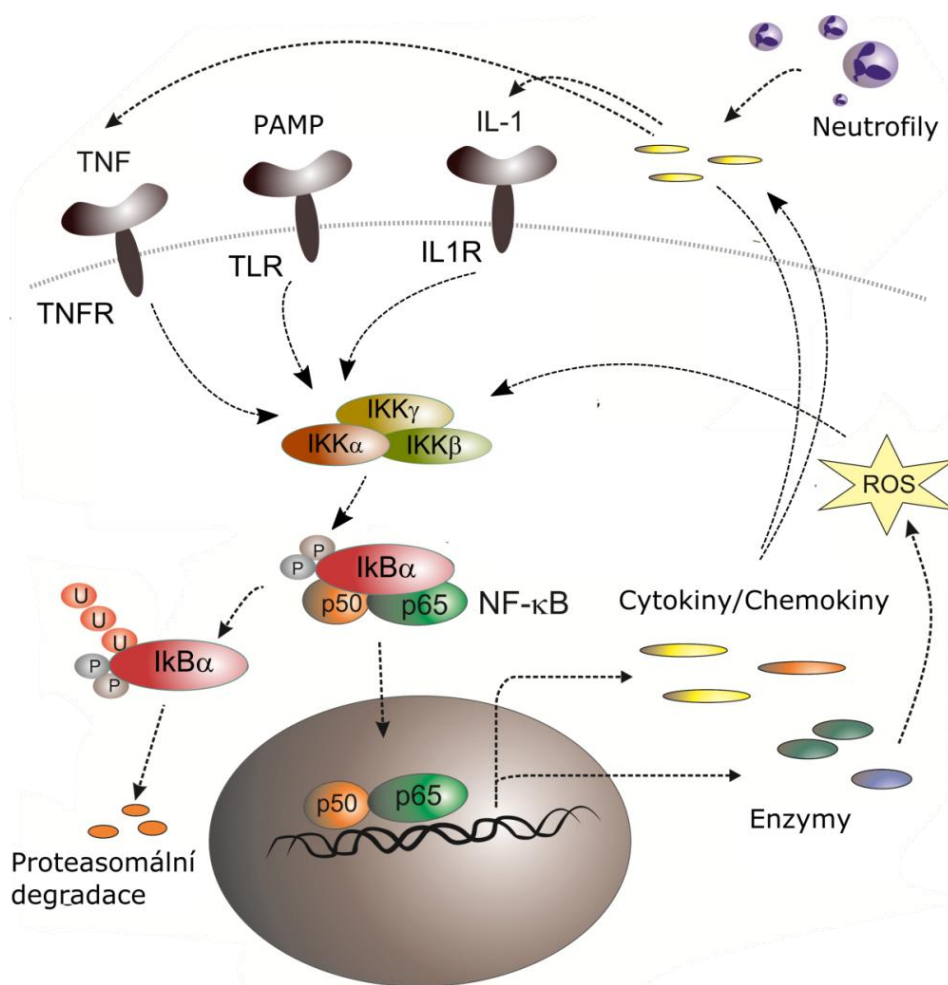
V savčích buňkách byly popsány dvě hlavní dráhy vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B – kanonická a nekanonická [11, 14].

V patogenezi zánětlivých onemocnění se uplatňuje především kanonická signální dráha [14]. Ta je aktivována většinou klasických stimulů pro vrozenou imunitní odpověď uvolněných během zánětu či infekce, jakými jsou LPS, TNF- α či IL-1 [5] (obr. 1). Jejich receptory jsou Toll-like receptory (TLR) rozpoznávající mikrobiální komponenty, nebo receptory IL-1R a TNFR aktivované prozánětlivými cytokiny, zprostředkovávají i přes svoji strukturní odlišnost aktivaci kinázy inhibitoru I κ B (IKK). Aktivovaná kináza fosforyluje inhibitor I κ B α z rodiny proteinů I κ B [12, 40]. Inhibitor I κ B α tvoří ve zdravé tkáni s NF- κ B dimerem v cytoplasmě inaktivní komplex [1, 10, 14]. Je-li fosforylován, podléhá ubikvitinylaci a proteasomální degradaci, čímž je NF- κ B heterodimer (obvykle p50/p65) uvolněn z inhibiční vazby v cytosolu a přechází do jádra [12, 40].

V jádře se NF- κ B váže na cílové DNA sekvence obsahující κ B vazebná místa (5'-GGGRNYYYCC-3'; kde R zastupuje purin, Y pyrimidin a N jakýkoliv nukleotid), přítomná v promotorové oblasti cílových genů [42]. Regulovanými geny kanonické dráhy NF- κ B jsou prozánětlivé cytokiny (např. IL-6, IL-1, TNF- α), chemokiny (IL-8), adhezivní molekuly a také indukibilní prozánětlivé enzymy (cyklooxygenáza-2; COX-2) či proteiny s antimikrobiální aktivitou [1, 10, 38, 41-43] (obr. 1).

Kanonická signální dráha NF- κ B rovněž kontroluje expresi genů pro antiapoptotické (např. Bcl-xL), pro-proliferační (IL-1, IL-6, TNF, růstové faktory) a antioxidantní proteiny (superoxiddismutáza) [10, 11, 44]. Transkripční faktor NF- κ B tak během poranění vykazuje dvojí funkci, kdy podporuje přežití buněk a zároveň brání infekci zvýšením exprese genů kódujících prozánětlivé proteiny [10].

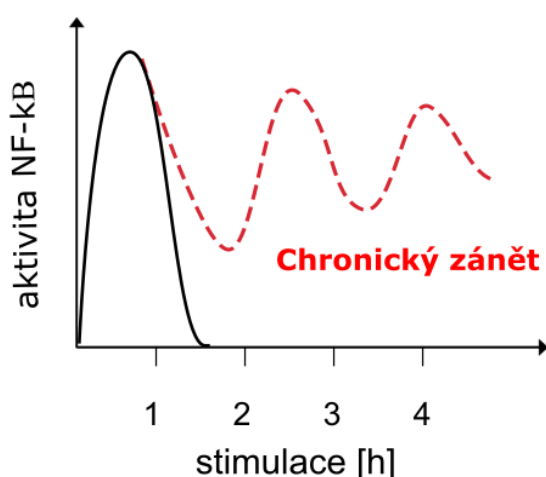
Zatímco kanonická aktivační dráha vystupuje ve většině vrozených imunitních a zánětlivých odpovědích [45, 46], a spouští aktivaci nejběžnějších komplexů p50/p65 nebo p50/c-Rel, nekanonická signální dráha má spíše doplňkovou roli. Tato alternativní dráha převážně aktivuje translokaci dimeru p52/RelB, a spolupracuje s kanonickou dráhou v regulaci určitých funkcí adaptivního imunitního systému [46, 47]. Je aktivována jinými signálními molekulami než kanonická dráha, např. specifickými členy rodiny TNF (lymfotoxinem β aj.) a má význam pro lymfoidní organogenezi, vývoj, přežití a funkci B-lymfocytů [1, 10, 12, 47].



Obrázek 1. Kanonická dráha aktivace NF-κB. Kanonická dráha je aktivována převážně stimulací prozánětlivými receptory, jakými jsou TNFR, IL-1R a TLR. Rozpoznání ligandu receptorem spouští signální kaskádu, která aktivuje IKK komplex katalytických kináz IKK α , IKK β a regulační IKK γ (NEMO). Fosforylací inhibitoru I κ B (typicky I κ B α) je indukována jeho degradace. Heterodimer NF- κ B (p50/p65) je tak uvolněn z inhibiční vazby, čímž je umožněna jeho translokace do jádra. Zde indukuje expresi prozánětlivých cytokinů, chemokinů podněcujících chemotaxi neutrofilů, nebo expresi inducibilních enzymů (např. COX-2, NADPH oxidázy aj.) s prozánětlivou či prooxidační aktivitou. Některé cytokiny (např. TNF- α) a ROS mohou na základě pozitivní zpětné vazby amplifikovat a prodlužovat aktivaci NF- κ B (upraveno podle [1]; symbol „p“ představuje fosforylovanou molekulu a symbol „U“ její ubiquitylaci).

2.1.7.2 Regulace účinku NF- κ B

Inducibilní transkripční faktory, mezi něž se řadí NF- κ B, by měly být aktivní pouze po určitý časový interval. Utlumení jejich aktivity bývá zajištěno prostřednictvím negativní zpětné vazby, ke které dochází post-indukčně s určitým časovým zpožděním. Zatímco první vlna signalizace NF- κ B je do dvou hodin od aktivace kompletně ukončena, chronická stimulace je charakteristická opakovanými tlumenými oscilačními vlnami aktivity NF- κ B [5] (obr. 2).



Obrázek 2. Dynamika odpovědi NF- κ B při stimulaci prozánětlivými mediátory (TNF- α). Plná čára znázorňuje bezprostřední aktivaci NF- κ B při stimulaci (pulzní odpověď) a přerušovaná čára odpověď při přetrvávající stimulaci (upraveno a zjednodušeno podle [5]).

Za normálních okolností je konstitutivní aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B zabráněno prostřednictvím jeho schopnosti indukovat *de novo* expresi svého vlastního inhibitoru (I κ B α) [39, 48]. Inhibitor I κ B α patří k časným regulátorům aktivity NF- κ B [5]. V jádře odděluje NF- κ B dimery z vazby na DNA a translokuje je zpět do cytoplasmy v inaktivní formě [49]. Zásadní význam inhibitoru pro terminaci účinku NF- κ B prokázala studie na myším modelu s delecí genu pro I κ B α , u něhož došlo během několika dnů k rozvoji závažné dermatózy doprovázené abnormální produkcí cytokinu TNF- α v kůži a následnou smrtí jedince. Podobně v případě analýzy *in vitro* byla u I κ B α -deficientních fibroblastů vystavených působení TNF- α pozorována přetrvávající aktivace NF- κ B [48].

Intenzita a trvání transkripční aktivity NF- κ B je také ovlivněna posttranslačními modifikacemi [11]. Fosforylace podjednotky p65, např. cAMP-dependentní kinázou (proteinkináza A; PKA) na Ser276 nebo kasein

kinázou II (CK II) na Ser529 aktivovanou TNF- α , zvyšuje transaktivační potenciál NF- κ B [11, 50]. Reverzibilní acetylace p65 brání navázání inhibitoru I κ B α a udržuje tak nukleární lokalizaci [51]. Naopak, metylace podjednotky p65 asociované s promotorem lysin-metyltransferázou se podílí na zastavení transkripčního účinku NF- κ B.

Terminace odpovědi NF- κ B je u zdravých buněk zajištěna kromě výše zmíněné resyntézy I κ B α z přibližně 25 % také degradací NF- κ B v jádře [52, 53]. Signálem pro nukleární ubikvitinylaci a proteosomální degradaci je metylace p65 na Lys314/315 [53].

2.1.7.3 Vliv inhibice NF- κ B při zánětu a hojení kůže

S ohledem na prominentní roli při zánětu je signální dráha NF- κ B významným cílem při zkoumání mechanismu působení látek s protizánětlivým účinkem a při vývoji nových protizánětlivých léčiv. Tyto látky mohou působit na různých úrovních signální dráhy. Inhibice může být dosaženo eliminací aktivátorů dráhy (cytokinů, ROS, IKK kináz), prevencí nukleární translokace NF- κ B či jeho vazby na cílové DNA sekvence, zvýšením exprese I κ B a posttranslačními modifikacemi [10, 11]. Přičemž interference na úrovni aktivace receptoru nezbytně ovlivňují veškeré následující kroky signální kaskády a zajišťují tak kompletní inhibici dráhy [5]. Oproti tomu inhibitory pozdější fáze odpovědi, např. aktivátory proteosomální degradace podjednotek NF- κ B, selektivně regulují transkripci cílových genů [5, 54].

Positivní účinek inhibice NF- κ B v případě zánětlivých kožních onemocnění byl prokázán při topické aplikaci selektivních inhibitorů NF- κ B (např. syntetický IMD-0354) [55]. Také u topicky používaných protizánětlivých léčiv s jiným známým mechanismem účinku byl zjištěn inhibiční efekt na dráhu NF- κ B. Například bylo prokázáno, že některá nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID) působí kromě primárního mechanismu inhibujícího enzymatickou aktivitu COX také prostřednictvím inhibice NF- κ B [43, 56]. Glukokortikoidy, které ve formě aktivního komplexu s cytosolickým receptorem po translokaci do jádra a vazbě na glukokortikoidní responzivní element snižují expresi COX mRNA, současně

zvyšují transkripci inhibitoru I κ B [57, 58]. V neposlední řadě protizánětlivý účinek přírodních látek, v současné době upřednostňovaných před syntetickými léčivy, je také spojován s inhibicí redox-labilního NF- κ B (např. antioxidantně působící flavonoidy) [56, 59].

Přestože byl prozánětlivý efekt nekontrolované aktivity NF- κ B na kůži prokázán také *in vivo* [10, 48], jeho inhibice může rovněž vést k rozvoji zánětlivého onemocnění, např. u některých typů epitelových buněk [14]. Předpokládá se, že signalizace NF- κ B v epidermálních keratinocytech má značný význam pro udržení imunitní homeostázy v kůži [10]. Různé studie na geneticky upravených myších modelech s epidermálně specifickou delecí genů pro kinázy aktivující NF- κ B (IKK, TAK1) uvádějí vznik kožního zánětlivého onemocnění v závislosti na prozánětlivém působení TNF- α , doprovázeného zvýšenou expresí cytokinů, infiltrací imunitních buněk, apoptózou keratinocytů, tvorbou kožních lézí a epidermální hyperplazie [10, 60-62]. Inhibice dráhy NF- κ B může narušit komunikaci mezi keratinocyty a dermálními buňkami a tím připravit podmínky pro vznik kožního zánětu [10]. Například bylo zjištěno, že závažné kožní onemocnění *incontinentia pigmenti* doprovázené zánětlivými změnami na kůži je způsobeno mutací genu pro IKK- γ , nezbytného pro aktivaci NF- κ B. Studie prováděná na fibroblastech izolovaných z kůže postižených pacientů prokázala, že samotná inhibice NF- κ B tak může způsobit kožní zánět bez jakéhokoliv vnějšího prozánětlivého stimulu [63]. Transkripční faktor NF- κ B během hojení také podporuje proliferaci a migraci buněk. Studie prováděná na monovrstvě epidermálních keratinocytů uvádí, že jeho inhibice výrazně narušila re-epitelizační proces *in vitro*, umožňující uzavření rány vytvořené pomocí tzv. wound scratch assay [64]. Rovněž se uvádí možný význam NF- κ B pro terminální diferenciaci vrstevnatého epitelu epidermis u savců [1, 36].

Významný prozánětlivý mediátor TNF- α po vazbě na receptor indukuje aktivaci prozánětlivé kaskády NF- κ B a MAPK, ale také iniciační kaspázy-8, proteázy zprostředkovávající apoptózu buněk [14]. Prostřednictvím zvýšení exprese antiapoptotických proteinů chrání NF- κ B buňky před indukovanou buněčnou smrtí a rozhoduje tak o odpovědi buněk na stimulaci TNF- α . Zatímco u

NF- κ B-kompetentních buněk je spuštěna zánětlivá signalizace, NF- κ B-deficientní buňky hynou [14]. Studie na myších i lidských fibroblastech s deficiencí p65 nebo mutací I κ B, bránící jeho fosforylaci, vykazují výrazně vyšší senzitivitu vůči apoptóze indukované TNF- α [45, 65, 66]. Přestože kontrolovaná apoptóza má pro resoluci zánětu značný význam (protože umožňuje eliminaci mikrobiální kontaminace a poškozených buněk v ráně [1, 45]), endogenní signály (např. ATP) uvolněné z apoptotických buněk mohou přispívat k infiltraci neutrofilů a přetrvávání zánětu [67, 68].

2.1.8 Transkripční faktor AP-1 při zánětu a hojení

Změna profilu genové exprese během zánětlivé odpovědi je kromě NF- κ B kontrolována také transkripčním faktorem AP-1 [69]. Jedná se o dimer tvořený členy rodin DNA-vazebných proteinů Jun a Fos (převážně z c-Jun/c-Fos podjednotek) [69, 70].

Podjednotka c-Jun je v buňkách exprimovaná konstantně bez ohledu na vnější stimulaci. Funkční transkripční aktivita c-Jun vyžaduje nejen dimerizaci např. s c-Fos, ale také fosforylaci prostřednictvím c-Jun-N-terminální kinázy (JNK) patřící do kaskády MAPK [71].

V současnosti jsou u savců rozlišovány čtyři signální kaskády MAPK, tvořené kinázami ze tří základních rodin (MAP3K, MAPKK, MAPK) a pojmenované podle MAPK komponenty; JNK, extracelulárním signálem regulovaná kináza 1 a 2 (ERK1/2), p38 a ERK5. Regulují buněčný růst, diferenciaci, proliferaci, přežití a reakci buněk na stres [71]. Obecně je signalizace JNK (případně p38) spojována s indukcí apoptózy a ERK s přežitím a buněčným růstem [72].

Během zánětu je transkripční aktivita AP-1, podobně jako NF- κ B, indukována prozánětlivými cytokiny IL-1 a TNF- α , nebo ligandy receptoru TLR [69]. Stává se tak významným regulátorem zánětlivé odpovědi a jeho deregulace je spojována se vznikem zánětlivých kožních projevů [73]. Podobně jako NF- κ B se však AP-1 také podílí na udržení homeostázy v kůži. Během hojení přispívá k proliferaci, migraci a diferenciaci keratinocytů, expresi růstových faktorů

fibroblasty (např. KGF; keratinocytový růstový faktor), remodelaci ECM (prostřednictvím MMP) a v neposlední řadě udržení imunitní funkce epidermální bariéry expresí již zmíněných cytokinů [74-77].

Extracelulární signály (bakteriální a virová infekce, růstové faktory, hormony, fyzikální a chemické stresory) jsou prostřednictvím signální kaskády MAPK převáděny na krátkodobé či dlouhodobé změny exprese cílových genů s AP-1-specifickým vazebným místem na DNA [70]. Infekce rozpoznaná TLR/IL-1R zvyšuje expresi prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1, IL-6), stejně jako v případě NF- κ B [69, 70]. Signalizační kaskády jsou v tomto případě integrovány přes adaptorové molekuly MyD88 (myeloidní diferenciací faktor 88) a TRAF6 (faktor 6 asociovaný s receptorem pro TNF) [70] (obr. 3).

2.1.8.1 Kooperace NF- κ B a AP-1

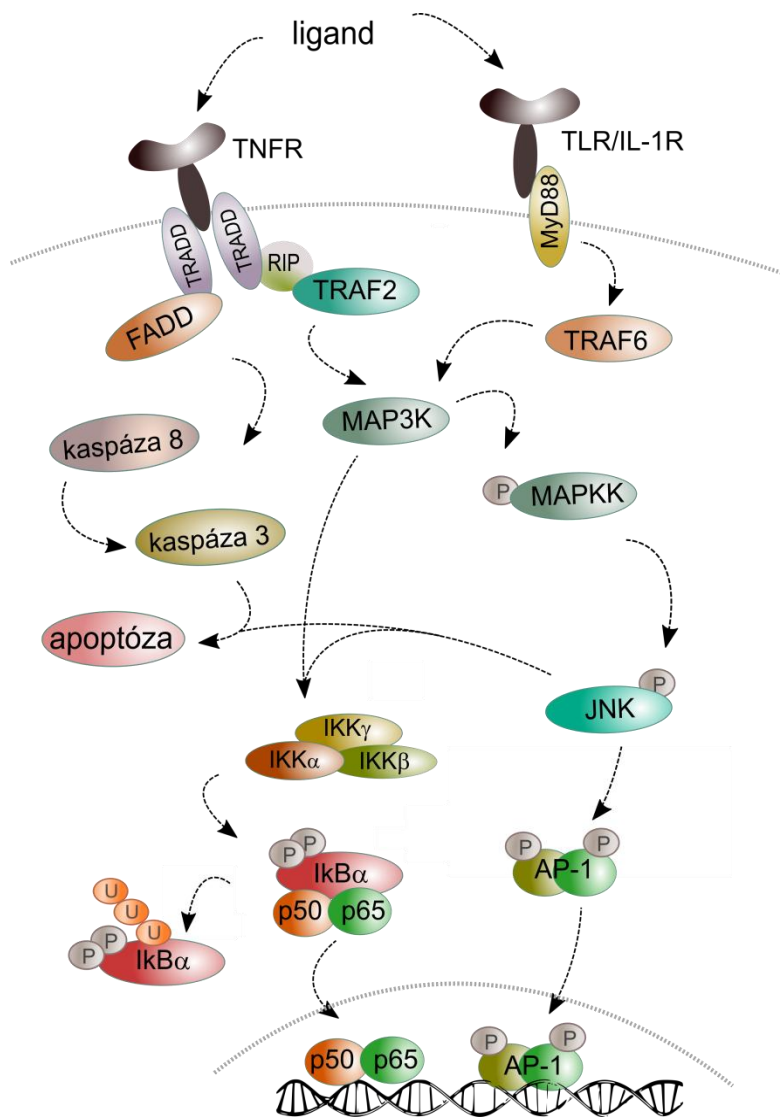
Transkripční faktory NF- κ B a AP-1 jsou při zánětu často indukovány simultánně stejnými stimulačními molekulami. Svůj účinek mohou projevovat nezávisle na sobě, vzájemná spolupráce však často zesiluje jejich biologickou aktivitu [15]. Transkripční faktor NF- κ B může přímo asociovat s podjednotkami c-jun a c-Fos a stimulovat jejich vazbu na DNA. Podobně c-Jun/c-Fos mohou podporovat transaktivaci p65 prostřednictvím interakce s Rel homologní doménou. Vytvořený komplex vykazuje vyšší vazebnou aktivitu k AP-1 i κ B specifickým DNA sekvencím [40, 78]. Rovněž je publikována schopnost NF- κ B u různých typů buněk zvyšovat expresi některých členů rodiny AP-1, např. c-Fos [15, 79, 80]. U buněk imunitního systému bylo pozorováno zesílení sekundární transkripční odpovědi AP-1 závislé na IKK/NF- κ B signalizaci a vice versa, zvýšení exprese cílových genů NF- κ B v důsledku sekundární aktivace AP-1 [79].

Jiný mechanismus interakce mezi uvedenými signálními drahami představuje schopnost kaskády MAPK aktivovat také IKK kinázový komplex, klíčový pro aktivaci NF- κ B [15, 81]. Například stimulace fibroblastů pomocí TNF- α aktivuje kinázy MAP3K3 [82] nebo MAP3K1 [83, 84] aktivující AP-1, ale také NF- κ B prostřednictvím degradace I κ B α [15, 83] (obr. 3). Ve většině případů je tak prostřednictvím kaskády MAPK umožněna součinnost obou faktorů, např. při

indukci *de novo* exprese chemokinu IL-8 u lidských keratinocytů [85] či epiteliální a endotelové buněčné linie [86] po stimulaci TNF- α , nebo po expozici kožních fibroblastů LPS [81]. Podobně u buněk stimulovaných různými prozánětlivými molekulami je pro plnou expresi enzymů COX-2 nebo MMP vyžadována účast AP-1 i NF- κ B [87, 88].

Jiné studie však uvádějí inhibici JNK prostřednictvím NF- κ B, například jako možný mechanismus blokování apoptotického účinku TNF- α [72, 89-91], ve kterém je JNK významným prostředníkem [89, 92]. Za normálních podmínek simultánní aktivace obou drah prostřednictvím TNF- α k apoptóze nedochází. Pouze u některých látek preferenčně stimulujících JNK může nedostatečná aktivace NF- κ B vyústit v převahu apoptózy [93]. Na druhou stranu byl publikován rovněž antiapoptotický účinek c-Jun, chránící buňky fibroblastů před TNF- α -indukovanou buněčnou smrtí. V tomto případě byla pozorována spolupráce c-Jun s NF- κ B v prevenci apoptózy způsobené expozicí UV záření, pravděpodobně díky zapojení adaptorové molekuly TRAF2 (faktor 2 asociovaný s receptorem pro TNF), která není mediátorem buněčné smrti [94] (obr. 3).

Je proto vhodné provádět komplexní studie účinků protizánětlivých léčiv [69]. Například výše zmíněný protizánětlivý účinek glukokortikoidů je také spojován se schopností bránit transkripční aktivitě AP-1 komplexu vázaného na DNA [70, 95]. Podobně také polyfenoly svým antioxidačním účinkem mohou nepřímo inhibovat účinek NF- κ B i AP-1 nebo přímo interagovat s MAPK [96]. Například flavonoid silybin při nízkých dávkách UVB záření chránil imortalizované keratinocyty HaCaT (s defektní NF- κ B signalizací) před apoptózou, zatímco při vysokých dávkách UVB silně poškozujících buňky zvyšoval apoptózu pravděpodobně prostřednictvím inhibice AP-1 [97].



Obrázek 3. Propojení signálních drah NF- κ B a AP-1. Po stimulaci receptorů TLR, TNFR a IL-1R příslušnými ligandy dochází k tvorbě komplexu receptoru s adaptorovými proteiny (TRAF2/6, RIP; protein interagující s receptorem, FADD; Fas-asociovaný protein s doménou smrti). Vznik aktivního komplexu spouští příslušnou signální kaskádu regulačních fosforylací (např. aktivace obou faktorů NF- κ B a AP-1 přes TRAF6 zahrnuje TAK1; TGF- β aktivovanou kinázu, patřící do rodiny MAP3K).

Výsledkem je translokace transkripčních faktorů do jádra a po vazbě na odpovídající DNA sekvence transkripce

genů. Receptor pro TNF- α může rovněž spustit apoptózu buněk. V případě funkčního NF- κ B je ale upřednostněna exprese prozánětlivých genů a genů podporujících buněčné přežití. Signální kaskáda MAPK/JNK však může také přispět k indukci buněčné smrti. (upraveno podle [1, 30, 98, 99]; symbol „p“ představuje fosforylovanou molekulu a symbol „U“ její ubiquitylaci)

2.1.9 Přístupy k léčbě kožních ran

Současná léčba kožních nehojících se ran je zaměřena převážně na potlačení zánětu, čímž přispívá ke zmírnění proteolytické zátěže a redukci nekrotické tkáně. Chronický průběh hojení na akutní lze zvrátit také podpořením proliferační fáze hojení prostřednictvím exogenně přidaných růstových faktorů [17].

Léčba kožních ran obecně zahrnuje počáteční posouzení jejího stavu, vyčištění, odstranění nečistot a nekrotické tkáně a primární uzavření rány (stehem). Infikovaná rána je léčena pomocí baktericidních antibiotik, léků či obvazových

materiálů s protizánětlivým účinkem. Pokud je rána příliš velká a okraje rány nelze spojit, je aplikován tzv. sekundární zásah (transplantace kožních štěpů) [2, 8].

K lokálnímu vyčištění rány jsou využívány antimikrobiální přípravky. K topické aplikaci lze použít lokální antibiotika a antiseptika [8]. Použití detergentů, peroxidu vodíku či koncentrovaného jodovaného povidonu je však problematické kvůli jejich cytotoxickému účinku nejen vůči bakteriím, ale také buňkám hostitele a tedy možnému dalšímu poškození tkáně [2, 16]. V případech hlubších či rozsáhlejších infekcí jsou podávána systémová antibiotika, protože hrozí nebezpečí rozšíření do okolních tkání a vzniku tzv. systémové infekce [2].

Nehojící se rány jsou často infikovány multirezistentními bakteriemi, např. gramnegativními tyčinkami *Pseudomonas aeruginosa* [2, 16, 100]. Stále častější výskyt případů rezistence bakteriálních kmenů na běžně používaná antibiotika zesiluje potřebu vyvíjet nové léčebné metody [8]. V současnosti se dostává do popředí produkce bioaktivních krycích materiálů, např. polymerů obsahující nanočástice stříbra nebo nanomateriálů s řízeným uvolňováním přírodních antibakteriálních látek [16]. Výhodou nanočástic je širokospektrální baktericidní účinek eliminující riziko vytvoření bakteriální rezistence a schopnost působit již při nízkých koncentracích [7, 8, 16].

Alternativní léčba pomocí antimikrobiálních peptidů (např. defenzinů) je limitována jejich nízkou stabilitou, a metody jako fototerapie či terapie s aplikací kmenových buněk zatím nejsou běžnou součástí klinické praxe [16].

2.1.10 Polyfenoly a hojení ran

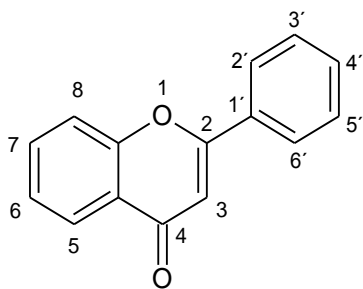
V současné době je jedním z cílů zvýšit antibakteriální účinnost hojivých krycích materiálů prostřednictvím složek přírodního původu [21] především pro jejich nízkou toxicitu, minimum vedlejších účinků a komplexní antibakteriální účinek, který nepodporuje vznik bakteriální rezistence [101, 102]. Nedávné studie publikovaly rychlejší hojení ran po aplikaci krycích materiálů s obsahem různých přírodních látek, např. kurkuminu [103-105], aloe vera [105-107], složek silymarinu (extrakt ostropestřce mariánského) [108, 109], nebo včelího medu [110, 111]. Jejich

protizánětlivá a antibakteriální aktivita bývá připisována účinku důležitých obsahových látek, tzv. polyfenolů, na které jsou tyto přírodní produkty bohaté [21].

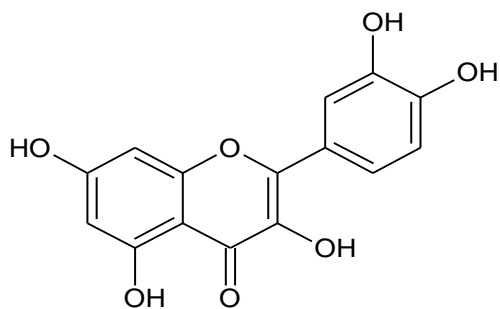
Fenolické sloučeniny jsou významnou podskupinou tzv. sekundárních metabolitů rostlin, biologicky aktivních látek se širokým spektrem účinků. Tyto látky umožňují nejen regulaci primárního metabolismu rostlin (reprodukcii, fyziologické procesy, aj.), ale jsou rovněž produkovány jako součást adaptace na nežádoucí biotické či abiotické vlivy prostředí [101, 102]. Fenoly jsou syntetizovány prostřednictvím pentózového cyklu, šikimátové nebo fenylypropanové dráhy z fenylalaninu nebo tyrosinu [102, 112]. Základ jejich chemické struktury tvoří nejméně jeden fenolový kruh, ve kterém je vodík nahrazen funkční skupinou (hydroxyl, metyl, acetyl). Obvykle se v rostlinách nacházejí ve formě tzv. polyfenolů [102]. Nejčastěji bývají klasifikovány na základě chemické struktury na flavonoidy, fenolické kyseliny, lignany, stilbeny, ligniny a třísloviny [102, 113].

Flavonoidy představují nejrozsáhlejší a nejrozmanitější skupinu polyfenolů. Hlavními podtřídami flavonoidů jsou flavonoly, flavony, flavanony, flavanonoly, flavan-3-oly, isoflavony a antokyanidiny (obr. 4). Vyskytují se především v ovoci a zelenině, ale také v čaji, kávě, koření nebo bylinných extraktech, převážně ve formě *O*-glykosidů [102, 114, 115].

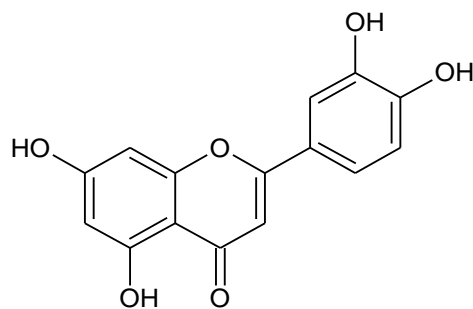
Účinnost těchto látek je úzce spojena s jejich schopností penetrovat přirozenou bariérou epidermální rohové vrstvy (*stratum corneum*) do hlubších vrstev kůže. Jejich permeabilita závisí na molekulární struktuře, určující jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, jakými jsou polarita, rozpustnost či velikost molekuly. Z tohoto pohledu lipofilní a amfipatické sloučeniny pronikají snáze, protože prochází intercelulárně, na rozdíl od hydrofilních molekul, které mohou procházet pouze mezi korneocyty v případě, že jsou dostatečně malé [102, 116]. Nově jsou zkoumány možnosti, jak zvýšit schopnost jejich penetrace, například prostřednictvím enkapsulace do lipozomů nebo pomocí nanočástic [102].



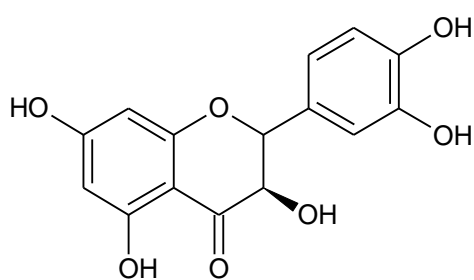
2-fenylchromon (flavon – základní skelet)



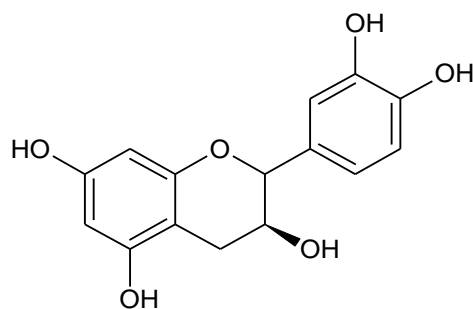
flavonoly (kvercetin)



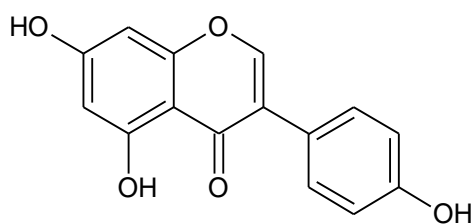
flavony (luteolin)



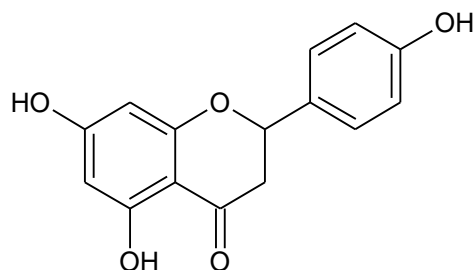
flavanonoly (taxifolin)



flavan-3-oly (catechin)



isoflavony (genistein)



flavanony (naringenin)

Obrázek 4. Molekulární struktura flavonoidů s příklady vybraných zástupců jednotlivých podtříd (upraveno podle [115]).

Kombinace jejich protizánětlivých, antioxidačních a antimikrobiálních účinků představuje značný potenciál v léčbě zánětlivých onemocnění kůže [102].

2.1.10.1 Antimikrobiální aktivita flavonoidů

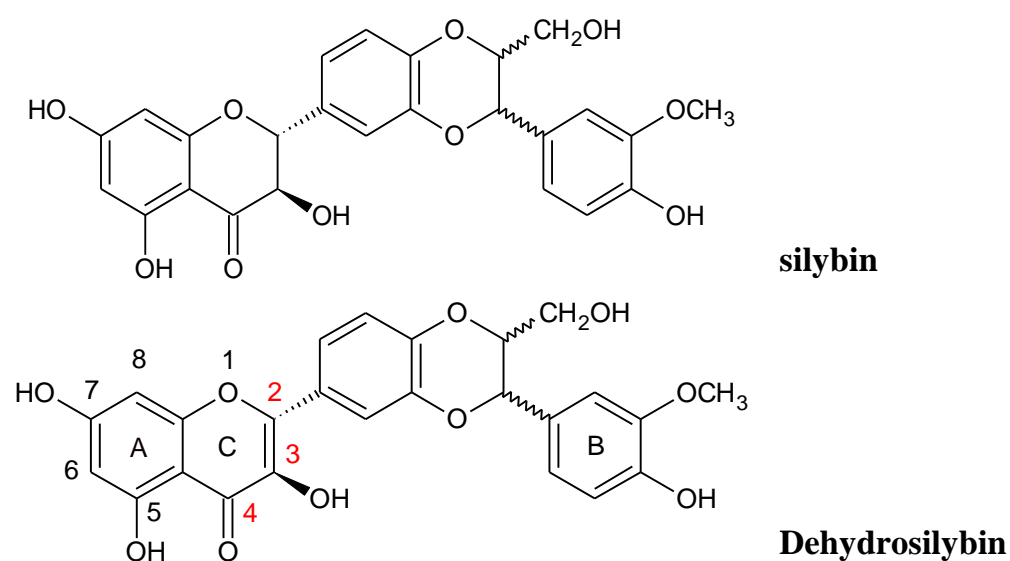
Antibiotika používaná k potlačení bakteriální infekce v ráně často kromě patogenních bakteriálních kmenů nepříznivě působí také na přirozenou bakteriální mikroflóru pokožky, čímž připravují podmínky pro vznik kožních chorob a bakteriální rezistence. Značný význam má proto aplikovat flavonoidy především v těch případech, kdy dochází k pomnožení bakteriálních kmenů rezistentních vůči antibiotikům, jako je např. *P.aeruginosa* nebo *S.aureus*, které jsou častou příčinou nehojících se ran [102]. Předpokládaným mechanismem antimikrobiálního účinku flavonoidů je jejich působení na buněčnou membránu patogenů [102, 117, 118]. Antibakteriální účinnost různých flavonoidů se však liší v závislosti na struktuře jejich molekuly. Bylo zjištěno, že antibakteriální účinek flavonoidů, měřený jako pokles fluidity membrány bakterie, koresponduje s hydrofobicitou molekuly [118]. Rovněž substituce molekuly flavonoidu hydroxylovou skupinou na C3 zvyšuje antimikrobiální efekt, jak bylo prokázáno např. na molekule kvercetinu [118, 119]. Flavonoidy mohou také inhibovat bakteriální membránové transportéry, jejichž aktivita je jednou z příčin bakteriální rezistence. Tento efekt byl pozorován např. u flavonolignanů silybinu, hlavní biologicky aktivní složky silymarinu [120, 121].

2.1.10.2 Antioxidační aktivita flavonoidů během zánětu

Během zánětlivé fáze produkují buňky (neutrofilů, makrofágy, fibroblasty, buňky endotelu) v ráně reaktivní formy kyslíku, které spouští v kožních buňkách molekulární dráhy aktivující redox-labilní transkripční faktory AP-1 a NF- κ B [102, 122]. Prostřednictvím jejich transkripční aktivity jsou v ráně stimulovány zánětlivé procesy k ochraně proti invazi mikroorganismů a vzniku infekce. Na druhou stranu, nadměrné množství volných radikálů může hojení zpomalit a poškodit okolní zdravou tkáň [102].

Jedna z nejdůležitějších vlastností pro antioxidační kapacitu molekuly je její schopnost vystupovat jako redukční činidlo [59]. Bez ohledu na strukturní rozmanitost flavonoidů, většina obsahuje fenolové skupiny s poměrně vysokou redukční kapacitou. Flavonoidy tak obvykle vystupují jako donory elektronu pro sloučeniny s vyšším redoxním potenciálem (volné radikály), čímž je neutralizují a

samy přecházejí na rezonančně stabilizované málo reaktivní aniontové radikály [115, 123]. Prostřednictvím této schopnosti mohou flavonoidy také inhibovat oxidační procesy v membráně aktivující fosfolipázu A2 (PLA2), která je schopna uvolňovat z membránových fosfolipidů kyselinu arachidonovou [102, 115]. Antioxidační kapacita flavonoidu je proporcionální lipofilnímu charakteru molekuly [124-126]. Hydrofobní molekula se snáze rozptýlí v lipofilní membráně, kde interaguje s membránovými lipidy a proteiny [124]. Například flavonolignan dehydrosilybin obsažený v silymarinu vykazuje vyšší antioxidační kapacitu než jeho hydrofilnější parentní molekula silybin [37, 126]. Silnější schopnost oxidovaných derivátů dehydrosilybinu či kvercetinů zhaset ROS ve srovnání s molekulami silybinu či taxifolinu je rovněž spojována s přítomností nenasycené vazby mezi C2-C3 (obr. 5), která je v konjugaci s oxoskupinou na C4, čímž se stává účinnějším donorem vodíku [126-128]. V neposlední řadě k míře antioxidační kapacity přispívá schopnost chelatace iontů železa, podílejících se na tvorbě ROS (Fentonova reakce) [124, 128].



Obrázek 5. Flavonoidy s komplexní strukturou - flavonolignany (upraveno podle [124]).

2.1.10.3 Protizánětlivý účinek flavonoidů

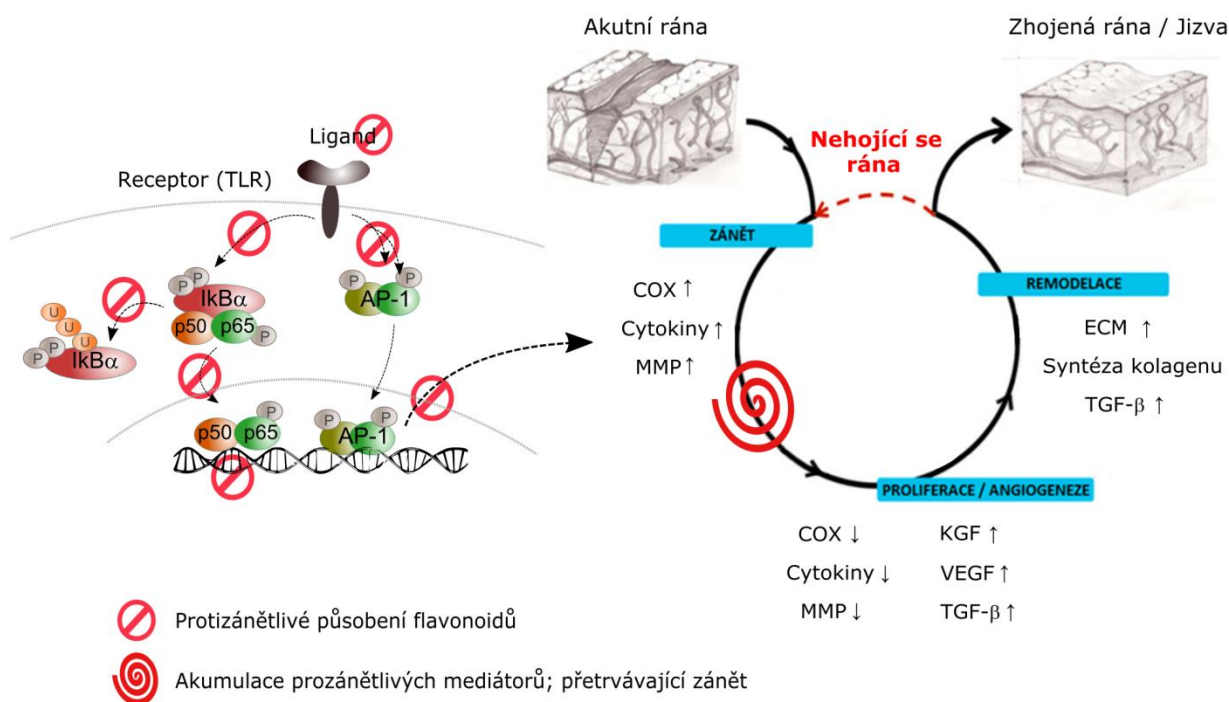
Správný průběh a ukončení zánětlivého procesu jsou kontrolovány řadou mechanismů na buněčné a molekulární úrovni. Mechanismy směřující proces hojení k ukončení zánětu jsou např. produkce protizánětlivých cytokinů, apoptóza neutrofilů či změna signalizace prostřednictvím prozánětlivých prostaglandinů a leukotrienů na protizánětlivé lipoxiny [4, 5, 129, 130]. Prostaglandiny a leukotrieny vznikají transformací kyseliny arachidonové uvolněné z membránových fosfolipidů prostřednictvím enzymů COX a lipooxygenázy (LOX). Tyto signální molekuly autokrinně či parakrinně stimulují zánětlivé procesy v poraněné tkáni, projevující se jako zarudnutí, bolest a otok. Flavonoidy zabraňují jejich tvorbě prostřednictvím inhibice vodíkových vazeb, nezbytných pro navázání substrátu do aktivního místa enzymu nebo jako kompetitivní inhibitory [102, 115]. Rovněž mohou působit jako chelatační činidla vůči iontům v aktivním místě enzymu [115, 131] nebo potlačením genové exprese enzymu [43, 123].

Na úrovni intracelulární signalizace je považována za jednu z hlavních příčin patogenního průběhu hojení nepřiměřená transkripční aktivita jaderného faktoru NF- κ B [1, 14]. Přetrvávající stimulace signální dráhy NF- κ B je rovněž spojována s chybným terminačním programem zánětlivé fáze [5]. Četná experimentální data ukazují, že transkripční faktor NF- κ B je významným cílem flavonoidů při regulaci zánětlivé odpovědi [37, 38, 123, 132-139]. Expresi prozánětlivých mediátorů potlačují prostřednictvím inhibice translokace NF- κ B do jádra [132, 140, 141] a následné vazby na cílové DNA sekvence [38, 135, 136, 140-142] nebo snížením proteinové exprese a fosforylace samotného NF- κ B (zejména podjednotky p65) [133, 143], ale i prevencí jeho aktivace prostřednictvím např. již zmíněného antioxidantního efektu [136] (obr. 6). Klíčovým mechanismem bránícím transportu NF- κ B do jádra je inhibice fosforylace inhibičního proteinu I κ B, zadržujícího NF- κ B v cytosolu. Tento efekt byl pozorován např. u silymarinu/silybinu [140, 144, 145].

Aktivace NF- κ B je regulována také kinázami patřícími do rodiny MAPK primárně odpovědnými za aktivaci transkripčního faktoru AP-1 [83, 84]. Flavonoidy jsou schopny inhibovat fosforylací MAPK, čímž brání mobilizaci obou

těchto faktorů spoluzodpovědných za produkci prozánětlivých mediátorů [102]. Publikována byla inhibice MAP kinázového signálního systému, např. na úrovni MAP kináz JNK [140] či ERK [94]. Regulace zánětlivé odpovědi pomocí obou faktorů současně, anebo jen jednoho z nich, závisí na typu buněk, prozánětlivém stimulantu a konkrétním flavonoidu [94, 146]

Flavonoidy prostřednictvím inhibice aktivity NF- κ B a AP-1 také modulují expresi potenciálně destruktivních proteáz MMP [136, 147]. Ve zdravé tkáni jsou MMP exprimovány jen v nepatrném množství. Jejich exprese a aktivace výrazně vzrůstá až v případě potřeby tkáňové remodelace během hojení. Vedle schopnosti degradovat ECM a uvolňovat tak bioaktivní fragmenty, či podporovat migraci buněk k uzavření rány, mohou metaloproteinázy kontrolovat mezibuněčné signalizace. Proteolyticky aktivují či deaktivují cytokiny, chemokiny a růstové faktory či modifikují buněčné receptory, čímž regulují apoptotické a zánětlivé procesy [148, 149]. Flavonoidy potlačením nepřiměřené produkce těchto proteáz zabraňují vzniku proteolytického prostředí, jež je predispozicí ke vzniku nehojící se rány. Naopak stimulují syntézu kolagenu podpořením proliferace fibroblastů [136, 147].



Obrázek 6. Předpokládaný mechanismus protizánětlivého působení flavonoidů (vizualizováno „stop“ symbolem; část obrázku zobrazující průběh normálního

hojení či vznik nehojící se rány je upravena dle [150]). Flavonoidy regulují průběh prozánětlivých drah na více úrovních. Působí na samém počátku aktivace svými antioxidantními a antimikrobiálními účinky. Potlačují fosforylaci a degradaci inhibičního proteinu I κ B α , fosforylaci, jadernou translokaci a navázání NF- κ B na DNA, stejně jako aktivaci AP-1. Výsledkem je pokles syntézy prozánětlivých molekul kontrolovaných těmito transkripčními faktory.

2.1.11 Nanočástice stříbra a hojení ran

Nanočástice jsou obvykle definovány jako částice o rozměrech 1 až 100 nm, ale mohou dosahovat velikosti až několik stovek nanometrů. Antibakteriální účinky vykazují nanočástice různých kovů, včetně zinku, titanu, mědi, magnesia či zlata. Nanočástice stříbra však svými baktericidními vlastnostmi zcela vynikají [151].

Antimikrobiální účinky sloučenin stříbra jsou známy již po staletí. Historicky stříbro patřilo k často využívaným antibakteriálním prostředkům před objevením antibiotik. Během první světové války sloužilo k antibakteriální úpravě vláken používaných k šití ran [7].

Posledních 20 let se stříbro využívá do antiseptických a antibakteriálních krycích materiálů podporujících hojení, v prevenci a léčbě infekcí, dentální hygieně, zánětech očí či jiných infekčních komplikací. Jeho medicínské aplikace se navíc stále rozšiřují. Například se využívá jako antibakteriální povrchová úprava katétrů v prevenci katérové sepse či jako součást náplastí, antiseptických sprejů aj. [152].

Závažný problém současné zdravotní péče představuje nadužívání běžně dostupných antibiotik a z toho vyplývající bakteriální rezistence [152]. Širokospektrální baktericidní účinek stříbra, stejně jako různorodost jeho baktericidních mechanismů, umožňují tento problém eliminovat. Proto se stříbro významně uplatňuje zejména v léčbě komplikovaných bakteriálních infekcí otevřených ran či chronických vředových onemocnění [7].

Ve formě nanočástic vykazuje stříbro až 200 \times vyšší antimikrobiální aktivitu ve srovnání se stříbrnými solemi především kvůli mnohonásobně vyššímu povrchu, umožňujícímu lepší kontakt s mikroorganismy [7, 151, 153]. Vyšší baktericidní účinek nanočástic umožňuje snížení koncentrace stříbra v krycím materiálu, aniž by došlo k narušení jeho účinnosti. Navíc použití nižší koncentrace redukuje případné

interference s tkání a vlastním fyziologickým průběhem hojení [7, 16]. Metalické (elementární) stříbro Ag^0 je chemicky inaktivní a špatně absorbovatelné bakteriálními buňkami. K získání antibakteriálních účinků je potřebná jeho ionizace (Ag^+) v prostředí tělních tekutin [7, 151].

2.1.11.1 Antibakteriální účinek nanočástic stříbra (AgNC)

Pozitivně nabité Ag^+ vstupují do interakcí s negativně nabitými skupinami v membráně bakterií (lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, kyselina teichová a peptidoglykany grampozitivních bakterií), mění tak její permeabilitu prostřednictvím tvorby pórů. Výsledkem je ztráta intracelulárních komponent, narušení transportu iontů a tvorby energie, a také usnadnění vstupu samotných nanočástic do nitra buňky. Intracelulárně interagují s fosforem obsaženým v molekulách DNA nebo katalyzují oxidaci thiolových skupin proteinů za vzniku disulfidových vazeb. AgNC rovněž narušují respirační řetězec, čímž inhibují bakteriální růst a mohou také přispívat k tvorbě ROS [7, 16, 21, 152]. Účinek je koncentračně závislý. Zatímco mikromolární množství Ag^+ blokuje buněčné dýchání [154], vyšší koncentrace interagují s cytoplazmatickými komponentami a nukleovými kyselinami [155, 156].

AgNC působí proti širokému spektru aerobních i anaerobních bakterií, grampozitivních i gramnegativních bakteriálních kmenů, včetně multirezistentních [152, 157, 158]. Studie srovnávající působení nanočástic na grampozitivní či gramnegativní bakteriální kmeny naznačují vyšší senzitivitu gramnegativních bakterií [158, 159]. Citlivější k antibakteriálnímu účinku nanočástic stříbra jsou rovněž aerobní bakterie ve srovnání s anaerobními [7, 160]. Rovněž byl prokázán synergický efekt AgNC v kombinaci s některými antibiotiky (erytromycin, chloramfenikol, ampicilin aj.) [152].

2.1.11.2 Klinické aplikace AgNC v terapii kožních ran

Překrytí rány pomocí komerčně dostupných krycích materiálů s obsahem stříbra připravuje vhodné podmínky pro efektivní hojení. Zajišťuje dočasnou ochranu před externími vlivy, průnikem mikroorganismů a jejich případným

pomnožením. Navíc, oproti aplikaci AgNČ v roztoku, umožňuje zachycení stříbra v biopolymeru navýšení počtu interakcí stříbrných iontů s mikroby, čímž je zvýšena efektivita jeho účinku [7]. V současné době jsou na trhu nejrůznější antibakteriální krycí materiály z celulózy, polyuretanové pěny, chitosanu, aktivního uhlí, alginátu aj., impregnované různými koncentracemi iontového stříbra či nanostříbra (např. Acticoat™, Aquacel® Ag, Contreet®, Algisite® Ag, Actisorb™ Silver) [152]. Tyto materiály uvolňují Ag ve formě elementární (metalické, nanokrystaly) nebo iontové [161].

Studie *in vivo* potvrzují rychlejší hojení ran krytých antibakteriálními materiály s obsahem stříbra nejen jako důsledek potlačení růstu bakterií, ale také podpořením reepitelizace prostřednictvím migrace a proliferace keratinocytů [162], syntézy a depozice kolagenu [152, 163-165] či kontrakce rány v důsledku diferenciací fibroblastů v myofibroblasty [162, 166]. Topická aplikace nanočástic vykazuje rovněž protizánětlivé účinky. Nanočástice stříbra AgNČ potlačují expresi prozánětlivých mediátorů, např. IL-6, TNF- α či proteolytických proteáz MMP [167-169].

2.1.11.3 Toxicita AgNČ

AgNČ jsou všeobecně považovány za netoxické vůči savcím buňkám. Na druhou stranu, oproti částicím s větší velikostí, mají nanočástice vyšší biologickou aktivitu, protože mají vyšší hodnoty měrného povrchu na jednotku hmotnosti. Na větším povrchu se zvyšuje pravděpodobnost a počet kolizí s biomateriálem. Menší částice jsou tak sice antimikrobiálně účinnější, současně však vzrůstá riziko interakcí s hostitelskými buňkami [170, 171].

Potenciální toxicita nanočástic však nezávisí pouze na jejich velikosti [170, 172, 173], ale také na koncentraci [151, 174-177] a typu testovaných buněk [68, 175, 178, 179]. Publikovány byly toxické účinky AgNČ (či Ag⁺) u různých typů savcích buněk [171, 175, 178-183], včetně kožních [161, 171, 173, 184-189] (viz tab. 2). Hodnoty uvedené v publikacích se různí nejen v závislosti na výše uvedeném, ale také na použité metodě stanovení a způsobu přípravy AgNČ k testování [161, 184]. Tuto skutečnost potvrzuje pokles toxicity analyzovaného

vzorku v souvislosti s vyvázáním iontů stříbra proteiny či ionty solí přítomnými v médiu [161, 185, 190].

Tabulka 2. Toxicita AgNČ k fibroblastům a keratinocytům

| | AgNČ | | Ag ⁺ (AgNO ₃) | |
|---|----------------------------|--|--------------------------------------|--|
| | velikost | koncentrace | koncentrace | |
| NHEK | 20-80 nm | 0,34-1,7 ppm | [184] | 12,5 ppm [185] (LD ₅₀) |
| | 5-40 nm (ø 10,5 ± 5 nm) | netoxické (0-25 ppm) | [186] | 5,8 ± 0,8 ppm [186] (IC ₅₀) |
| NHDF | 50 nm | > 50 ppm | [187] | > 7 ppm [185] |
| | 5-40 nm (ø 10,5 ± 5 nm) | netoxické (0-25 ppm) | [186] | 3,1 ± 0,3 ppm [186] (IC ₅₀) |
| HaCaT (imortalizovaná linie lidských keratinocytů) | 10-50 nm (ø 25 ± 7 nm) | 15 ± 5 µmol·l ⁻¹ (IC ₅₀) | [171] | ≥ 10 ⁻⁴ mol.l ⁻¹ [191] |
| | 10(80 %)-65 nm | 26,3 ± 3 ppm (EC ₅₀) | [189] | |
| | 17 ± 4 nm - 39 ± 24 nm | 16 – 18 ppm (LC ₅₀) | [192] | |
| Myší fibroblasty L929 | 10-65 nm | 40 ± 12 ppm (EC ₅₀) | [173] | |
| Myší fibroblasty Swiss albino | 7-20 nm (ø 16,6 nm) | 63 ppm (IC ₅₀) | [193] | |
| Myší fibroblasty NIH-3T3 | 70 ± 5 nm | 4 ppm (IC ₅₀) | [175] | |
| Myší keratinocyty 291.03C | 10-65 nm | 22,3 ± 2 ppm (EC ₅₀) | [188] | |

Dle studií zabývajících se analýzou vlivu krycích materiálů s obsahem stříbra na kožní buňky je toxicita úměrná množství uvolněných iontů Ag^+ [161, 185]. Předpokládá se, že do buněk mohou AgNČ vstupovat endocytózou a z endozomu jsou předány do lysozomu [178, 190, 194, 195], kde se stávají vlivem nízkého pH zdrojem Ag^+ [196]. Předpokládaným mechanismem účinku Ag^+ je interference s elektronovým transportním řetězcem, produkce ROS a aktivace mitochondriální apoptotické dráhy [197]. Publikovaná indukce oxidačního stresu vlivem AgNČ [172, 184, 188, 190, 196, 198] může být jednou z příčin pozdějších potenciálních zánětlivých účinků netoxických koncentrací AgNČ . Projevy chronického zánětu (intra- i intercelulární edém) po 14denní aplikaci 20 nm AgNČ byly pozorovány v prasečí epidermis [184]. Podobně aplikace poměrně vysokých koncentrací (> 100 ppm) Ag^+ či AgNČ (< 100 nm) vedla ke ztenčení epidermis a změny kolagenních vláken prasečí kůže během testu subchronické toxicity [199]. Zvířecí a lidská kůže se však může v tomto směru lišit. Například schopnost AgNČ (bez ohledu na náboj) pronikat do prasečí kůže je ve srovnání s lidskou kůží vyšší [200]. Studie *in vivo* prováděná rovněž dlouhodobě (17 dní) potvrdila bezpečnost krycích materiálů ActicoatTM (velikost nanočástic 10-40 nm [201, 202]) při aplikaci na popálenou lidskou kůži [203].

2.1.11.4 AgNČ modifikace a hojení ran

V současnosti jsou vyvíjeny funkční materiály či modifikace, které by byly schopné uvolňovat stříbrné ionty v koncentraci dostatečné k zachování antibakteriálního účinku, avšak netoxické vůči savčím buňkám [107, 170]. Takovou modifikací jsou např. oligonukleotidy (Oligo- AgNČ) [165], nebo různé nanokompozity AgNČ (s algináty [204], s celulóзовými nanokrystaly [205] aj.). Modifikace AgNČ pomocí biokompatibilního ligandu či polymeru vykazuje obdobné hojivé účinky jako nemodifikované AgNČ při dosažení vyšší biokompatibility [165]. Jedním ze zkoumaných přístupů snižujících potenciální riziko AgNČ je v současnosti využití antioxidačního a protizánětlivého působení nosičů přírodního původu [173], konkrétně extraktů rostlin, které mohou být rovněž inkorporovány do krycích materiálů [21]. Jejich aditivní antibakteriální účinek

[104] může snížit potřebnou efektivní koncentraci uvolňovaných nanočástic, navíc jako antioxidanty mohou potlačovat případné negativní vedlejší účinky AgNČ na savčí buňky [206, 207].

3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Předložená disertační práce je zaměřena na studium pro-/protizánětlivého účinku vybraných látek přírodního i nepřírodního původu s využitím různých *in vitro* modelů kožních ran či *in vitro* modelu zdravé epidermis. Byla také provedena analýza molekulárních mechanismů hojivého účinku vybraných látek. Záměrem práce byla také snaha poukázat na význam studia účinků jednotlivých složek komplexních směsí léčivých přírodních extraktů, případně jejich aplikace s ohledem na průběh zánětu. Výsledky práce by mohly přispět k dalšímu pochopení významu zánětu pro hojení kožní rány a nalezení účinnějších protizánětlivých látek s možností aplikace na pokožku postiženou například chronickým zánětem.

Konkrétní cíle:

- 1) Studium pro-/protizánětlivého účinku vybraných přírodních látek (složky silymarinu – silybin; SB, dehydrosilybin; DHS, kvercetin; KVE) a syntetických látek (indometacin; IND) na monovrstvě kožních buněk a/nebo na trojrozměrném (3D) modelu rekonstruované lidské epidermis (RHE)
- 2) Studium pro-/protizánětlivého účinku subtoxických koncentrací nanočástic metalického stříbra a iontového stříbra v koncentračním rozsahu AgNČ (0,25-25 ppm) a Ag⁺ (0,025-0,25 ppm) po 24 hodinové expozici na 3D *in vitro* modelu RHE
- 3) Využití *in vitro* modelu infikované kožní rány (monovrstva kožních buněk stimulovaná LPS) a RHE poškozené dodecylsíránem sodným (SDS) pro:
 - Monitorování produkce vybraných zánětlivých markerů (IL-1, IL-6, IL-8, COX-2) kožními buňkami po expozici výše uvedeným přírodním a syntetickým látkám.
 - Sledování vlivu vybraných zkoumaných látek na signální dráhu NF-κB.
 - Posouzení protizánětlivého účinku zkoumaných látek, případně jejich vzájemné srovnání.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a chemikálie

4.1.1 Chemikálie

Adenin, akrylamid/bis-akrylamid, amfotericin B, aminokyseliny (L-glycin, L-histidin, L-izoleucin, L-metionin, L-tryptofan, L-tyrozin), ampicilin, apotransferrin, barvicí roztok Ponceau S, bromfenolová modř, Coomassie Brilliant Blue G, dimetylsulfoxid (DMSO), 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), ditiotreitrol (DTT), dodecylsírán sodný (SDS), Dulbeccem modifikované Eaglovo médium (DMEM) a epidermální růstový faktor (EFG) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Eosin, EpiLife médium bylo dodáno firmou Life Technologies (Praha, Česká republika). Fenolová červeň, fenylmetansulfonyl fluorid (PMSF), fetální hovězí sérum – tepelně inaktivované (FBS), fluorid sodný (NaF), glukóza, glycerol, HAM F12 médium, hematoxylin a 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonová kyselina (Hepes) a hovězí sérový albumin (BSA) byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4), hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4), hydrogenfosforečnan sodný heptahydrát ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), hydroxid sodný (NaOH), hydrokortizon, chlorid draselný (KCl), chlorid hořečnatý hexahydrát ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), chlorid vápenatý ($CaCl_2$), chlorid sodný (NaCl), indometacin (IND), insulin, KBM-2 bazální médium a keratinocytový růstový faktor (KGF) byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Keratinocytové růstové suplementy (HKGS) byly zakoupeny od firmy Life Technologies (Praha, Česká republika). KGM-2 SingleQuots suplementy byly zakoupeny od firmy East Port Praha s.r.o. (Praha, Česká republika). Kyselina L-askorbová, kyselina chlorovodíková (HCl), LPS z membrány gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, metanol, Nonidet-P40 (NP-40) a persírán amonný (APS) byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Primární polyklonální protilátky králičí anti-I κ B α (#9242) a králičí anti-fosfo-I κ B α (#9241) byly pořízeny od firmy Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Primární protilátky – polyklonální: kozí anti- β -aktin (sc-1616), králičí anti-c-Jun (sc-1694), králičí anti-

NF- κ B p65 (sc-372) a kozí anti-COX-2 (sc-1747); - monoklonální: myší anti-lamin B1 (sc-377000), myší anti-fosfo-c-Jun (sc-822) a sekundární protilátky – polyklonální kozí IgG protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) rozpoznávající králičí (sc-2004), králičí proti kozí (sc-2922) a králičí proti myší (sc-2005) byly zakoupeny od firmy Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Stabilizovaný roztok 10 000 U·ml⁻¹ penicilinu s 10 mg·ml⁻¹ streptomycinu (P/S), tablety Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, N,N,N',N'-tetrametyletyldiamin (TEMED), 3,3,5-trijodo-L-tyronin, tris-(hydroxymetyl)-aminometan (C₄H₁₁NO₃), Triton X-100, trypanová modř, trypsin/etyldiamintetraoctová kyselina (trypsin/EDTA; 0,25%), vanadičnan sodný (Na₃VO₄) a Tween 20 byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

4.1.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy A&D GR-202 EC (Schoeller Instruments, Praha, Česká republika)

Analytické váhy AX 105 Delta-Range (Mettler-Toledo, Greifensee, Švýcarsko)

Analytické váhy Sartorius AG (Sartorius, Goettingen, Německo)

Automatická promývačka mikrotitračních destiček Hydroflex TECAN (Schoeller Instruments, Praha, Česká republika)

Box laminární THERMO MSC 12 A Advantage (Merci, Brno, Česká republika)

Centrifuga Eppendorf MiniSpin® (Eppendorf, Německo)

Centrifuga Hettich® MIKRO 220R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Německo)

Centrifuga Hettich® ROTINA 38R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Německo)

Centrifuga Labofuge 400 (Heraeus, Hanau, Německo)

Fluorescenční mikroskop Zeiss Axiovert 40 CFL (Zeiss, Oberkochen, Německo)

Hlubokomrazící box -86°C skříňový Panasonic Health Care Biomedical (Schoeller Instruments, Praha, Česká republika)

Incubátor Queue Cellstar (Queue Systems, Bedford, VA, USA)

Lázeň vodní třepací OLS 200 (Grant Instruments Ltd, Cambridge, Velká Británie)

Lázeň vodní Memmert WNB 14 (Memmert, Schwabach, Německo)

Míchačka magnetická s ohřevem IKA RH Digital (Merci, Brno, Česká republika)

Mikroskop laboratorní Olympus CK2 inverzní mikroskop (Olympus, Praha, Česká republika)

pH metr HI-2211 Bench Top pH/mV Meter (Hanna Instruments, Praha, Česká republika)

Semi-dry blotovací systém Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BIO-RAD, Praha, Česká republika)

Spektrofotometr UV-VIS Tecan Infinite® M200 PRO Microplate Reader (Schoeller Instruments, Praha, Česká republika)

Termomixer Eppendorf Thermomixer® Comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Termostatovaná vodní lázeň s třepačkou PS 01000A (Notus-Powersonic, Vrábce, Slovensko)

Třepačka Heidolph Duomax 1030 (Merci, Brno, Česká republika)

Třepačka Heidolph Reax top/Control (Merci, Brno, Česká republika)

Zařízení pro úpravu destilované vody deionizací Ultrapur (Watrex, Praha, Česká republika)

4.1.3 Ostatní laboratorní materiál

Buněčné sítko Falcon® 40µm Cell Strainer (I.T.A.-Intertact, Praha, Česká Republika)

Filtr stříkačkový MILLIPORE Millex® 0,22 µm (Merci, Brno, Česká republika)

Injekční stříkačky INKJET 20 ml B|BRAUN (B|BRAUN, Melsungen, Německo)

Millicell® Cell Culture Insert PCF, 12 mm, 0,4 µm (Merck Millipore, Praha, Česká republika)

Membrána Immobilon-P PVDF (Merck Millipore, Praha, Česká republika)

Pinzeta Extra Fine Graefe Forceps (Fine Science Tools, Heidelberg, Německo)

Thermo Scientific™Nunc Nunclon™ kultivační láhve 25 cm²/75 cm², Petriho miska, 6jamková deska, 96jamková mikrotitrační destička, plastová pipeta 10 ml, zkumavka centrifugační 50 ml, mikrozukmavky Eppendorf (Thermo Fisher Scientific, Brno, Česká republika)

4.1.4 Roztoky pro práci s buněčnými kulturami

4.1.4.1 Roztoky pro kultivaci odebraných vzorků lidské kožní tkáně

Fosfátový pufr (PBS): pufovaný fyziologický roztok pH = 7,4; zásobní roztok PBS 10X: NaCl ($0,137 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($0,00268 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), Na_2HPO_4 ($0,00896 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,00147 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), deionizovaná voda; pracovní roztok PBS 1X: 10× zředěný zásobní roztok; sterilizace filtrací ($0,22 \mu\text{m}$ filtr; Merck Millipore (Praha, Česká republika))

Kultivační médium: médium DMEM/HAM F12 v poměru 3:1 s přidavkem 10% (v/v) FBS a uvedenými suplementy ve finálních koncentracích (adenin $26,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; ATB (směs $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ amfotericinu B; penicilin $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$; streptomycin $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); EGF $0,001 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; hydrokortizon $0,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; inzulin $0,12 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$; trijodtyronin $0,136 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; apotransferin

4.1.4.2 Roztoky pro kultivaci NHEK

Rozvolnění epidermis: 0,25 % trypsin v EDTA

Médium pro izolaci NHEK z epidermis: bazální médium KBM-2 suplementované KGM-2 SingleQuots

Roztok A: pufovaný fyziologický roztok pH = 7,4; glukóza ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($0,13 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($0,003 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), fenolová červeň ($3,3\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), Hepes ($0,03 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), deionizovaná voda; sterilizace filtrací ($0,22 \mu\text{m}$ filtr; Merck Millipore (Praha, Česká republika)); **zastavovací roztok** při pasážování NHEK – roztok A + 2% FBS

Kultivační médium: základní médium EpiLife suplementované HKGS a antibiotiky (penicillin, $50 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$; streptomycin, $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; ampicillin $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Experimentální médium: bezsérové médium; základní médium EpiLife suplementované aminokyselinami (L-histidin; L-izoleucin; L-metionin; L-tryptofan; L-tyrozin ve finálních koncentracích $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$; $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$; $0,014 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$; $0,009 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$; $0,014 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), hydrokortizonem (finální koncentrace $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a 1 % (v/v) P/S

4.1.4.3 Roztoky pro 3D kultivaci in vitro modelu RHE

Vysévací medium: základní médium EpiLife suplementované HKGS a antibiotiky (penicillin $50 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$; streptomycin $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; ampicillin $0,25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) s přídávkem CaCl_2 ($1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Kultivační medium: vysévací medium doplněné kyselinou L-askorbovou ($50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), KGF ($10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) a CaCl_2

Experimentální médium: viz experimentální médium pro NHEK

4.1.4.4 Roztoky pro kultivaci NHDF

Kultivační medium: médium DMEM suplementované 10% (v/v) FBS a 1% (v/v) P/S

Experimentální médium: bezsérové médium DMEM s přídávkem antibiotik 1% (v/v) P/S.

4.1.5 Testovaný materiál

4.1.5.1 Analyzované přírodní látky

Biologicky aktivní složka ostropestřce mariánského, flavonoid SB, byla izolována ze surového extraktu a následně upravena na oxidovanou formu DHS v Laboratoři biotransformací Mikrobiologického ústavu AV ČR (Praha, Česká republika). Postup přípravy DHS z jeho parentní sloučeniny SB je publikován autory Gažák a kol. (2004) [126]. Flavonoid KVE byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

Milimolární koncentrace vzorků DHS, SB a KVE byly připraveny rozpuštěním v aprotickém polárním rozpouštědle dimetylsulfoxidu (DMSO). Experimentální vzorky látek byly připraveny ředěním v příslušném bezsérovém médiu pro buněčné kultury. Finální koncentrace DMSO v experimentálním vzorku byla 0,1 % (v/v). Testované koncentrace flavonoidů byly následující: $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (monovrstva kožních buněk); $15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (RHE).

4.1.5.2 Analyzované syntetické látky

Experimentální vzorky nesteroidního protizánětlivého léčiva IND, zakoupeného od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika), byly připraveny identickým způsobem a ve stejných koncentracích jako v případě analyzovaných přírodních látek uvedených výše.

Nanočástice AgNČ byly připraveny firmou NanoTrade s.r.o. (Frýdek Místek, Česká republika) redukcí vodného roztoku dusičnanu stříbrného (AgNO_3) tetrahydroboritanem sodným (NaBH_4). Velikost nanočástic v experimentálním roztoku AgNČ byla přibližně 10 ± 5 nm (> 50 %). Zeta potenciál AgNČ byl -22 mV a pH roztoku 7,1. Analyzované vzorky byly připraveny přímou dispergací dodaného roztoku nanočástic v příslušném bezsérovém médiu pro buněčné kultury a následným ředěním na požadovanou koncentraci. Koncentrace AgNČ v analyzovaných vzorcích byly následující: 0,25 ppm, 2,5 ppm a 25 ppm. Stříbro tedy bylo analyzováno jako roztok stříbrných iontů (AgNO_3) či suspenze metalického stříbra (AgNČ).

4.1.6 Biologický materiál

Kožní buňky, normální lidské dermální fibroblasty (NHDF) a normální lidské epidermální keratinocyty (NHEK), byly izolovány ze vzorků kožní tkáně zdravých dobrovolníků, kteří všichni podepsali informovaný souhlas. Vzorky kůže byly převážně odebírány z kožního laloku při redukci prsní tkáně, nebo při abdominoplastice na Oddělení Plastické a estetické chirurgie FN Olomouc. Studie byla schválena etickou komisí FN a LF UP Olomouc (Ref. No. 41/09) a prováděna v souladu s etickými standardy splňujícími české i mezinárodní normy. Původ a morfologie primárních buněčných kultur byly ověřeny na Ústavu histologie a embryologie LF UP Olomouc.

4.2 Postup izolace a kultivace primárních kultur

Vzorky kožní tkáně a následně vyizolované kožní buňky byly zpracovávány ve sterilním prostředí laminárního boxu. Není-li uvedeno jinak, byly veškeré roztoky aplikované na buňky sterilní a předeřtávané na teplotu 37 °C.

Chirurgicky odebraná kožní tkáň byla vložena již na operačním sále Oddělení Plastické a estetické chirurgie FN Olomouc do sterilního transportního roztoku (100 ml PBS + 2 ml ml ATB), v němž byla přenesena do sterilní laboratoře tkáňových kultur ke zpracování:

1. Tkáň byla promyta PBS, aby došlo k odstranění krevních sraženin. Dále byla nastříhána na čtverce o rozměrech přibližně 1×1 cm, umístěna na Petriho misku (\varnothing 90 mm) a kultivována v médiu za standardních kultivačních podmínek (37°C , 5% CO_2 , 95% relativní vlhkost vzduchu) umožňujících růst NHDF. Médium bylo vyměňováno za čerstvé přibližně $2 \times$ týdně.
2. Část tkáně byla očištěna od zbytků podkoží, nastříhána na drobnější části a vložena do roztoku 0,25 % trypsinu v EDTA. Takto byla ponechána při 4°C do následujícího dne. Rozvolnění epidermis v roztoku trypsin/EDTA umožnilo následující izolaci NHEK.

4.2.1 Izolace NHEK

Při izolaci NHEK bylo pracováno se studenými roztoky (4°C) na ledě. Epidermis rozvolněná inkubací v roztoku trypsin/EDTA byla oddělena pomocí pinzety od dermis a přenesena do média pro izolaci suplementovaného 2 % FBS. Buňky byly homogenně mechanicky rozsuspendovány a suspenze přefiltrovaná přes buněčné sítko (Cell Strainer $40\ \mu\text{m}$) byla následně šetrně centrifugována (1300 rpm; 10 min; 4°C). Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet rozsuspendován v čerstvém vychlazeném médiu (10 ml) pro izolaci. Suspenze buněk v izolačním médiu byla přenesena do kultivační lahve (kultivační plocha $25\ \text{cm}^2$; doporučená koncentrace buněk $46000\ \text{buněk}/\text{cm}^2$) s přídatkem $25\ \mu\text{l}$ FBS a dále již ponechána růst při standardních kultivačních podmínkách. Třetí den bylo izolační médium nahrazeno médiem kultivačním. Kultivační médium bylo vyměňováno za čerstvé každý druhý den.

Po dosažení 80% konfluence byly buňky pasážovány. Kultivační médium bylo odstraněno, buňky byly omyty roztokem A a uvolněny ode dna kultivační lahve pomocí roztoku trypsin/EDTA. V případě potřeby bylo nejprve provedeno

přečištění NHEK od případné kontaminace buňkami NHDF (trypsin/EDTA; 2 min). Uvolněné buňky NHDF byly odmyty a odolnější NHEK inkubovány s čerstvým roztokem trypsin/EDTA přibližně 15 minut.

Dále již bylo pracováno na ledě se studenými roztoky. Účinek trypsinu byl přerušen pomocí zastavovacího roztoku. Suspenze buněk byla centrifugována (1300 rpm; 10 min; 4 °C) a vytvořený pelet rozsuspendován v kultivačním médiu s přídavkem 25 µl FBS. Suspenze buněk (dle doporučené koncentrace) byla přenesena do 75 cm² kultivační lahve a doplněna do 25 ml celkového objemu kultivačním médiem. Kultivační médium bylo vyměňováno za čerstvé každý druhý den.

4.2.2 Izolace NHDF

Po pokrytí dna Petriho misky konfluentní monovrstvou NHDF byla provedena jejich izolace. Kultivační médium pro kůži bylo odstraněno a buňky omyty sterilním PBS k eliminaci případných zbytků séra, jež by inhibovalo aktivitu následně aplikovaného trypsinu v EDTA. Trypsin umožnil uvolnění buněk adherovaných k plastovému dnu kultivační misky. Zastavení jeho činnosti bylo provedeno přidáním kultivačního média pro NHDF se sérem. Suspenze buněk byla přenesena do kultivační lahve (kultivační plocha 75 cm²). Buňky byly kultivovány při standardních kultivačních podmínkách s pravidelnou výměnou média (objem 25 ml) každé 3 dny.

Pasáž na konfluentní vrstvě buněk byla provedena stejným způsobem jako v případě jejich izolace. V tomto případě však byla do nové 75 cm² kultivační lahve přenesena pouze 1/10 získané suspenze buněk a doplněna do 25 ml celkového objemu čerstvým kultivačním médiem.

4.3 Experimentální *in vitro* modely hojení ran se zánětem

4.3.1 Monovrstva škrábnutých kožních buněk NHDF

Buňky ve třetí pasáži byly vysety na Petriho misku (ø 90 mm) v hustotě $0,5 \times 10^5$ buněk/cm², aby bylo dosaženo 100% konfluence následující den. Simulace rány byla vytvořena prostřednictvím škrábnutí konfluentní monovrstvy

buněk pomocí sterilní plastové pipety (objem 10 ml). Buňky uvolněné škrábnutím byly odmyty pomocí PBS. Zánět v ráně byl indukován přidáním LPS z membrány gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (finální koncentrace $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) do bezsérového média. Koncentrace LPS byla zvolena na základě předchozích experimentů v naší laboratoři [208].

4.3.1.1 Experimentální protokoly

Pro veškeré experimenty bylo zvoleno bezsérové médium s přídavkem P/S. Škrábnuté buňky byly nejprve inkubovány s experimentálním médiem obsahujícím LPS anebo bez něj po dobu 6 hodin. Před aplikací experimentálních vzorků zkoumaných látek byly buňky opláchnuty PBS. Následně byly aplikovány testované přírodní látky v příslušných koncentracích po dobu 24 hodin. Pozitivní kontrolu představovaly škrábnuté buňky inkubované nejprve s LPS a následně pouze s experimentálním médiem obsahujícím rozpouštědlo v koncentraci odpovídající jeho množství ve všech analyzovaných vzorcích přírodních látek (0,1 % (v/v) DMSO). Podobně tomu bylo v případě negativní kontroly, avšak bez přídavku LPS. Experimenty byly opakovány nezávisle na sobě s použitím buněk získaných z kožní tkáně tří až pěti různých dárců.

V další fázi zkoumání, kdy byl posuzován možný synergický či antagonistický vztah mezi vybranými testovanými látkami a LPS, byl zvolen pozměněný experimentální protokol. V tomto případě byly buňky inkubovány 6 hodin současně s LPS a testovanými látkami. Škrábnuté buňky inkubované pouze s LPS v experimentálním médiu s přídavkem 0,1 % (v/v) DMSO představovaly pozitivní kontrolu. Příprava negativní kontroly měla stejné schéma, pouze při ní nebylo přidáno LPS. Experimenty byly provedeny nezávisle na sobě a buňky k analýze byly získány od tří různých pacientů.

4.3.2 Trojrozměrný *in vitro* model RHE

Postup přípravy RHE byl převzat z publikace autorů *Poumay et al.*[209]. Do kultivační desky se šesti jamkami byly vsazeny inertní polykarbonátové inzerty Millicell (velikost pórů $0,4 \mu\text{m}$; plocha $1,2 \text{ cm}^2$). Buňky po druhé pasáži byly

vysazeny na inzerty v suspenzi ($0,25 \times 10^6$ buněk/cm²; 0,5 ml vysévací médium) a okolo bylo aplikováno 2,5 ml média EpiLife s přídavkem HKGS a antibiotik (viz kultivační médium pro NHEK). Následující den bylo vysévací médium odstraněno a médium EpiLife s přídavkem HKGS a antibiotik nahrazeno čerstvým kultivačním médiem s přídavkem 1,5 mM CaCl₂, kyseliny L-askorbové (50 µg·ml⁻¹) a KGF (10 ng·ml⁻¹). Takto byly vytvořeny podmínky pro kultivaci RHE na rozhraní vzduch-kapalina. Médium bylo vyměňováno každý druhý den po dobu 14 dní. Tato doba byla nezbytná k dosažení plné diferenciaci buněk do jednotlivých vrstev epidermálního ekvivalentu s odpovídajícími bariérovými vlastnostmi a metabolickou aktivitou.

4.3.2.1 Experimentální protokoly

Trojrozměrný model epidermis byl využit k analýze pro-/protizánětlivého účinku přírodních či syntetických látek na modelu zdravé epidermis, a dále k posouzení možného vlivu na rychlejší regeneraci uměle vytvořené epidermis v případě poškození iritantem.

Suspenze zkoumaných látek v požadované koncentraci byla nanášena bezprostředně na povrch rohové vrstvy modelu zdravé epidermis. Po 24hodinové expozici byla RHE podrobena histologické analýze k posouzení morfologických změn a okolní médium využito k analýze vyloučených cytokinů.

Pro vytvoření 3D zánětlivého modelu hojení bylo využito dráždivého účinku povrchově aktivní látky SDS. Iritant byl rozpuštěn v experimentálním médiu a topicky aplikován v koncentraci 1% (v/v) po dobu 5 hodin. Před aplikací experimentálních vzorků zkoumaných látek byla RHE opláchnuta roztokem A. Následně byly aplikovány testované látky v příslušných koncentracích po dobu 24 hodin.

Pro zánětlivý model hojení, a také pro model zdravé epidermis, byla jako negativní kontrola zvolena RHE inkubovaná pouze s experimentálním médiem bez obsahu zkoumaných látek či SDS. V případě modelu hojení představovala zánětlivá epidermis, vystavená 5hodinovému působení SDS a následně experimentálnímu médiu s přídavkem 0,1 % (v/v) DMSO, pozitivní kontrolu.

4.3.2.2 Zpracování vzorků k histologické analýze

Po skončení inkubační doby byla RHE jednu hodinu fixována pomocí roztoku Baker (10% (v/v) formaldehyd, 2% (w/v) CaCl_2) a poté promyta 3×10 min s metanolem. Fixovaná RHE na polykarbonátovém filtru byla vyříznuta skalpelem z inzertu a následně inkubována 3×10 min s toluenem. Takto připravený vzorek byl zalit parafinem pro přípravu histologických řezů. Po deparafinizaci byly vzorky histologicky barveny hematoxylinem-eosinem nebo imunofluorescenčními protilátkami anti-cytokeratin 14 a anti-lorikrin (Abcam, Cambridge, Velká Británie; ředění 1:500 v PBS). Po inkubaci s fluorescenčně značenými sekundárními protilátkami Alexa Fluor 594 A Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; ředění 1:2000 v PBS) byly vzorky zamontovány a vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu.

4.4 Metody

4.4.1 MTT test

Princip: MTT test je standardně prováděn za účelem stanovení buněčné viability. Pomocí uvedeného testu lze sledovat aktivitu intracelulárních enzymů respiračního řetězce. Mitochondriální dehydrogenázy redukují žlutou tetrazoliovou sůl MTT na fialově zbarvený produkt formazán, který je spektrofotometricky kvantifikován při vlnové délce 540 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná viabilitě buněk.

Postup: Buňky NHDF byly vysety na 96jamkovou destičku v hustotě $0,8 \times 10^3$ buněk/jamka. Následující den byly na konfluentní monovrstvu buněk aplikovány testované látky (DHS, SB, KVE a IND) v koncentračním rozmezí 5-50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, negativní kontrola (0,1% (v/v) DMSO) a pozitivní kontrola (1,5% (v/v) Triton X-100). Viabilita buněk byla posuzována po 24hodinové inkubaci, kdy bylo aplikováno 100 μl roztoku MTT v experimentálním médiu v poměru 1:10. Formazánové krystalky vytvořené viabilními buňkami po 3hodinové inkubaci byly rozpuštěny pomocí 1% NH_3 v DMSO a spektrofotometricky kvantifikovány při 540 nm. Každá testovaná koncentrace byla analyzována v hexapletu ve třech nezávislých opakováních.

Pracovní roztoky: MTT ($5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), PBS ($\text{pH} = 7,4$), 1% NH_3 v DMSO

4.4.2 ELISA (enzymově značená imunovazebná analýza)

Princip: Metoda je založena na specifické interakci antigenu s protilátkou. Jednou z variant je ukotvení primární protilátky na dno 96-ti jamkové desky a její následná interakce se sledovaným antigenem, který je rozpoznán sekundární enzymově značenou protilátkou (sendvičová metoda). Enzym katalyzuje přeměnu přidaného substrátu na barevný produkt, který je spektrofotometricky stanoven. Koncentrace antigenu je přímoúměrná intenzitě signálu.

Postup: Koncentrace cytokinů IL-6 a IL-8, uvolněných do média po 24hodinové inkubaci s analyzovanými látkami, byla stanovena pomocí ELISA Development kitu (Peprotech; Praha, Česká republika). Při analýze bylo postupováno dle protokolu výrobce.

Pracovní roztoky: PBS ($\text{pH} = 7,2$), promývací pufr (0,05% Tween-20 v PBS), blokovací pufr (1% BSA v PBS), diluent (0,05% Tween-20 + 0,1% BSA v PBS), ABTS substrát (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika).

4.4.3 Western blot

Princip: Metoda umožňuje stanovit proteiny v analyzované směsi proteinů po jejich elektroforetické separaci a následném přenesení na membránu, kde jsou detekovány pomocí protilátky.

Postup: Po skončení experimentu byly buňky opláchnuty PBS (4°C) a sesbírány k centrifugaci (4700 rpm; 5 min; 4°C). Vzniklý pelet byl lyzován. Koncentrace proteinu v celkovém buněčném lyzátu (přípraven pomocí RIPA pufru; provedení dle [210]) nebo v cytosolickém/jaderném lyzátu (příprava pomocí hypo-/hypertonického pufru; podrobně viz [211]) byla stanovena spektrofotometricky ($\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$) pomocí Bradfordova činidla. Jednotlivé vzorky (20 μg proteinu) byly nanášeny na 10% SDS-polyakrylamidový gel (SDS-PAGE) a separovány v elektrickém poli podle své molekulové hmotnosti. Separované proteiny byly přeneseny na membránu z polyvinylidenfluoridu (PVDF). Membrány byly blokovány vůči nespecifickým interakcím s protilátkami

v 5% netučném mléku v TBS s obsahem 0,1% Tween-20 (TBS-T) po dobu 2 hodin. Poté byly inkubovány přes noc (4°C) s odpovídající primární protilátkou vůči sledovanému proteinu (ředění 1:1000 v 5% netučném mléku v TBS-T). Následující den byly membrány po odmytí nenavázaných proteinů pomocí TBS-T inkubovány se sekundární protilátkou, enzymově značenou křenovou peroxidázou (HRP) (inkubace 2 hodiny; ředění 1:10000 ve 2,5% netučném mléku v TBS-T). Sledovaný protein byl chemiluminiscenčně vizualizován na fotografický film s využitím chemiluminiscenčního kitu Western Blotting Luminol Reagent kit (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA). Relativní intenzita signálu byla denzitometricky kvantifikována pomocí ImageJ softwaru (1.48v; National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA). Western blot byl využit k detekci proteinů c-Jun, NF-κB p65, COX-2, lamin B1 a β-aktin (podrobnější charakterizace protilátek viz chemikálie).

Pracovní roztoky: roztok pro separační gel (1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl; pH = 8,8)/ roztok pro zaostřovací gel (0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl; pH = 6,8) + 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) APS, 40% (w/v) akrylamid/bis-akrylamid, TEMED; 10 × TBS (0,25 mol·l⁻¹ Tris báze, 2 mol·l⁻¹ NaCl; pH = 7,5), TBS-T (1 × TBS + 0,1% Tween-20), vzorkovací pufr (0,125 mol·l⁻¹ Tris-HCl, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 0,2 mol·l⁻¹ DTT, 0,02% (w/v) bromfenolová modř; pH = 6,8).

ABTS substrát společně s 10 × Tris/Glycin/SDS pufrem a 10 × transferovým pufrem pro semi-dry blotovací systém byly zakoupeny od firmy Merck (Praha, Česká republika).

4.4.4 Izolace RNA a reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-qPCR)

Princip: Metoda Real-time PCR umožňuje kontinuální kvantifikaci produktu (amplifikovaného úseku DNA) generovaného v průběhu každého PCR cyklu, který má tři teplotně odlišné fáze; denaturace DNA, hybridizace - nasednutí primerů a syntéza DNA. Syntéza produktu začíná od tzv. primeru (synteticky připravený specifický fragment DNA) pomocí termostabilní DNA polymerázy. Detekce

produktu je umožněna prostřednictvím zavedení značené hybridizační sondy komplementární cílové sekvenci DNA, která je po navázání vizualizována. Reverzně transkriptázová varianta PCR využívá vyizolovanou RNA ze vzorku. Ta však musí být nejprve přepsána do komplementární DNA (cDNA) reverzní transkriptázou, aby mohla sloužit jako PCR templát k amplifikaci.

Postup: Ihned po ukončení experimentu byla celková buněčná RNA ze vzorku vyizolována prostřednictvím Nucleospin® RNA kitu (MachereyNagel; Bethlehem, PA, USA) dle protokolu výrobce. Po izolaci byla použita DNáza I k odstranění případné kontaminující genomové DNA ze vzorku. Koncentrace a čistota RNA byla stanovena spektrofotometricky při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm. Kontrola celistvosti byla provedena agarózovou gelovou elektroforézou. Vzorek RNA v množství 1 µg byl poté reverzně transkribován do cDNA pomocí M-MLV reverzní transkriptázy (kit od firmy Invitrogen; Waltham, MA, USA) na přístroji CFX96™ Real-Time PCR Detection systém (BIO-RAD; Hercules, CA, USA) s nastavením termocyklu: 50°C, 37 min; 70°C, 15 min. Amplifikace cDNA byla provedena pomocí PCR v reálném čase na přístroji StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) s využitím specifických primerů designovaných Primer Express Softwarem (verze 3.0.1, Applied Biosystems). Amplifikace probíhala za následujících podmínek: iniciace (95 °C, 10 min); následovaná čtyřiceti cykly denaturace při 95 °C (15 s), nasednutí primerů a syntéza komplementárního řetězce při 60 °C (60 s). Relativní množství mRNA bylo stanoveno pomocí komparativní C_T metody ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) s normalizací na hladinu exprese referenčního genu RPL13A.

Sekvence primerů (5'→3'):

- **RPL13;** F-GAGGTATGCTGCCCCACAAA, R-GTGGGATGCCGTCAAACAC;
- **IL-6;** F-CACACAGACAGCCACTCACC, R-TTTCACCAGGCAAGTCTCCT;
- **IL-8;** F-GTGCAGTTTTGCCAAGGAGT, R-CTCTGCACCCAGTTTTCTT;
- **p65;** F-TAGGAAAGGACTGCCGGGAT, R-CCGCTTCTTCACACACTGGA;
- **IκB;** F-CCATGGTCAGTGCCTTTTCT, R-GTCAAGGAGCTGCAGGAGAT;
- **c-Jun;**F-GAAGTGTCCGAGAACTAAAG, R-AAAAGTCCAACGTTCCGTTC.

Pracovní roztoky:

- Kontrola čistoty a celistvosti: $50 \times$ TAE ($2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris báze, $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CH_3COOH , $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, dH_2O), 2% agaróza v $0,5 \times$ TAE, ExactLadder DNA Premix Log 2 (Ozyme, St.Quentin, Francie), ethidium bromid (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA); Deoxynukleotidy (dNTP; $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a kit Tag DNA Polymerase, případně kit DNase I Amplification Grade byly zakoupeny od firmy Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- Reverzní transkripce: kit M-MLV Reverse Transcriptase a dNTP ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) od Invitrogen Waltham, MA, USA), oligonukleotidy (oligo(dT); $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) od firmy Eurogentec (Angers, Francie)
- RT-qPCR: ThermoPower SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)

4.4.5 Gelová retardační analýza (EMSA)

Princip: Elektroforetická metoda umožňující studium interakcí mezi proteinem a specifickým úsekem DNA. Metoda spočívá v rozdílné elektroforetické pohyblivosti komplexu protein-DNA ve srovnání s volnou DNA. Komplex je vzhledem ke své velikosti oproti nenavázané DNA při průchodu gelem pomalejší (je tzv. retardován).

Postup: DNA-vazebná aktivita podjednotky p65 transkripčního faktoru NF- κ B k odpovídající sekvenci byla posuzována v jaderném lyzátu (příprava viz Western blot). Reakční směs tvořená jaderným lyzátem ($10 \text{ }\mu\text{g}$ proteinu), sondou značenou biotinem, vazebným pufrem, hypertonickým pufrem a kompetitorem (poly(dI-dC).(dI-dC).; nespecifická kompetitorová DNA potlačující nespecifické interakce; koncentrace $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) byla inkubována 30 min při pokojové teplotě. Následně byla přidána bromfenolová modř k vizualizaci migrace vzorku v neredukujícím 7% polyakrylamidovém gelu. Po elektroforetické separaci byly proteiny přeneseny na PVDF membránu a inkubovány s streptavidin-HRP konjugátem (ředění 1:2500 v 1% BSA v TBS-T) k umožnění následné vizualizace po přidání chemiluminiscenčního substrátu PlusECL (PerkinElmer, Boston, MA, USA). Chemiluminiscenční signál byl vizualizován pomocí ChemiDocTM XRS+ system (BIO-RAD; Hercules, CA, USA).

Pracovní roztoky: vazebný pufr (20 mmol·l⁻¹ Tris báze; pH = 8, 0,3 mol·l⁻¹ KCl, 1 mmol·l⁻¹ EDTA; pH = 8, 0,2% (v/v) Triton X-100, 25% (v/v) glycerol), roztok pro separační gel: 10 × TBE (0,9 mol·l⁻¹ Tris báze, 0,9 mol·l⁻¹ kyselina boritá, 0,02 mol·l⁻¹ EDTA; pH = 8), 30% (w/v) akrylamid/bis-akrylamid, 10% (w/v) APS, TEMED; migrační pufr (0,5 × TBE), TBS-T (viz Western blot), vzorkovací pufr (1 mol·l⁻¹ Tris báze; pH = 8, 0,1% (w/v) bromfenolová modř).

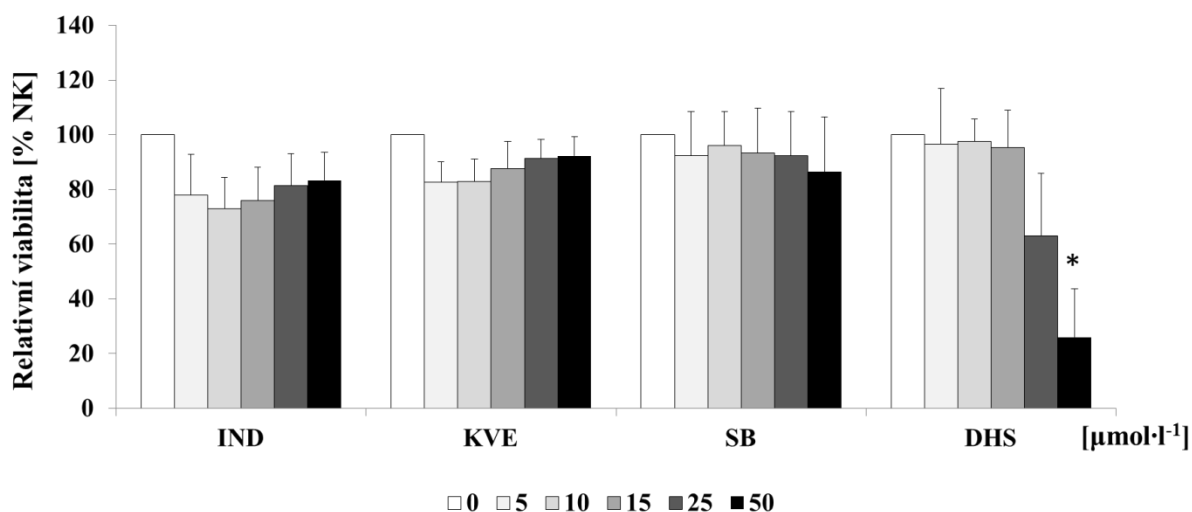
5' - koncově značený specifický oligodeoxynukleotid:

5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' (Eurogentec, Seraing, Belgie)

5 VÝSLEDKY

5.1 Cytotoxický profil analyzovaných přírodních látek

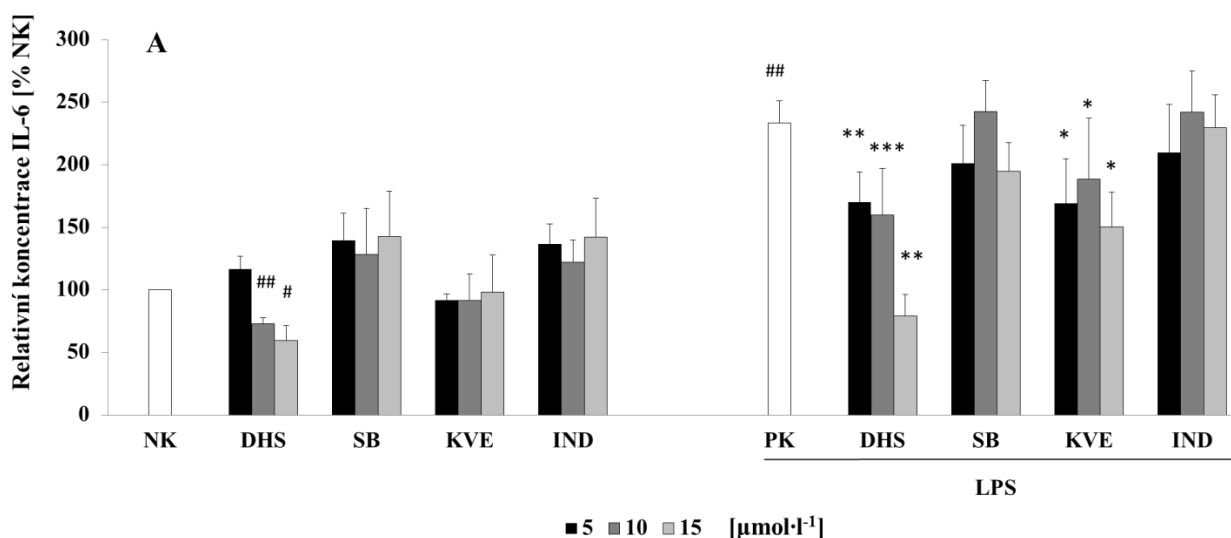
Před vlastním experimentem byla stanovena viabilita buněk NHDF po 24hodinové expozici vybraným složkám silymarinu a protizánětlivého léčiva IND. Látky DHS, SB, KVE a IND byly testovány v koncentrační řadě 0 až 50 μM . Přestože látky SB, KVE a IND nezpůsobovaly ve zvoleném koncentračním rozsahu signifikantní pokles viability buněk, oxidovaný derivát silybinu DHS vykazoval zjevný cytotoxický účinek. Jak je patrné z grafu (obr. 7), již koncentrace 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ snížila aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz. Signifikantní redukce mitochondriální funkce byla pozorována u NHDF exponovaných 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS. Na základě výsledků MTT testu byly vybrány experimentální koncentrace 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB, KVE, DHS a IND jako nejvhodnější k posouzení protizánětlivého a hojivého účinku *in vitro* na monovrstvě škrábnutých buněk NHDF.

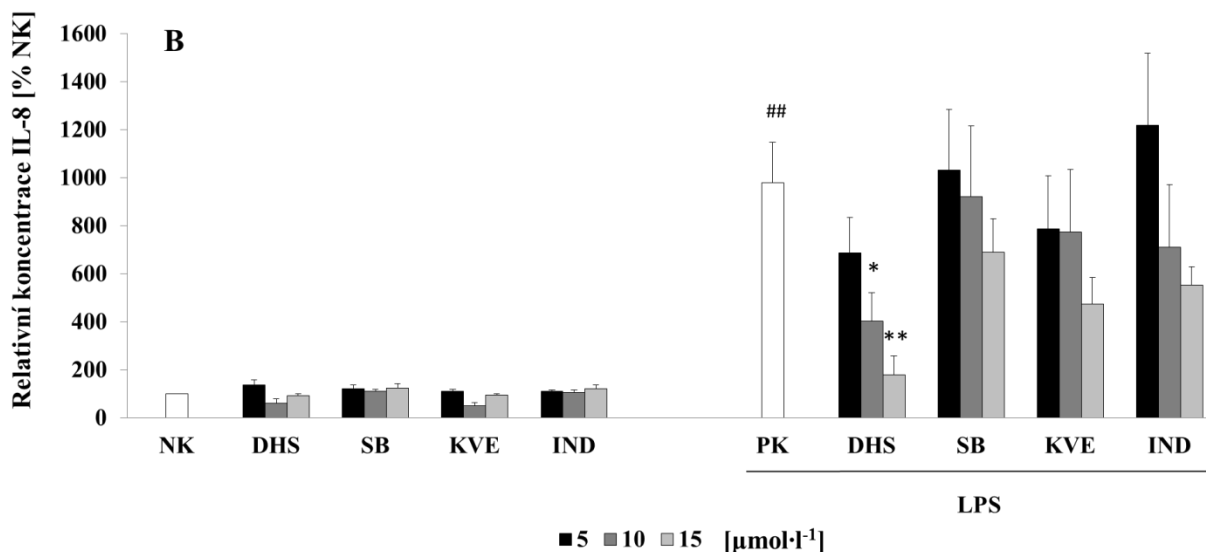


Obrázek 7. Vliv KVE, SB, DHS a IND v koncentračním rozmezí 0 až 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na viabilitu buněk NHDF po 24hodinové expozici byl posouzen MTT testem. Úroveň viability je vyjádřena v procentech negativní kontroly (NK; odpovídající 100 %) jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) ze tří nezávislých opakování ($n = 3$). Signifikantní pokles viability je indikován $*p < 0,05$ ve srovnání s kontrolní populací buněk (0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém experimentálním médiu).

5.2 Vliv DHS, SB, KVE a IND na sekreci prozánětlivých cytokinů

Cytokiny IL-6 a IL-8 představují tzv. zánětlivé markery, protože jejich koncentrace jsou u nehojících se ran zvýšeny v důsledku přetrvávání zánětlivé fáze, k čemuž v případě správného průběhu hojení nedochází [212]. Pro stimulaci zánětu v *in vitro* modelu hojení škrábnutých buněk NHDF byl aplikován LPS *P. aeruginosa* [81, 208] v bezsérovém médiu na 6 hodin (pozitivní kontrola; PK). Bakteriální LPS v koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ významně zvýšil sekreci IL-6 ve srovnání s kontrolní buněčnou populací neexponovanou LPS (negativní kontrola; NK) (obr. 8A). Jak je však patrné z grafu (obr. 8B), LPS je významně účinnějším induktorem chemoatraktantu IL-8. Po následné 24hodinové expozici DHS nebo KVE došlo u LPS-stimulovaných buněk k významnému poklesu hodnot IL-6 pro všechny studované koncentrace. Významnější koncentračně závislý efekt vykazoval DHS, který však potlačoval také zvýšenou sekreci IL-6 vyvolanou samotným škrábnutím buněk. DHS byl rovněž jedinou ze zkoumaných látek významně účinnou vůči nadprodukci IL-8 buňkami exponovanými LPS.



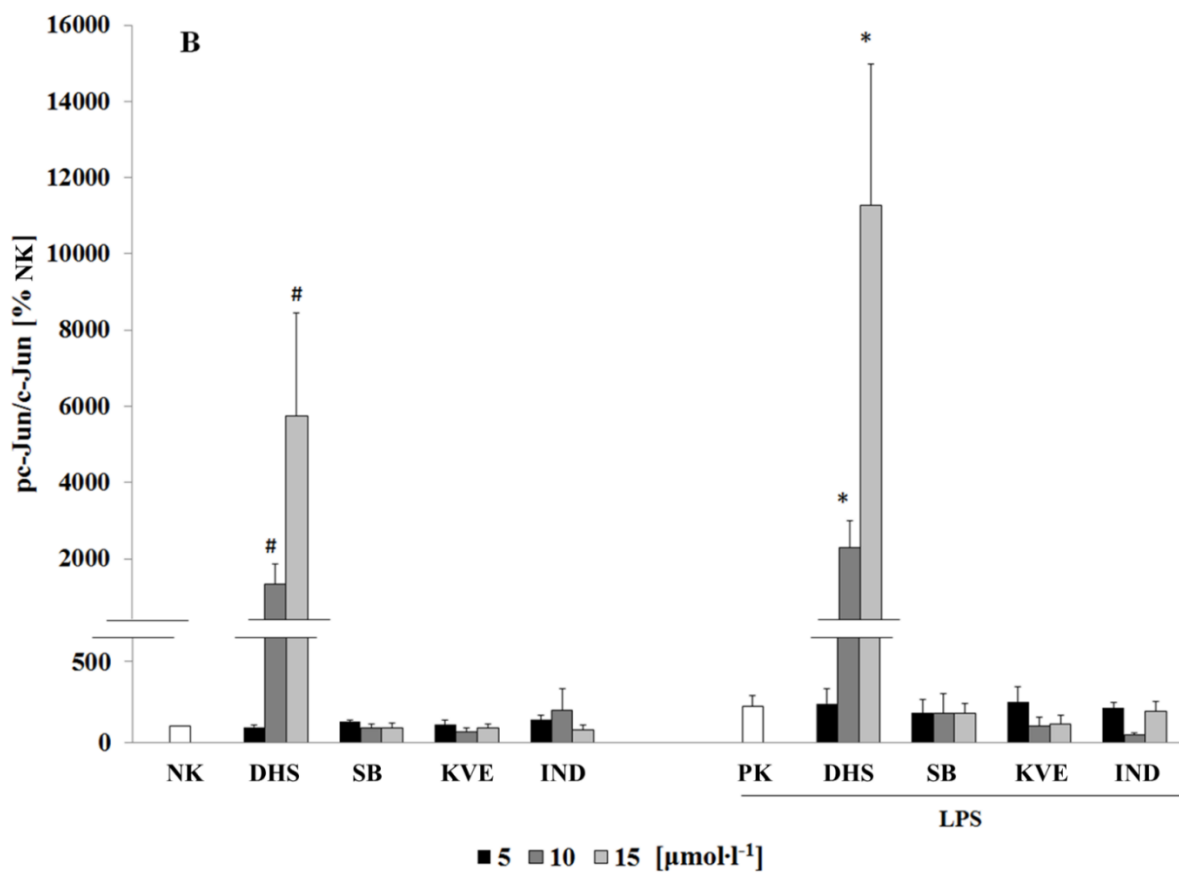
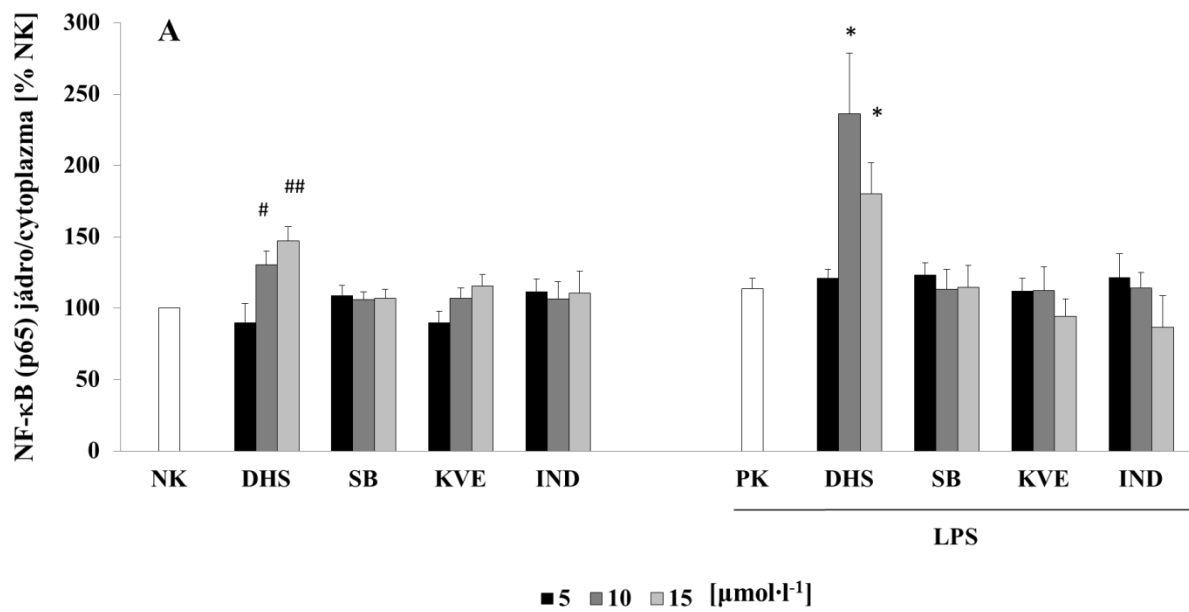


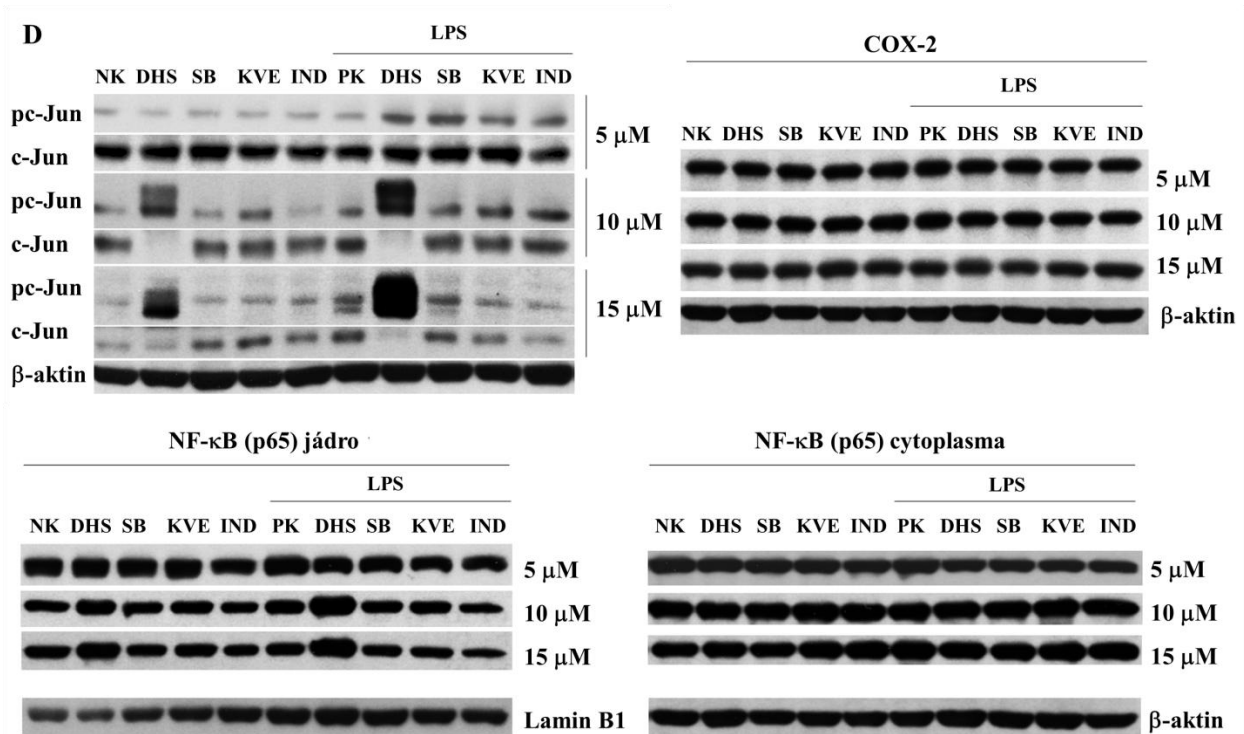
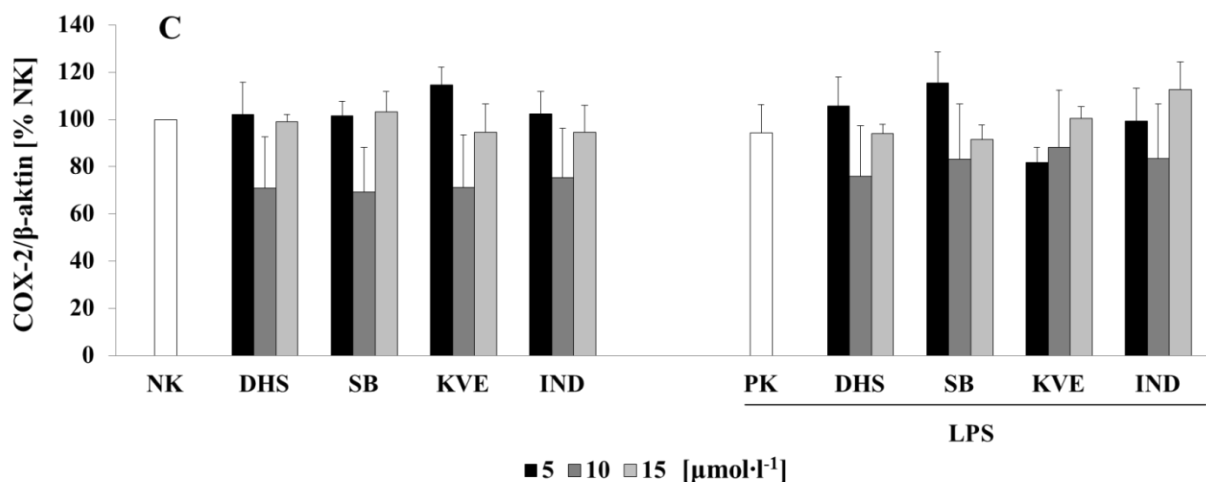
Obrázek 8. Cytokiny IL-6 (A) a IL-8 (B) uvolněné buňkami do média po 6hodinové inkubaci s LPS, příp. bez něj, následně vystavené 24hodinovému působení $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB, KVE, DHS a IND byly stanoveny pomocí metody ELISA. Výsledné hodnoty jsou prezentovány v procentech NK (0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) jako průměr \pm SEM; $n = 3$. Signifikantní změny ve srovnání s NK jsou označeny # $p < 0,05$, příp. ## $p < 0,01$. Při signifikantních změnách vztažených k pozitivní kontrole (PK; 6 hodin inkubace s LPS následovaná 24hodinovou inkubací s 0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) je značení následující: * $p < 0,05$, příp. ** $p < 0,01$.

5.3 Analýza předpokládaných cílových proteinů protizánětlivého působení DHS, SB, KVE a IND pomocí Western blotu

Nejznámějšími transkripčními faktory zapojenými do iniciace genové exprese prozánětlivých mediátorů (např. IL-6, IL-8 či COX-2) jsou NF- κ B a AP-1[37, 213]. Vliv DHS, SB, KVE a IND na aktivaci těchto významných proteinů, konkrétně podjednotek p65/NF- κ B a c-Jun/AP-1, byl analyzován metodou Western blot (obr. 9A, 9B, 9D). Z grafu je patrné, že po expozici nejúčinnější látky (dle předchozího experimentu) DHS, v koncentracích $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, bylo množství p65 v jádře či fosforylované pc-Jun vyšší ve srovnání s kontrolní populací buněk. V případě buněk exponovaných LPS byl efekt ještě výraznější.

Naopak žádná ze zkoumaných látek neměla signifikantní vliv na produkci enzymu COX-2 (obr. 9C), jež je vlivem NF- κ B kontrolována.





Obrázek 9. Fotografický záznam (D) a jeho grafické vyjádření (A, B, C) představují výsledky Western blotu využitého při analýze aktivace transkripčních faktorů NF- κ B a AP-1, a také produkce jimi regulovaného proteinu COX-2. Graf A zobrazuje přesun NF- κ B (p65) do jádra, graf B fosforylaci c-Jun a graf C množství endogenního prozánětlivého proteinu COX-2. Analýza byla provedena po 6hodinové inkubaci NHDF s LPS či bez něj v bezsérovém médiu a následnému 24hodinovému působení 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB, KVE, DHS a IND. Data jsou prezentována v procentech NK (0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) jako průměr \pm SEM; n = 5. Signifikantní změny ve srovnání s NK jsou značeny # p < 0,05, příp. ## p < 0,01. Signifikantní změny ve srovnání s PK (6 hodin

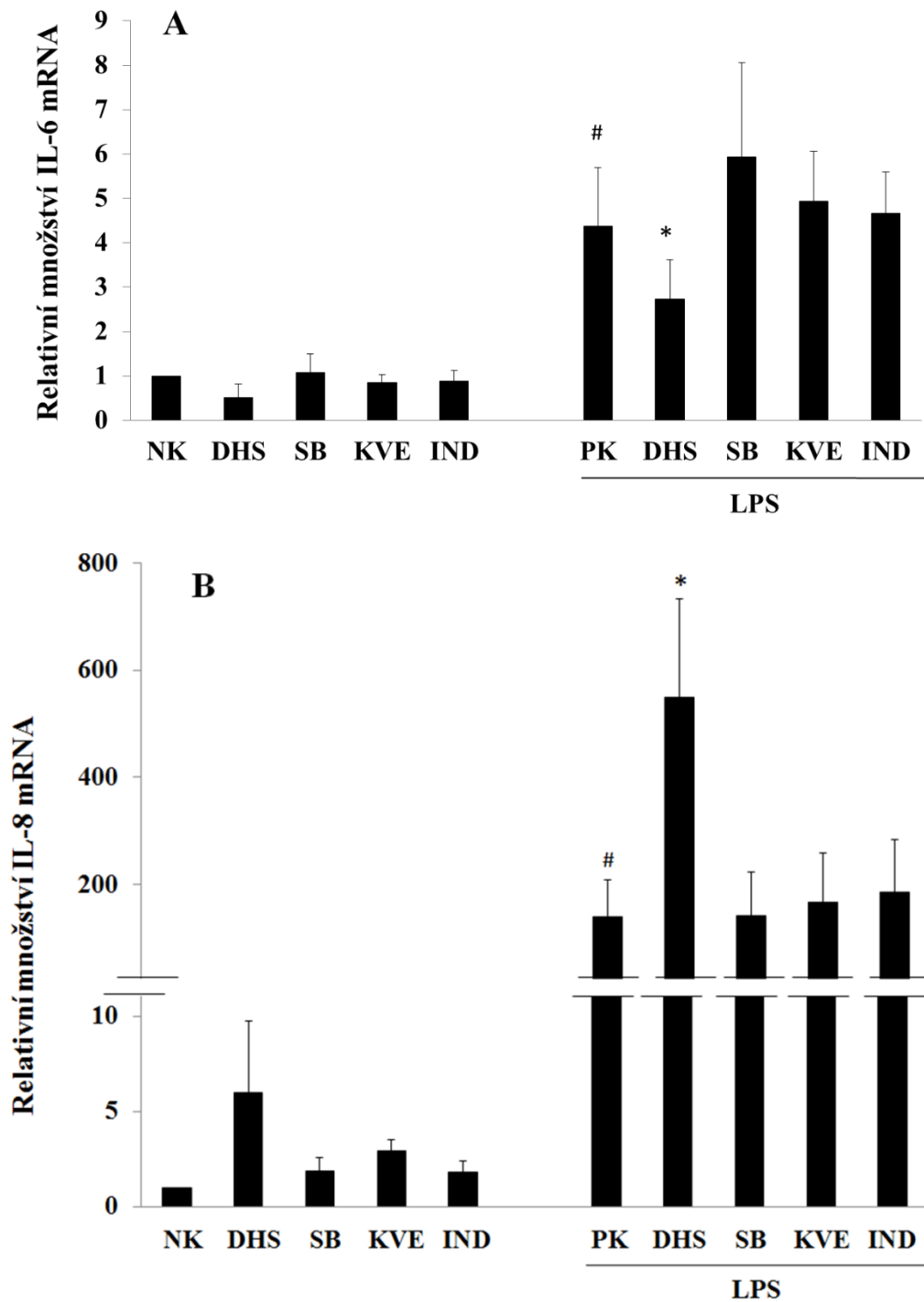
inkubace s LPS následovaná 24hodinovou inkubací s 0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) jsou označeny * $p < 0,05$.

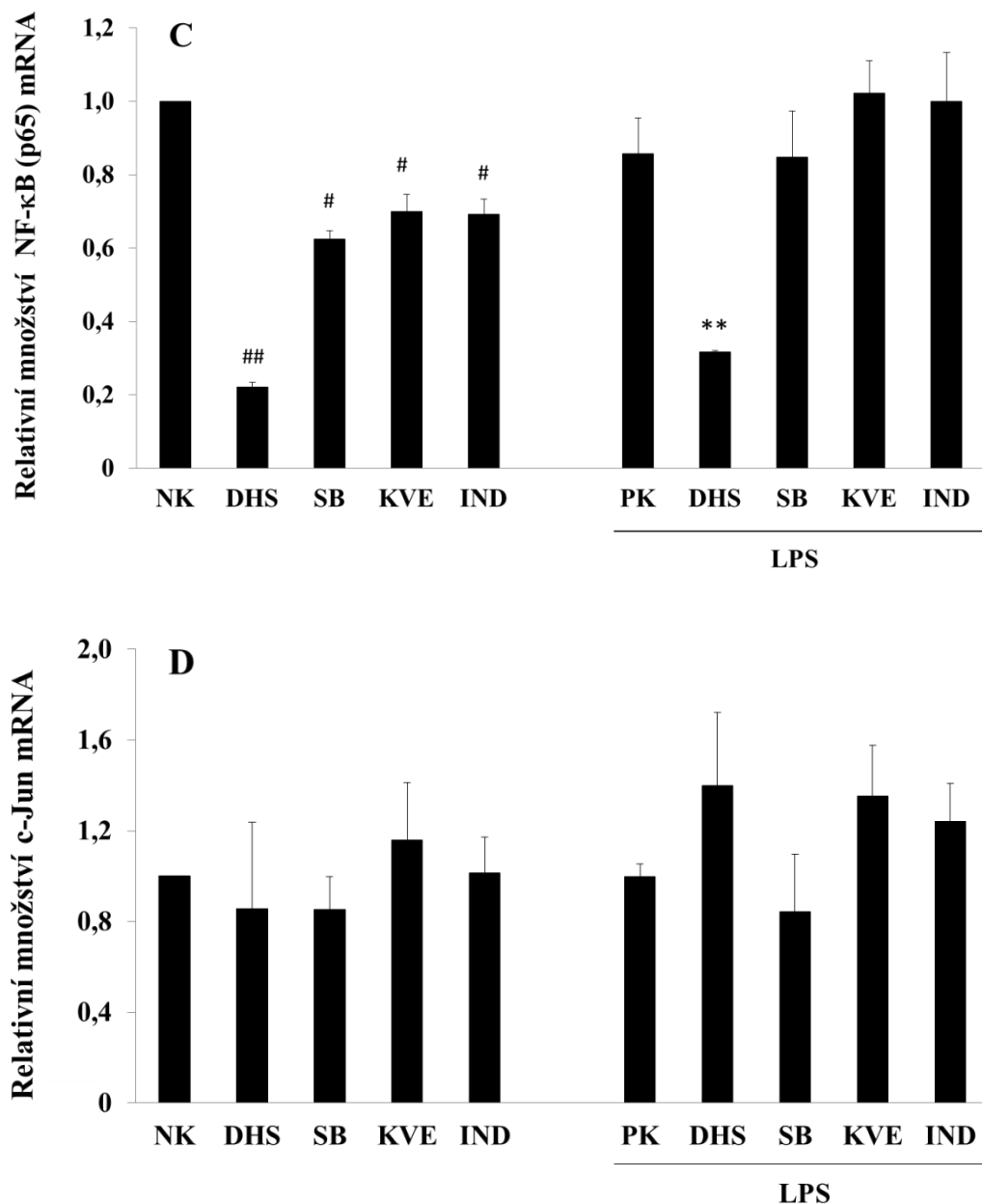
5.4 Účinek DHS, SB, KVE a IND na hladinu exprese mRNA prozánětlivých genů

Změny v hladinách prozánětlivých proteinů či jejich aktivace pozorované Western blotem nebo metodou ELISA nás vedly k analýze exprese na úrovni mRNA pomocí metody RT-qPCR. Pro další studium byla vybrána koncentrace $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, která byla na základě předchozích experimentů vyhodnocena jako nejvhodnější z pohledu protizánětlivého účinku. Přestože DHS vykazoval mezi ostatními analyzovanými molekulami nejvýraznější protizánětlivý efekt, při koncentraci $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ docházelo k enormně vysoké aktivaci prozánětlivého a proapoptického faktoru AP-1, indikující možnou reakci na stres [214, 215].

Změny hladin mRNA analyzovaných proteinů byly získány relativním poměrem genové exprese mRNA zkoumaného genu k referenčnímu genu RPL13A. Z dat získaných z RT-qPCR je patrná korelace změn exprese genu pro IL-6 a IL-8 (obr. 10A,10B) s naměřenými hladinami proteinů u buněk exponovaných LPS (obr. 8A,8B). Podobně tomu bylo v případě, kdy docházelo k poklesu takto zvýšené hladiny mRNA IL-6 u buněk následně vystaveným na 24 hodin $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS (obr. 10A). V kontrastu s tímto pozorováním však byly změny na úrovni mRNA pro IL-8. V grafu 10B je patrné signifikantní zvýšení hladiny mRNA IL-8 po expozici LPS a následně DHS (až $4 \times$ vyšší ve srovnání se samotným LPS). Neočekávaný byl také pokles hladiny exprese genu p65 u buněk neexponovaných LPS po 24hodinové expozici všem studovaným molekulám ve srovnání s NK (obr. 10C). Jediný DHS signifikantně snížil hladinu mRNA p65 také v případě expozice buněk LPS. Účinek DHS je ale zřejmě nezávislý na předchozím působení LPS, protože v obou případech došlo k podobnému poklesu a samotný LPS signifikantní změny hladiny mRNA p65 nevyvolal. Dle grafu 10D nedošlo vystavením buněk LPS či kterékoli z zkoumaných látek k signifikantním změnám hladiny mRNA c-Jun. To

však může být v tomto případě způsobeno značnou variabilitou v odpovědích buněk získaných z kožní tkáně různých pacientů.



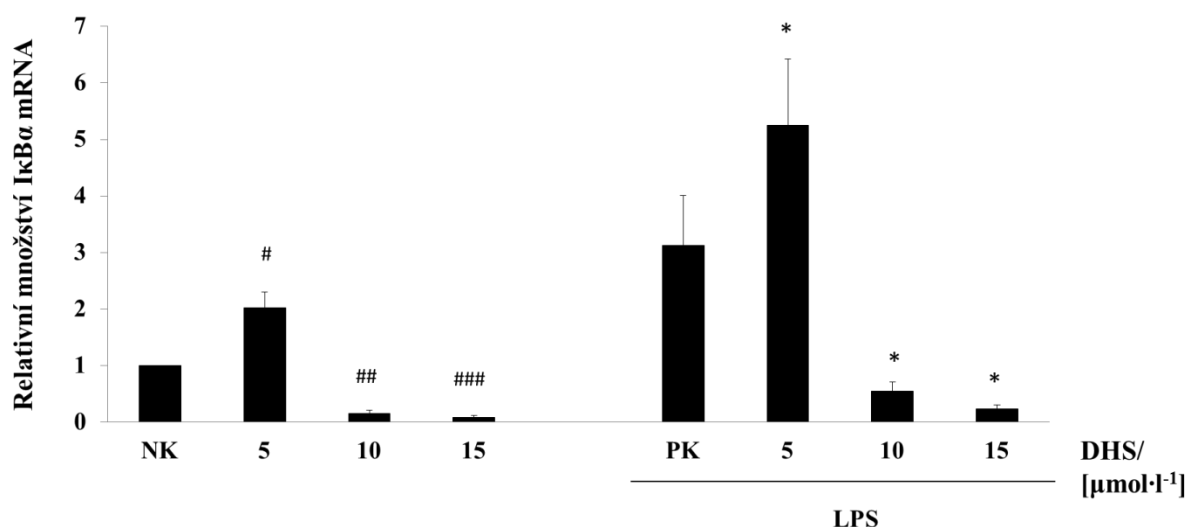


Obrázek 10. Změny v hladinách mRNA cytokinů IL-6 (A) a IL-8 (B) a jim nadřazených transkripčních faktorů NF-κB (p65) (C) a AP-1 (c-Jun) (D) normalizované k referenčnímu genu RPL13A. Analýza genové exprese byla provedena metodou RT-qPCR po 24hodinové inkubaci s 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS, SB, KVE anebo IND po předchozí 6hodinové inkubaci s LPS v bezsérovém médiu nebo bez něj. Data jsou zde prezentována v relativních arbitrárních jednotkách jako průměrná hodnota vztažená k NK (0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) \pm SEM; $n = 5$. Signifikantní změny ve srovnání s NK jsou značeny # $p < 0,05$, příp. ## $p < 0,01$. Signifikantní změny ve srovnání s PK (6 hodin inkubace s LPS následovaná 24hodinovou inkubací s 0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) jsou označeny * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$.

5.5 Vliv DHS na hladinu mRNA I κ B α

Další část výzkumu byla zaměřena na DHS, složku silymarinu s nejnápadnějším účinkem. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, klíčovou molekulou inhibující transport NF- κ B z cytoplazmy do jádra je I κ B. Při aktivaci dráhy NF- κ B dochází k degradaci tohoto inhibitoru, čímž je umožněna transkripční aktivita NF- κ B při zánětu [1, 14].

Kvantifikace změn hladiny mRNA I κ B α pomocí RT-qPCR odhalila rozdílnou regulaci genové exprese v závislosti na koncentraci DHS, které byly NHDF vystaveny. Zatímco nejnižší analyzovaná koncentrace 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS posílila nárůst hladiny mRNA I κ B α , koncentrace 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS způsobila signifikantní pokles hladiny mRNA (viz obr. 11). Tímto by vyšší koncentrace DHS mohla přispět k přetrvávání zánětu. Na druhou stranu, samotný LPS signifikantní změny hladiny mRNA I κ B α nezpůsobil. Koncentračně závislý obousměrný trend působení samotného DHS zřejmě nezávisel na účinku LPS, protože byl patrný i bez něj.



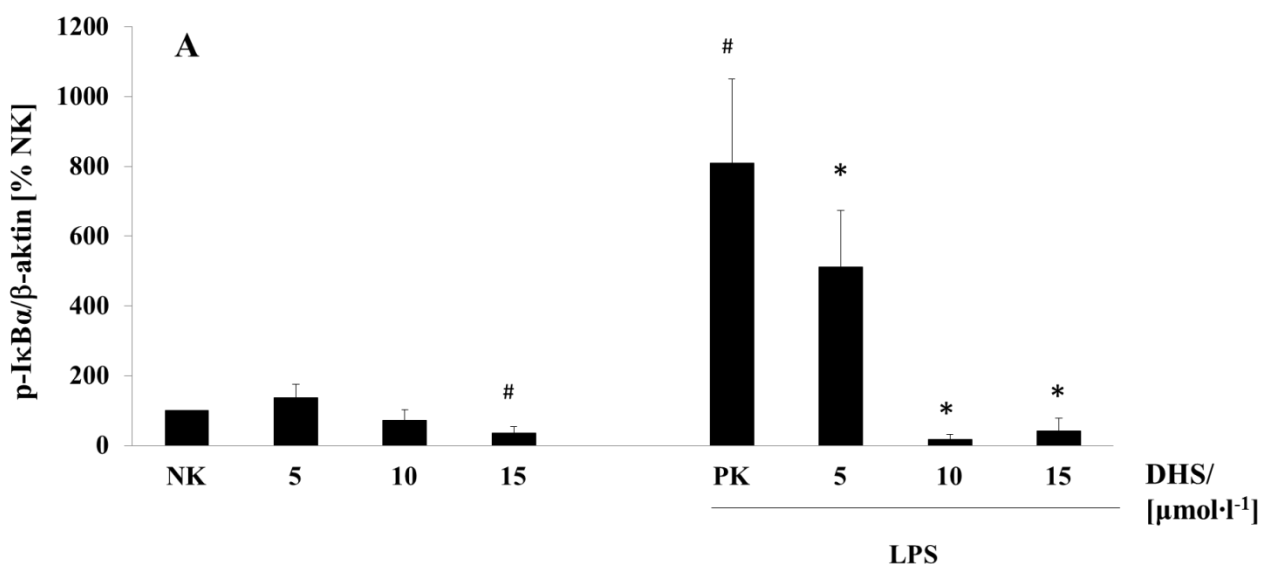
Obrázek 11. Relativní množství mRNA I κ B α analyzované v buňkách po expozici DHS pomocí RT-qPCR. Buňky NHDF byly ponechány nejprve 6 hodin s LPS v bezsérovém médiu (nebo bez něj) a následně vystaveny 24 hodin 5-15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS (24 hodin). Exprese byla normalizována k referenčnímu genu RPL13A. Výsledky jsou vyjádřeny graficky jako průměrná hodnota násobků změn u jednotlivých analyzovaných koncentrací ve srovnání s NK (0,1% (v/v) DMSO

v bezsérovém médiu) \pm SEM; n = 3. Expresa byla normalizována k referenčnímu genu RPL13A. Signifikantní změny ve srovnání s NK jsou značeny #p < 0,05, ##p < 0,01, příp. ###p < 0,001. Signifikantní změny ve srovnání s PK (6 hodin inkubace s LPS následovaná 24hodinovou inkubací s 0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) jsou označeny *p < 0,05.

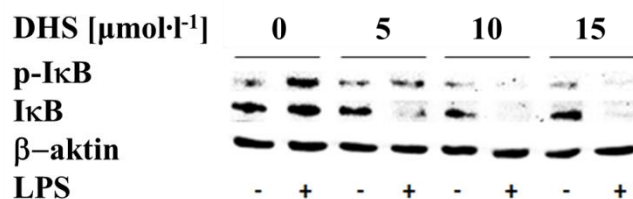
5.6 Analýza spolupůsobení DHS a LPS pomocí Western blotu

Vzhledem k indukci/inhibici exprese I κ B α působením různých koncentrací DHS bez ohledu na předchozí inkubaci s LPS nás zajímalo, jaký efekt bude mít DHS, jestliže bude aplikován na NHDF současně s LPS.

Degradace I κ B je spuštěná jeho fosforylací, proto jsme pomocí Western blotu monitorovali hladinu fosforylované (fosfo-I κ B α ; p-I κ B α) a nefosforylované formy I κ B α . Dle výsledků graficky zpracovaných v obr. 12A, při současné aplikaci DHS došlo k signifikantnímu poklesu hladiny p-I κ B α přechodně zvýšenému působením LPS, přičemž se tento efekt zdá být koncentračně závislý. Na druhou stranu, DHS zároveň snížil množství nefosforylované formy I κ B α za situace, kdy byl aplikován spolu s LPS (viz obr. 12B).



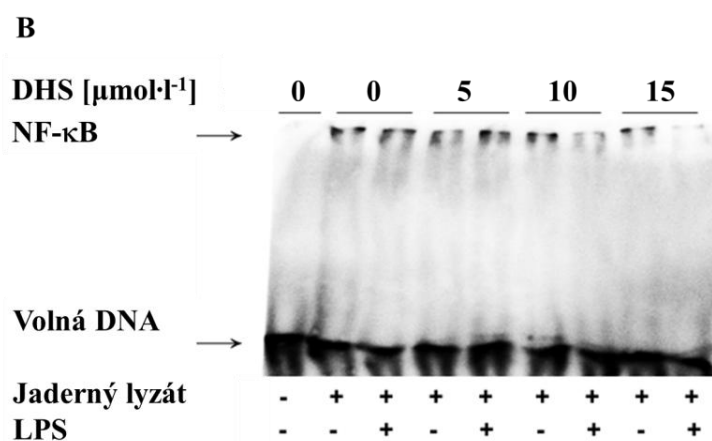
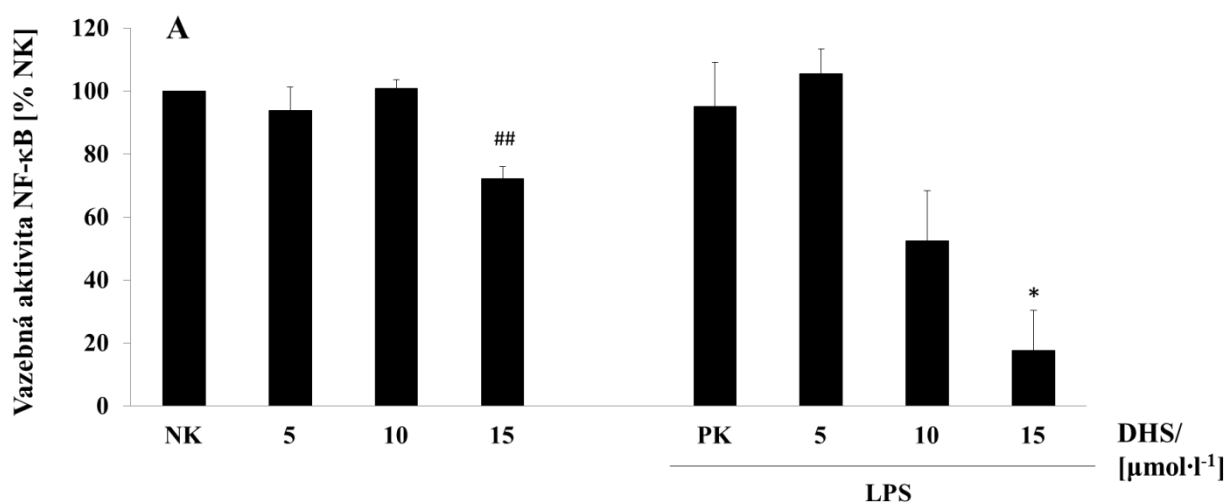
B



Obrázek 12. Posouzení aktivace NF- κ B při současné expozici LPS a 5-15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS analýzou množství fosforylované/nefosforylované formy inhibitoru bylo provedeno po 6hodinové inkubaci. Přítomnost fosforylované formy (p-I κ B α) koreluje s aktivací NF- κ B. Jako endogenní kontrola byl zvolen β -aktin. Graf (A) je výsledkem denzitometrické kvantifikace změn p-I κ B α získaných metodou Western blot. Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota vztažená k NK (0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) \pm SEM; $n = 3$. Signifikantní změny ve srovnání s NK jsou značeny $^{\#}p < 0,05$. Signifikantní změny ve srovnání s PK (6 hodin inkubace s LPS a 0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) jsou označeny $*p < 0,05$. (B) Reprezentativní obrázek Western blotu.

5.7 Vliv DHS na DNA-vazebnou aktivitu NF- κ B

K posouzení možné spolupráce mezi DHS a LPS byla za stejných experimentálních podmínek také analyzována schopnost DHS regulovat vazebnou aktivitu NF- κ B na cílové DNA sekvence. S ohledem na předchozí výsledky; pokles koncentrace klíčového inhibitoru I κ B α (viz obr. 12B), zvýšená translokace NF- κ B do jádra či produkce mRNA IL-8 (viz obr. 9A) bylo předpokládáno, že bude také zvýšena vazebná aktivita NF- κ B vlivem DHS. Během gelové elektroforézy by tak došlo ke snížení elektroforetické pohyblivosti komplexu protein-DNA ve srovnání s volnou DNA sekvencí. Nicméně z grafu na obr. 13A je patrné, že 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS po 6 hodinách signifikantně potlačoval schopnost NF- κ B navázat se na korespondující DNA sekvenci v exponovaných buňkách NHDF ($\approx 70\%$ vazebné aktivity NK). Za situace, kdy byl do experimentálního prostředí zároveň přidán LPS, se tento efekt jevil ještě významnější, a to již od koncentrace 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, signifikantně při 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($\approx 50-30\%$ vazebné aktivity PK). Na druhou stranu, za daných experimentálních podmínek samotný LPS indukci vazebné aktivity NF- κ B nevyvolal (viz obr. 13A, 13B).



Obrázek 13. Vliv DHS na vazebnou aktivitu NF-κB při současné expozici LPS. Metodou EMSA byl posuzován vliv 6hodinové inkubace NHDF s 5-15 μmol·l⁻¹ DHS v přítomnosti LPS či bez něj. Obrázek (A) představuje grafickou prezentaci výsledků. Vazebná aktivita NF-κB je vyjádřena jako průměrná hodnota procentuálního podílu NK (0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) ± SEM; n = 3. Signifikantní změny ve srovnání s NK jsou značeny ^{##}p < 0,01. Signifikantní změny ve srovnání s PK (6 hodin inkubace s LPS a 0,1% (v/v) DMSO v bezsérovém médiu) jsou označeny ^{*}p < 0,05. (B) Reprezentativní obrázek elektroforetické separace proteinů.

5.8 Využití *in vitro* 3D modelu RHE k analýze působení vybraných složek silymarinu na lidskou epidermis při zánětu

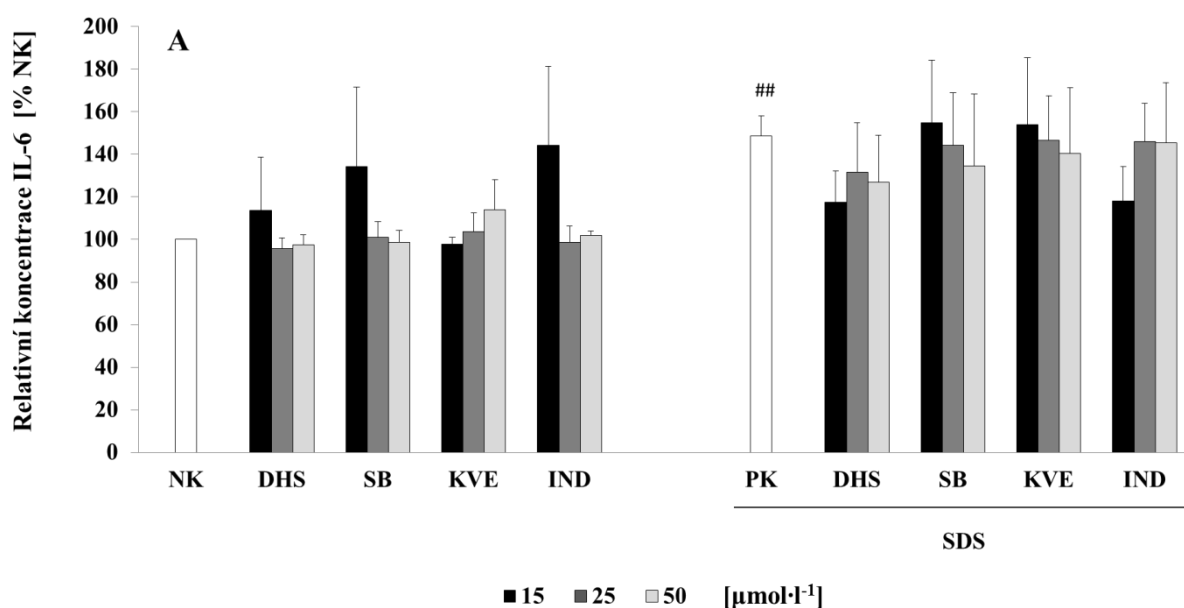
V této práci byla zkoumána také potenciální schopnost vybraných složek silymarinu přispívat k regeneraci poškozené epidermis. Pro analýzu *in vitro* byl

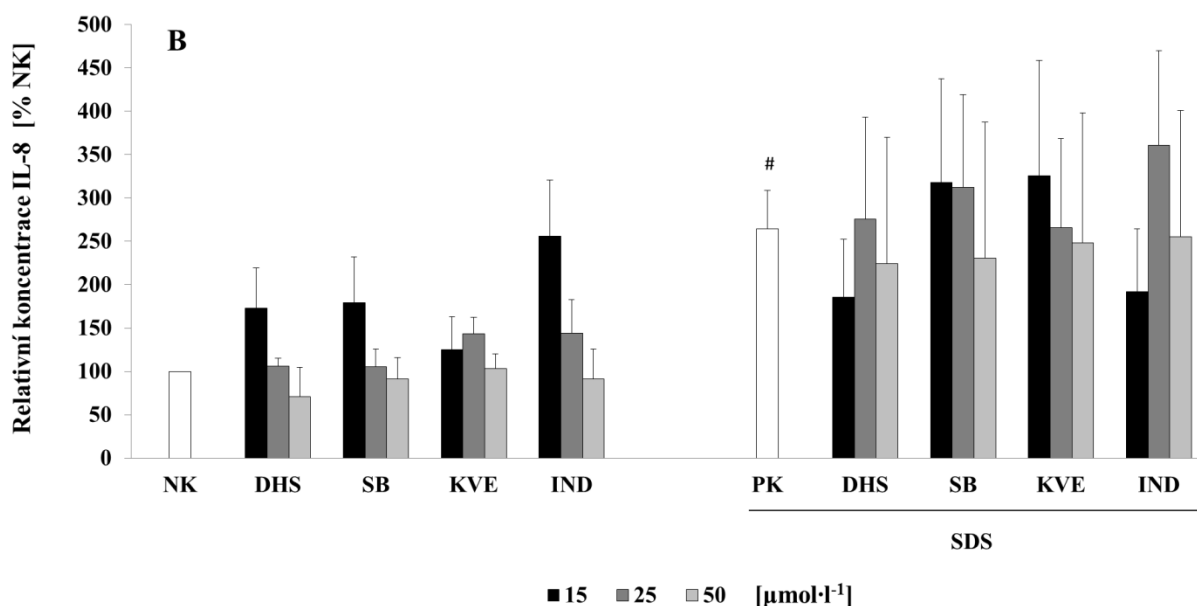
vybrán 3D model lidské epidermis RHE (příprava viz oddíl 4.3.2), který vykazuje morfologii charakteristickou pro nativní epidermis s podobnými bariérovými vlastnostmi [209].

5.8.1 Stanovení prozánětlivých interleukinů metodou ELISA

V případě poškození ochranné rohové vrstvy epidermis, spouštějí biologicky živé keratinocyty po kontaktu s iritantem prozánětlivé signální dráhy, jejichž výsledkem je mj. produkce cytokinů a chemokinů, např. IL-6 a IL-8, jež jsou považovány za markery zánětu [216, 217].

Porušení epidermální bariéry *in vitro* modelu bylo vytvořeno pomocí topické aplikace surfaktantu SDS v koncentraci 1 % (v/v) po dobu 5 hodin. Povrchově aktivní látka signifikantně zvýšila sekreci obou markerů (obr. 14A, 14B) ve srovnání s kontrolní RHE neexponovanou SDS (negativní kontrola; NK). Přestože však byly aplikovány poměrně vysoké koncentrace (< 50 μM) zkoumaných látek, žádná ze složek silymarinu nevykazovala významnější efekt na produkci testovaných interleukinů (viz obr. 14A, 14B). Koncentrace 50 μM nebyla překročena z důvodu omezené rozpustnosti analyzovaných flavonolignanů v kultivačním médiu [218].





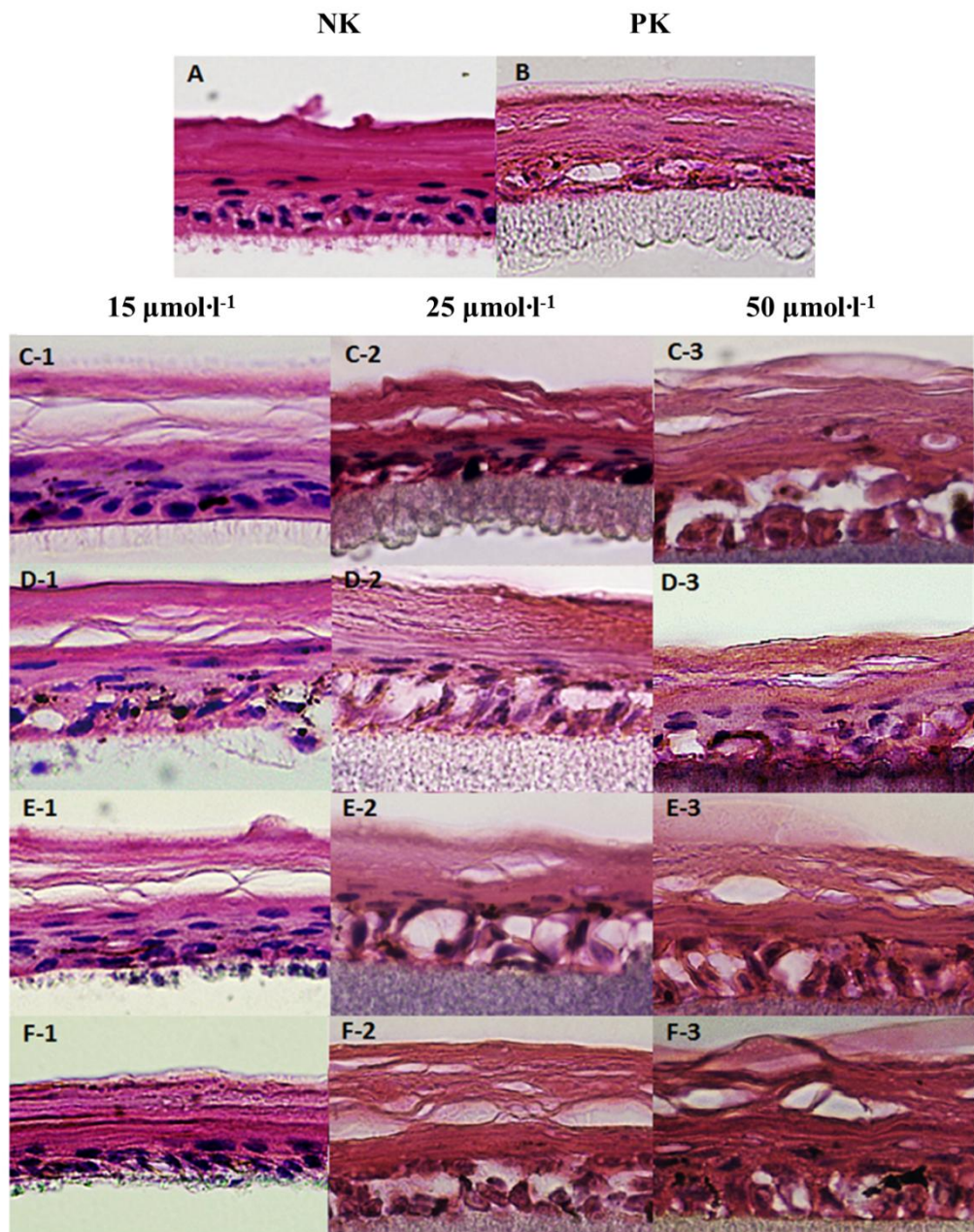
Obrázek 14. Metodou ELISA stanovené rozpustné cytokiny IL-6 (A) a IL-8 (B) uvolněné do média po expozici SDS nebo médiu bez něj, následované 24hodinovým působením 15-50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB, KVE, DHS a IND nebo pouze médiu. Výsledné hodnoty jsou prezentovány v procentech NK (bezsérové médium) jako průměr \pm SEM; $n = 3$. Pozitivní kontrola je značena PK (5 hodin inkubace s SDS následovaná 24hodinovou inkubací s bezsérovým médiem). Signifikantní změny ve srovnání s NK jsou označeny # $p < 0,05$, příp. ## $p < 0,01$. Signifikantní změny ve srovnání s PK pozorovány nebyly.

5.8.2 Histologická analýza morfologických změn RHE

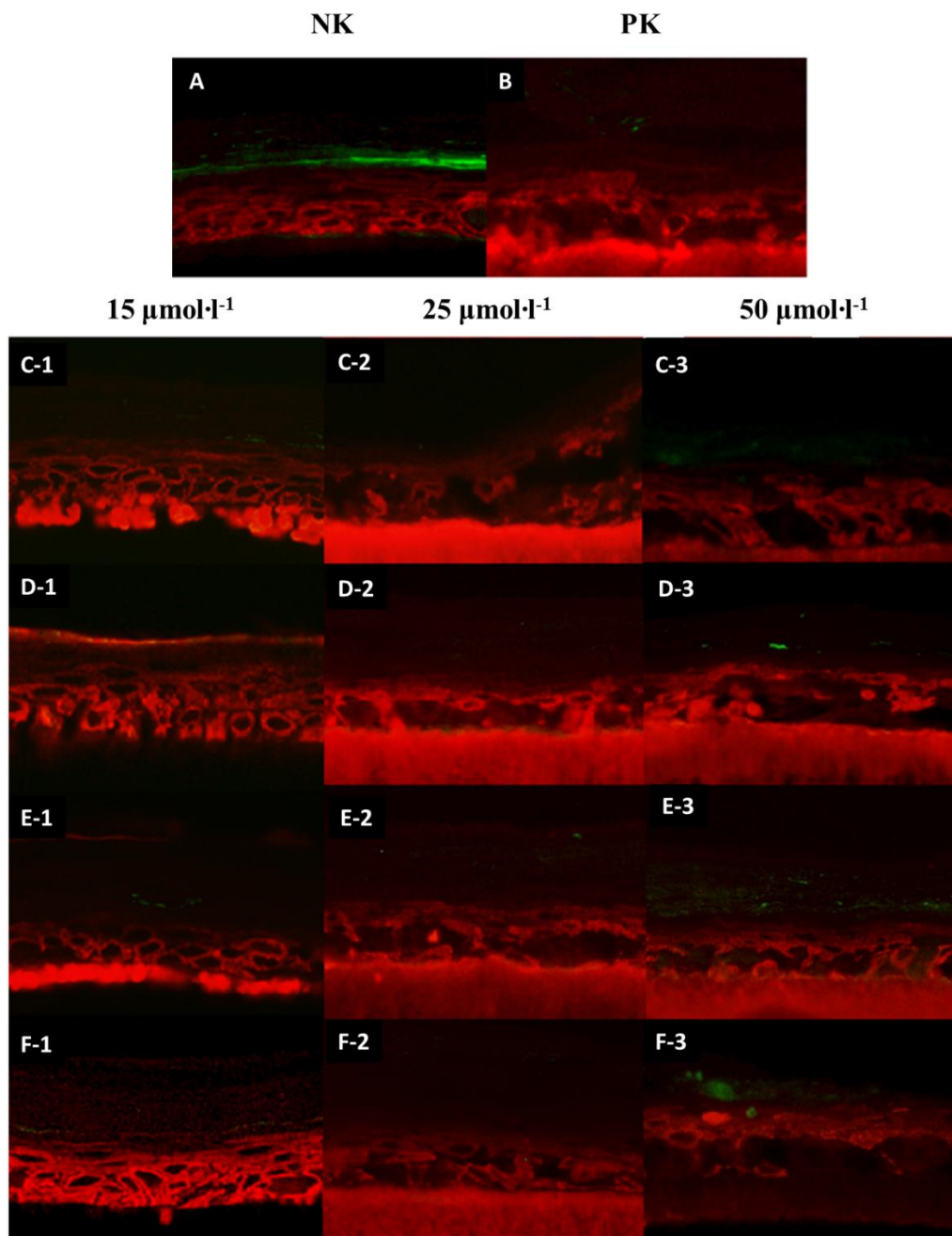
Jedním z hlavních úkolů kůže, je zajištění externí bariéry vůči nežádoucím vlivům vnějšího prostředí. Povrchovou vrstvu kůže tvoří epidermis, sestávající téměř výlučně z buněk keratinocytů. Narušení epidermis, především pak její horní rohové vrstvy *stratum corneum*, významně přispívá ke vzniku infekce. Z tohoto důvodu je klíčové obnovení celistvosti epidermální bariéry [1]. K posouzení celistvosti RHE bylo využito unikátní vlastnosti epidermis diferencovat do jednotlivých vrstev charakteristických specifickým typem strukturních proteinů. Například keratinocyty ve spodní bazální vrstvě vytvářejí cytokeratiny typu 5 a 14 [219], zatímco keratinocyty v rohové vrstvě (neživé korneocyty), u nichž došlo k terminální diferenciaci, exprimují např. lorikrin [220].

Histologické řezy RHE byly barveny po 24hodinovém působení $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB, KVE, DHS a IND pomocí hematoxylinu-eosinu (obr. 15, 17) nebo imunohistochemicky monoklonálními protilátkami anti-cytokeratin 14 (*stratum basale*) a anti-lorikrin (*stratum corneum*) (obr. 16). Byla provedena histologická analýza RHE vystavené pouze samotným složkám silymarinu či IND v uvedených koncentracích (obr. 17), stejně jako RHE nejprve vystavené 1% (v/v) SDS po dobu 5 hodin (obr. 15 a 16.).

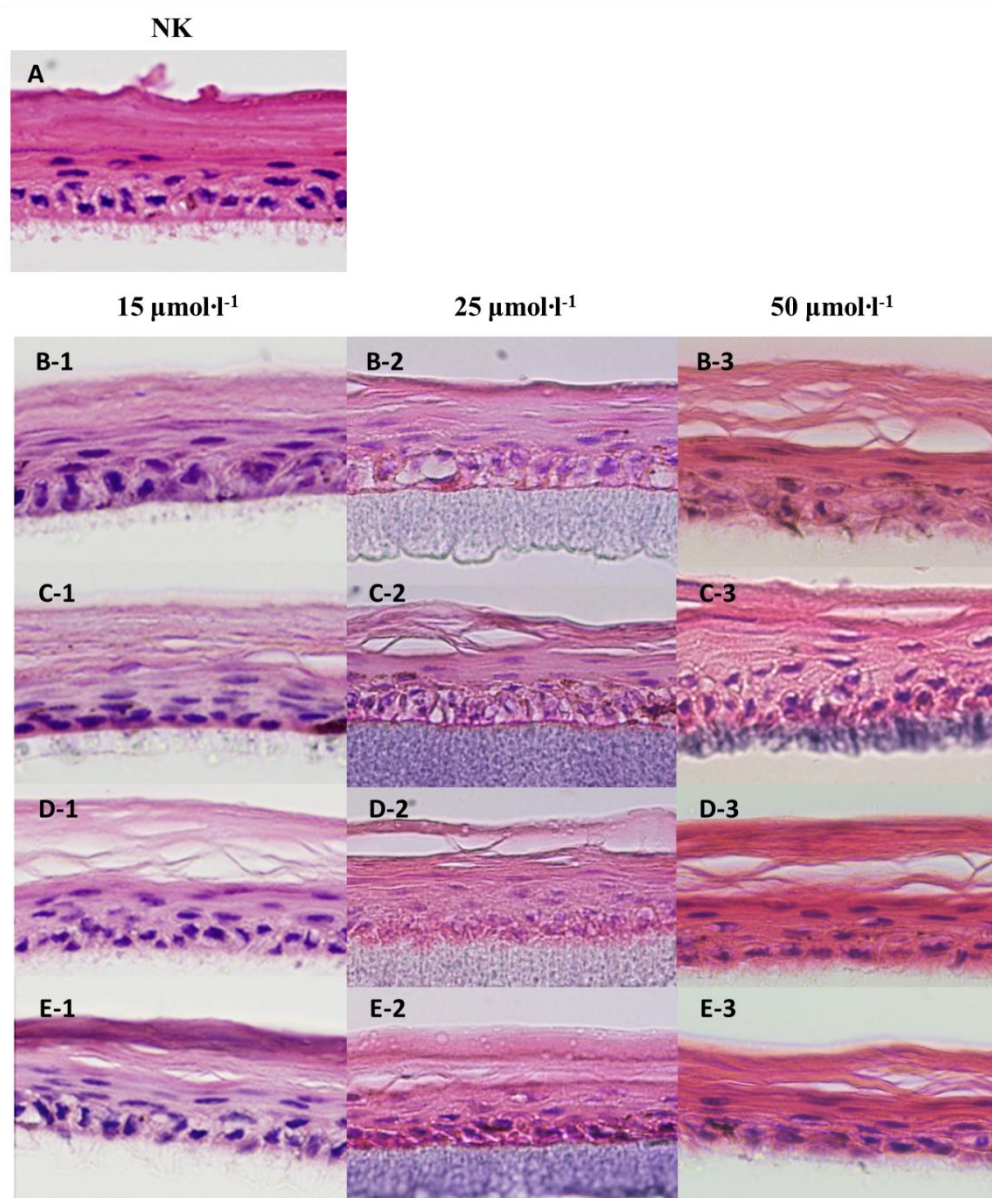
Cílem bylo mikroskopické zhodnocení, zda dochází vlivem vybraných složek silymarinu o různých koncentracích ke změně vizuálního stavu RHE poškozené SDS, ve srovnání s RHE, která byla vystavena pouze médiu (NK; obr. 15A a 16A). Histologickým barvením bylo odhaleno narušení normální morfologie RHE vlivem SDS (PK; obr. 15B a 16B) pozorované jako odtržení rohové vrstvy, nitrobuněčný edém či zánik jader. Tento efekt korespondoval se zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů (viz obr. 14). Přestože je možné pozorovat pozitivní změny v morfologii poškozené RHE po expozici $15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS (obr. 15C-1 či obr. 16C-1) či IND ve stejné koncentraci (obr. 15F-1 a 16F-1), mezi jednotlivými RHE nakultivovanými z NHEK různých pacientů byla pozorována interindividuální variabilita.



Obrázek 15. Histologické změny RHE pozorované po expozici SDS (B; PK) a následně 15-50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS (C-1, C-2, C-3), SB (D-1, D-2, D-3), KVE (E-1, E-2, E-3) a IND (D-1, D-2, D-3), nebo pouze médiu (A; NK). Vizualizace histologických řezů RHE byla provedena barvením pomocí hematoxylinu-eosinu. (Reprezentativní fotografie.)



Obrázek 16. Histologické změny RHE pozorované po expozici SDS (**B**; PK) a následně $15\text{--}50\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS (**C-1**, **C-2**, **C-3**), SB (**D-1**, **D-2**, **D-3**), KVE (**E-1**, **E-2**, **E-3**) a IND (**D-1**, **D-2**, **D-3**), nebo pouze médiu (**A**; NK). Vizualizace histologických řezů RHE byla provedena barvením imunofluorescenčními protilátkami anti-cytokeratin 14 (červená) a anti-lorikrin (zelená). (Reprezentativní fotografie.)



Obrázek 17. Reprezentativní fotografie RHE po expozici $15\text{-}50\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS (**B-1, B-2, B-3**), SB (**C-1, C-2, C-3**), KVE (**D-1, D-2, D-3**) a IND (**E-1, E-2, E-3**), nebo pouze médiu (**A; NK**). Vizualizace histologických řezů RHE byla provedena barvením pomocí hematoxylinu-eosinu.

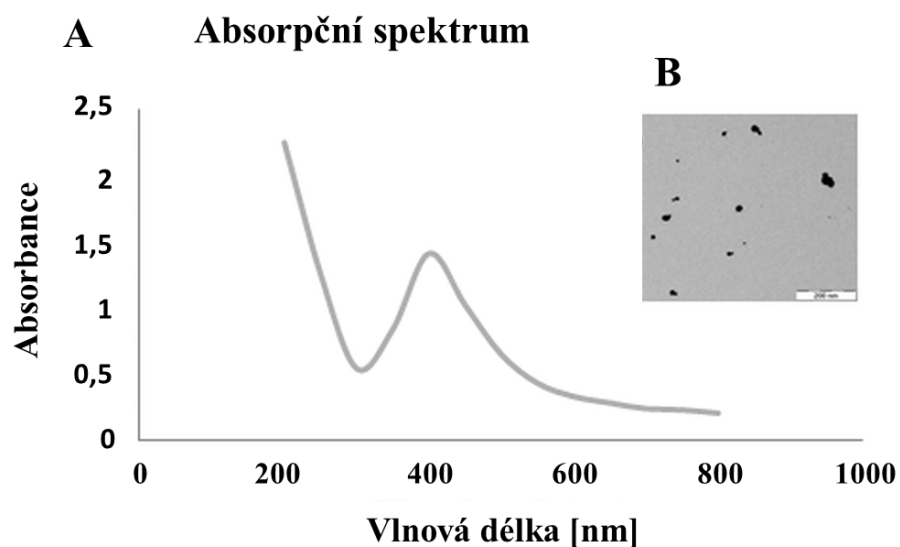
5.9 Využití *in vitro* 3D modelu RHE k analýze účinku AgNČ či Ag⁺ při topické aplikaci

Trojrozměrný *in vitro* model RHE byl využit rovněž k analýze potenciálních pro-/protizánětlivých účinků nanočástic stříbra. Morfologické změny *in vitro* modelu byly posuzovány po topické aplikaci suspenze AgNČ či Ag⁺ a expoziční době 24 hodin. Případné dráždivé působení bylo vyhodnoceno analýzou produkce prozánětlivých markerů, interleukinů 6 a 8.

5.9.1 Charakterizace velikosti a rozložení AgNČ v experimentálním roztoku

Charakterizace nanočástic byla provedena pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie. Pomocí polohy absorpčního maxima a šířky píku lze získat informaci o průměrné velikosti nanočástic. Pro stanovení byl 1 ml AgNČ zředěn na celkový objem 50 ml destilovanou vodou. Vizualizace suspenze nanočástic byla provedena pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) (obr. 18B).

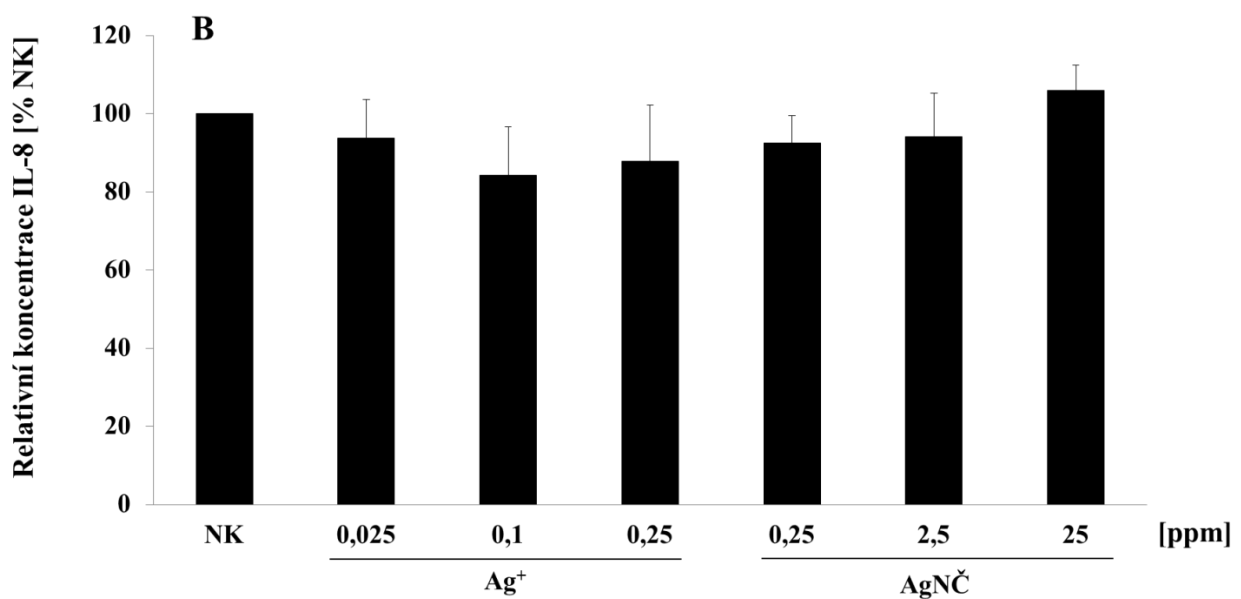
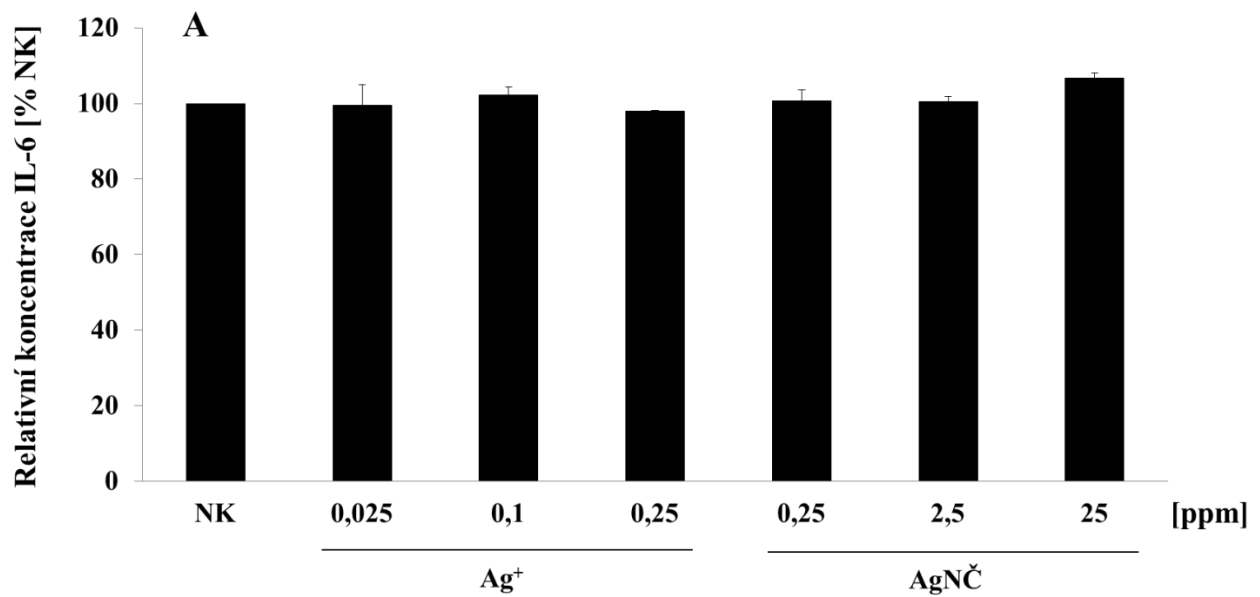
Koloidní stříbro bylo charakterizováno prostřednictvím silné absorpce ve viditelné oblasti spektra, kde byl pozorován pík povrchového plazmonu při vlnové délce 400 nm (obr. 18A). Průměrná velikost nanočástic v experimentálním roztoku AgNČ byla přibližně 10 ± 5 nm (> 50 %). K detekci zeta potenciálu byl použit Zeta Plus Analyzer (Brookhaven Instruments, Hotsville, NY, USA). Zjištěný zeta potenciál AgNČ byl -22 mV při pH roztoku 7,1.



Obrázek 18. Charakterizace AgNČ pomocí UV-VIS spektroskopie (**A**) a vizualizace pomocí TEM (**B**). Analýza byla provedena pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL JEM 2011 s využitím urychlovacího napětí 100 kV.

5.9.2 Stanovení prozánětlivých interleukinů metodou ELISA

Metodou ELISA byla analyzována produkce prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8 po 24hodinové expozici nanostříbra (AgNČ; 0,25-25 ppm) či iontů Ag^+ (0,025-0,25 ppm). Experimentální koncentrace byly vybrány na základě předchozích experimentů, prováděných na Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UPOL [169, 186]. Jak je patrné z grafů v obr. 19A a 19B, za daných experimentálních podmínek žádná ze zvolených koncentrací obou forem stříbra nezvyšovala množství cytokinů uvolněných z RHE do okolního média.

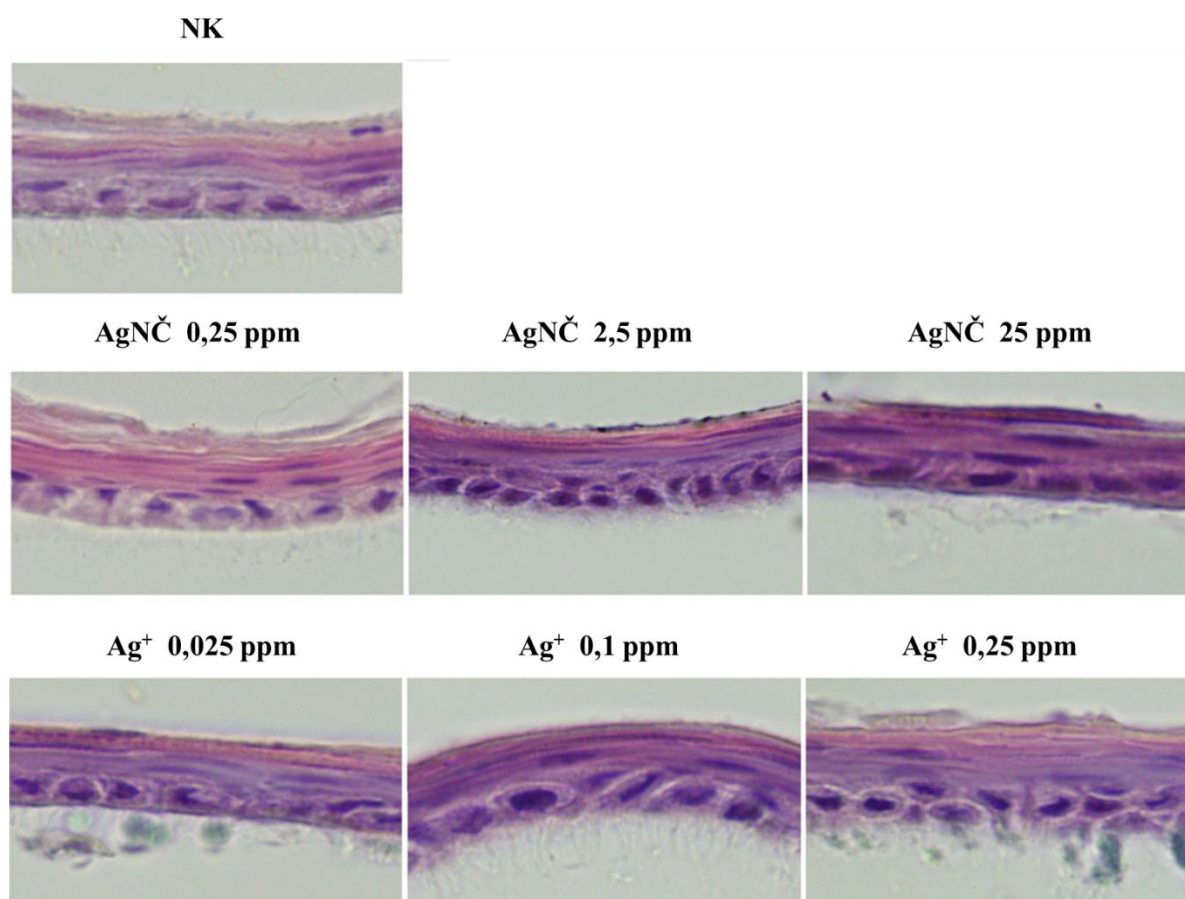


Obrázek 19. Analýza cytokinů (A) IL-6 a (B) IL-8 uvolněných z RHE do média po 24hodinové expozici Ag⁺ (0,025-0,25 ppm) či AgNČ (0,25-25 ppm) metodou ELISA. Výsledné hodnoty jsou prezentovány v procentech NK (bezserové médium) jako průměr ± SEM; n = 3. Prezentované výsledky jsou bez signifikantních změn.

5.9.3 Histologická analýza morfologických změn RHE po aplikaci AgNČ a Ag⁺

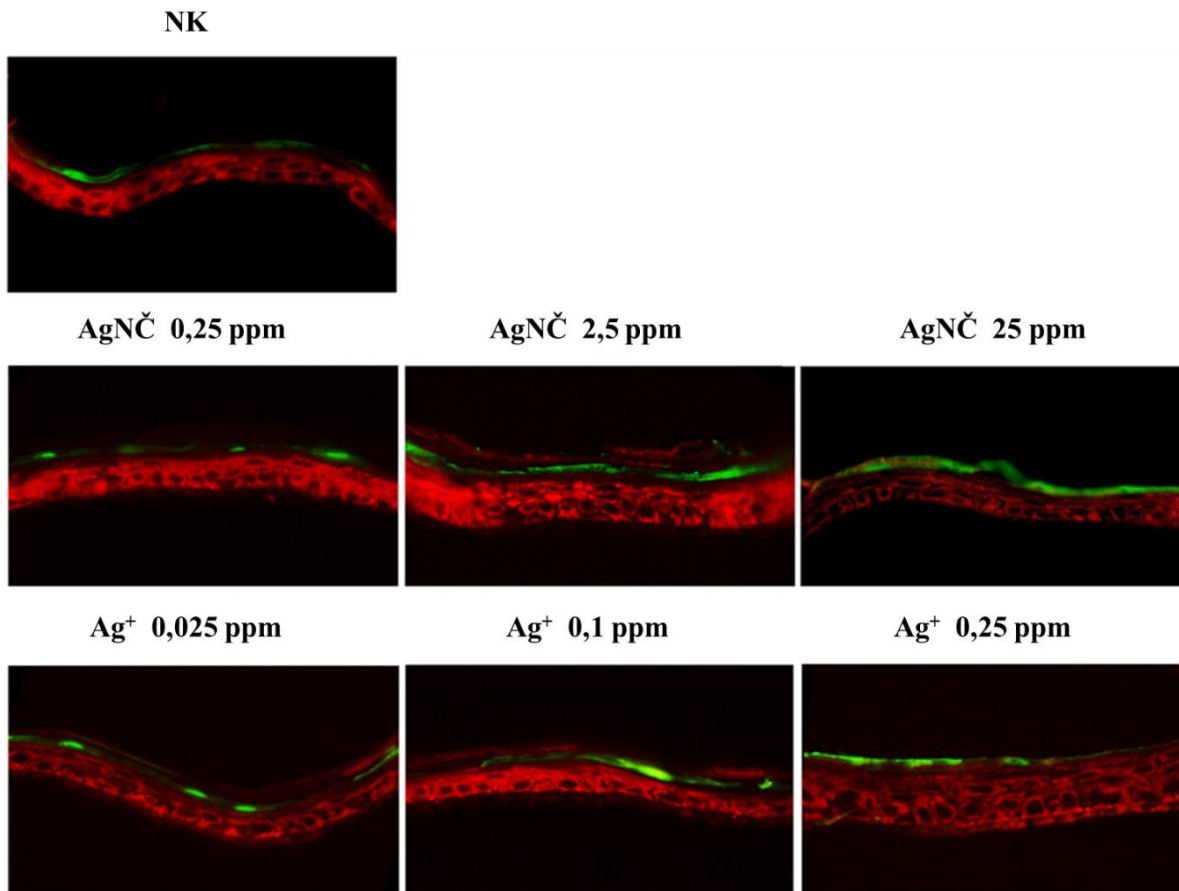
K analýze změn normální vrstevnaté struktury RHE bylo využito detekce charakteristických morfologických znaků epidermis, popsanych v kapitole 5.8.2.

Model RHE byl vystaven 24hodinovému působení roztoku Ag⁺ (0,025-0,25 ppm) či AgNČ (0,25-25 ppm) v bezsérovém médiu aplikované topicky na *stratum corneum*. Po ukončení experimentu byla RHE fixována, zalita do parafinového bloku, nakrájena na histologické řezy a poté histologicky či histochemicky nabarvena. Z reprezentativních snímků nabarvené RHE je patrné, že vlivem AgNČ ani Ag⁺ nedocházelo k narušení normální morfologie reprezentované negativní kontrolou (obr. 20 a obr. 21).



Obrázek 20. Reprezentativní obrázek histologických změn RHE pozorovaných po expozici Ag⁺ (0,025-0,25 ppm) či AgNČ (0,25-25 ppm). Negativní kontrolu (NK) představuje RHE vystavená pouze bezsérovému médiu.

Vizualizace histologických řezů RHE byla provedena barvením pomocí hematoxylinu-eosinu.



Obrázek 21. Reprezentativní obrázek histologických změn RHE pozorovaných po expozici Ag⁺ (0,025-0,25 ppm) či AgNČ (0,25-25 ppm). Negativní kontrolu (NK) představuje RHE vystavená pouze bezsérovému médiu. Vizualizace histologických řezů RHE byla provedena barvením imunofluorescenčními protilátkami anti-cytokeratin 14 (červená) a anti-lorikrin (zelená).

6 DISKUSE

Hojení kožní rány je vysoce organizovaný proces obnovy tkáně, vyžadující vzájemnou spolupráci rezidentních buněk s infiltrovanými buňkami imunitního systému. Tyto interakce jsou zprostředkovávány chemickými signály, tj. cytokiny, růstovými faktory [19, 26]. Pro řádný průběh hojení je velmi významná regulace zánětlivé fáze. Přestože má během hojení nenahraditelný význam pro eliminaci nečistot, bakterií či nekrotické tkáně [9, 19], její nekontrolovaný průběh vede ke vzniku tzv. nehojící se rány [4].

Ke zvratu normálního hojení do chronického stavu často přispívá infekce rány. Přítomnost bakterií v ráně způsobuje kontinuální infiltraci rány neutrofilů, jejichž přetrvávání v ráně přispívá k destrukci zdravé tkáně [4, 6]. Navíc infikované nehojící se rány často neodpovídají na léčbu konvenčními antimikrobiálními látkami [32, 221]. Optimální je proto aplikace účinných protizánětlivých látek, které zamezí nekontrolované akumulaci zánětlivých mediátorů, aniž by narušily přirozený průběh hojení. V našem experimentu byl fyziologický proces hojení navozen škrábnutím konfluentní monovrstvy buněk pomocí sterilní plastové pipety a patologické podmínky vytvořeny přidáním LPS z membrány gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* do média.

Směs flavonoidů, silymarin, aktivní složka extrahovaná ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) vykazuje řadu pozitivních účinků. Kromě známé hepatoprotektivity má silymarin kardioprotektivní [37, 210], antioxidační [211, 222, 223] a protirakovinné [37, 224] účinky. Při aplikaci na kůži bylo pozorováno potlačení chemicky indukované kontaktní dermatitidy [137], rychlejší hojení a potlačení zánětu v kožní ráně u myši [109, 225] či bakteriální infekce *in vitro* [222, 225]. Více než polovinu silymarinu tvoří flavonolignan SB, který snadno oxiduje na DHS [210, 226]. Přestože se jedná o minoritní složku silymarinu, poskytuje vyšší terapeutický potenciál než SB, oproti kterému vykazuje vyšší antioxidační kapacitu [37, 126]. Tuto skutečnost uvádí práce publikující vyšší schopnost DHS potlačit oxidační poškození buněk vyvolané peroxidem vodíku ve srovnání se SB. Vyšší antioxidační aktivita DHS oproti

parentní molekule je spojována s přítomností dvojné vazby, mezi C2-C3 aromatického jádra, nesoucí na C3 hydroxylovou skupinu [211]. Stejný strukturální prvek má v molekule jiná minoritní složka silymarinu KVE, jehož protizánětlivé a hojivé účinky na kůži či kožní buňky byly již publikovány [94, 227, 228]. Analýza prevence i léčby kožního zánětu pomocí KVE *in vitro* a *in vivo* přisuzuje jeho pozitivní působení alespoň částečně schopnosti inhibovat dráhu NF- κ B [141, 229]. Nicméně KVE není výhradně složkou silymarinu. Výše zmíněné vlastnosti i strukturální podobnost s KVE činí z DHS látku potenciálně schopnou vytvořit podmínky pro rychlejší hojení kožních ran. Tento účinek v případě DHS zatím studován nebyl. Nicméně jeho protizánětlivé schopnosti byly pozorovány v prevenci akutního poškození jater tetrachlormethanem, kdy potlačil tvorbu prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-6 [230].

Během zánětlivé fáze hojení jsou zdaleka nejzastoupenějšími cytokiny v exsudátu rány interleukiny 6 a 8 [231, 232]. Vedle chemotaxe neutrofilů do rány parakrinně podporují proliferaci a migraci rezidentních kožních buněk [1, 233-237]. Keratinocyty a fibroblasty exprimují odpovídající receptory, nejsou však pouze respondenty těchto signálů. Mohou cytokiny také generovat a působit tak jako imunitní buňky a přispívat k intenzitě zánětu [1, 232, 237, 238]. Při nadprodukcí a nežádoucím přetrvávání těchto cytokinů v ráně dochází ke zpomalení hojení [238, 239], příp. patologickým změnám ECM [222]. Deregulace produkce IL-6 či IL-8 může za patologických podmínek přispívat ke vzniku chronického fibrotického stavu, charakteristického např. pro psoriázu [236, 240-242]. Významným stimulatorem produkce IL-6 a IL-8 jsou bakteriální komponenty [238, 243]. V této práci jediný DHS snížil LPS-indukované hladiny obou těchto interleukinů ve srovnání s ostatními analyzovanými molekulami (obr. 8A, B). Je však potřeba zmínit, že DHS také mírně, přesto signifikantně, snížil produkci IL-6 škrábnutými buňkami, u nichž nebyl přidáván LPS. Protože IL-6 je důležitý během proliferační a remodelační fáze hojení, mohl by DHS narušovat jeho přirozený průběh [236, 244, 245].

Měření genové exprese na úrovni mRNA (obr. 10A) potvrdilo schopnost DHS snižovat hladinu IL-6 zvýšenou působením LPS. Opačný účinek však byl

pozorován v případě chemokinu IL-8 (obr. 10B), kdy po aplikaci DHS na buňky po vystavení LPS došlo k signifikantnímu nárůstu hladiny IL-8 mRNA. Nekorelující výsledky na úrovni mRNA a proteinu by mohly být způsobeny časovou prodlevou mezi akumulací mRNA a syntézou funkčního proteinu [246]. Teoretické vysvětlení nabízí také hypotetické posttranskripční či posttranslační modifikace indukované DHS, které by mohly inhibovat syntézu proteinu IL-8, případně limitovat jeho sekreci. Uvedená hypotéza však v rámci této práce analyzována nebyla.

Prozánětlivé cytokiny indukují v kožních buňkách během zánětlivé fáze tvorbu prostaglandinů, produktů oxidační cyklizace arachidonové mastné kyseliny enzymem prostaglandin endoperoxid syntáza (PTGES), syn. COX [1, 238, 247]. Zatímco konstitutivní forma COX-1 reguluje různé buněčné procesy, inducibilní izoenzym COX-2 je běžně přítomen v nízkých koncentracích a jeho produkce vzroste během iniciační fáze zánětu [1, 222, 248], kde v místě hojení produkuje mmj. značná množství prostaglandinů. Tyto pleiotropní molekuly podporují zánět infiltrací neutrofilů zvýšením vaskulární permeability a vazodilatací. Také indukují proliferaci keratinocytů a reepitelizaci [249]. Prostaglandin E₂ (PGE₂) rovněž ovlivňuje produkci kolagenu a motilitu fibroblastů [247, 250, 251]. Proto inhibice COX-2 při akutních stavech může prodloužit dobu hojení [252, 253], zatímco přetrvávající exprese COX-2 je spojována s chronickým průběhem hojení a tvorbou jizev [222, 252, 254]. V těchto případech jsou v terapii využívány NSAID, protizánětlivé látky, které jsou účinnými inhibitory COX [248]. Na druhou stranu, některé publikace uvádějí nežádoucí vedlejší účinky NSAID, kterými jsou právě snížená proliferace či migrace buněk, způsobující prodloužení doby hojení [240, 248, 253, 255-257]. Zřejmě také hrají roli v patogenezi psoriázy [258-260]. Některé NSAID mohou částečně působit také prostřednictvím inhibice dráhy NF-κB [261, 262].

Přírodní alternativou NSAID může být silymarin, u něhož byla rovněž publikována schopnost potlačovat stimulaci tvorby COX-2 u kožních fibroblastů [222] či modelu myší epidermis [263], aniž by docházelo k potlačení syntézy kolagenu či proliferace buněk [222, 225]. V rámci předkládané práce však jednotlivé analyzované složky silymarinu na produkci inducibilního enzymu

COX-2 efekt neměly (obr. 9C). Nicméně množství COX-2 nebylo za patologických podmínek indukovaných LPS signifikantně zvýšeno. Proto by jeho potlačení mohlo být pro normální průběh hojení neinfikované rány (reprezentované škrábnutou monovrstvou buněk) nežádoucí. Rovněž uvedené studie měly odlišné experimentální uspořádání se zaměřením na preventivní účinek silymarinu.

Nejvýznamnější signální dráha kontrolující tvorbu prozánětlivých molekul je generovaná aktivací receptoru TLR/IL-1R a kaskádou MAPK. Jejimi nejdůležitějšími koncovými efekty jsou aktivované transkripční faktory NF- κ B a AP-1 [69, 264]. Oba se podílejí na změně profilu genové exprese v buňkách ve směru produkce prozánětlivých mediátorů (např. IL-6, IL-8, COX-2) [15, 80]. Za normálních okolností dochází po eliminaci kontaminantů v ráně k poklesu jejich aktivity [5, 9]. Přítomnost bakterií však udržuje v buňkách oba transkripční faktory NF- κ B a AP-1 aktivní, čímž způsobuje přetrvávání produkce cytokinů a chemokinů, které kontinuálně indukují přechod cirkulujících neutrofilů do infikované rány [9, 81]. Flavonoidy jsou schopny inhibovat aktivitu obou těchto faktorů [102], mají proto značný protizánětlivý efekt [96, 123]. Silymarin, příp. jeho hlavní komponenta silybin, inhibují aktivitu NF- κ B či AP-1 hned na několika úrovních signální dráhy. Inhibují spuštění dráhy prevencí tvorby příslušného ligandu (TNF- α , IL-1) [96, 140, 144], expresi p50 [142], blokují fosforylaci I κ B a translokaci NF- κ B do jádra [140], vazebnou aktivitu obou faktorů [136, 142] a v neposlední řadě tvorbu již zmíněných produktů dráhy [96, 136, 140, 142, 144].

V této práci však k potlačení aktivace faktorů (přesunu p65 z cytoplazmy do jádra či fosforylace c-Jun) za daných experimentálních podmínek nedošlo (obr. 9A, 9B). Naopak, jejich zesílená aktivace po aplikaci DHS naznačuje možnou vzájemnou kooperaci mezi DHS a LPS, kdy DHS způsobuje nežádoucí prodloužení buněčné zánětlivé odpovědi na LPS, vezmeme-li v úvahu delší experimentální čas (24 hodin). Za stejných experimentálních podmínek DHS inhiboval nejen expresi inhibitoru NF- κ B (obr. 11), ale i faktoru samotného (obr. 10C). Navíc se tento efekt zdál být závislý na jeho rostoucí koncentraci, nikoliv však na předchozí aplikaci LPS.

Při posuzování možné spolupráce mezi LPS a DHS Western blotem při jejich 6hodinovém spolupůsobení se nejprve vycházelo z faktu, že fosforylací je inhibitor predisponován k degradaci, čímž je umožněn přesun NF- κ B do jádra [12]. Výsledek sníženého množství fosforylované formy inhibitoru vlivem 10-15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS (obr. 12A) tak bylo možné interpretovat jako pokles LPS-indukované aktivity NF- κ B (p65). Avšak při současně provedené analýze celkového proteinu I κ B bylo odhaleno, že DHS signifikantně potlačil také hladinu nefosforylované formy při spolupůsobení LPS (obr. 12B). Shrnutím zjištění získaných na úrovni mRNA (obr. 11) i proteinu (obr. 12) se zdá, že DHS blokuje *de novo* syntézu I κ B degradovaného působením LPS. Protože resyntéza I κ B koresponduje s návratem NF- κ B do neaktivního stavu [1, 14], zřejmě DHS udržuje NF- κ B při zánětu aktivní. Na druhou stranu, z obr. 13 je patrná koncentračně závislá schopnost DHS potlačovat navázání NF- κ B na odpovídající DNA sekvenci v buňkách NHDF exponovaných LPS. Tento účinek však má své limity. Za daných experimentálních podmínek v buňkách exponovaných samotnému LPS nedošlo k indukcii vazebné aktivity NF- κ B. Navíc v buňkách pouze škrábnutých, které LPS vystaveny nebyly, vyvolala nejvyšší studovaná koncentrace DHS mírný pokles vazebné aktivity NF- κ B. Proto se zdá, že DHS brání fyziologické zánětlivé odpovědi a normálnímu průběhu hojení. Významnější schopnost DHS inhibovat konstitutivní vazebnou kapacitu NF- κ B v porovnání s parentní molekulou byla pozorována v případě rakovinných buněk [142]. V tomto případě bylo s výhodou využito skutečnosti, že NF- κ B reguluje také proliferaci, diferenciaci a buněčné přežití [1, 10]. Souvislost mezi potlačením vazebné aktivity NF- κ B a poklesem viability NHDF po aplikaci 25-50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHS (obr. 7) však v této práci analyzována nebyla. Inhibiční účinek DHS na rozdíl od SB či KVE zjištěný MTT testem na primárních buňkách NHDF v této práci nebyl pozorován testem s neutrální červení (NČ) provedeným v jiné publikaci, a to až do koncentrace 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [265]. Odlišné výsledky obou testů mohou být zapříčiněny faktem, že jsou zacíleny na různé buněčné kompartmenty (retence NČ lysozomy živých buněk \times redukce MTT mitochondriálními dehydrogenázami životaschopných buněk), případně subjektivní senzitivitou primokultur izolovaných z tkáně různých pacientů. Testem NČ však byla zjištěna

toxicita v případě buněčné linie keratinocytů HaCaT či myších fibroblastů v podobném koncentračním rozsahu jako v naší práci. Podle autorů je toxicita DHS oproti SB způsobena jeho lipofilnějším charakterem, což mu umožňuje snazší průchod membránami a interakci s membránovými lipidy a proteiny. Na druhou stranu, v uvedené publikaci právě DHS v netoxických koncentracích byl nejefektivnější molekulou (společně s KVE) v prevenci oxidačního poškození [211]. Podle Pyszkova a kol. je dvojná vazba mezi C2-C3 ve spojení s C3-hydroxylem příčinou lepší antioxidační schopnosti, ale také vyšší reaktivity a cytotoxicity DHS ve srovnání s ostatními složkami silymarinu [266]. Uvedené tvrzení by korespondovalo se skutečností, že zatímco nízké koncentrace DHS působily v prevenci oxidačního poškození, vysoké koncentrace již tento pozitivní účinek neměly [265].

Během hojení je proliferace a migrace buněk regulována také působením AP-1, např. prostřednictvím exprese růstových faktorů [10, 74, 75, 267]. Vzájemná synergie s NF- κ B hraje významnou roli např. při aktivaci genové exprese IL-8 [81, 85, 268]. Jak je patrné z obr.9B, došlo vlivem 24hodinového působení DHS k aktivaci c-Jun, s mnohem výraznějším efektem v případě LPS-exponovaných buněk. Podobné schéma účinku bylo pozorováno u NF- κ B (obr. 9A) a následném zvýšení IL-8 mRNA (obr. 10B). Publikované studie se rozcházejí v názoru, zda je zvýšená hladina IL-8 pro hojení přínosná, či nežádoucí. Studie *in vitro* i *in vivo* uvádějí, že rána je vlivem přítomnosti IL-8 rychleji zacelena v důsledku jeho schopnosti podporovat reepitelizaci [235, 269]. Za patologických stavů však může jeho nadprodukce přispívat k abnormálnímu průběhu hojení. Tato skutečnost byla demonstrována např. u popálenin, kdy zvýšením koncentrace IL-8 došlo k indukci hypertrofie tkáně po stimulaci fibroblastů LPS [238], nebo ke zpomalení proliferace keratinocytů [239].

Nadměrná aktivace c-Jun/AP-1 je rovněž spojována s proapoptotickým účinkem některých toxických látek [270, 271]. Apoptóza buněk přispívá k celkové intenzitě zánětu. V takovém případě by byla současná inhibice NF- κ B nežádoucí, protože NF- κ B indukuje expresi anti-apoptotických genů. Tímto způsobem může NF- κ B vykazovat protizánětlivý účinek [10].

Jako další stupeň simulace *in vitro* kožní rány byl zvolen model RHE, protože ve srovnání s monovrstvou proliferujících keratinocytů lépe odpovídá histologickým a morfologickým vlastnostem skutečné lidské epidermis [272, 273]. Epidermální keratinocyty tvořící RHE produkují po kontaktu s dráždivou látkou také podobné biochemické látky [274, 275]. Protože RHE neobsahuje na rozdíl od skutečné epidermis extracelulární matrix, která by tyto látky zachytila, dochází k jejich zvýšenému uvolnění do média. Tím je umožněna jejich citlivější detekce [209, 276]. Protože RHE je tvořena několika vrstvami buněk, a vytváří důležitou svrchní vrstvu *stratum corneum* s bariérovými vlastnostmi stejně jako skutečná epidermis, byly při studiu účinku vybraných složek silymarinu na zánětlivou RHE aplikovány vyšší koncentrace uvedených látek ($15 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $25 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Histologickou analýzu umožňují prototypické markery stratifikované epidermis. Cytokeratin 14 a 5 exprimované mitoticky aktivními keratinocyty bazální vrstvy jsou ve vyšších vrstvách epidermis redukovány. Keratinizace je doprovázena inhibicí proliferace a buněčného cyklu [277]. Hlavní komponentou kornifikovaného obalu plně diferencovaného keratinocytu (korneocytu) je loricrin. Jeho přítomnost je proto významná pro udržení bariérových vlastností *stratum corneum*. Jeho deficiencie doprovází chronické kožní zánětlivé onemocnění psoriázu [220]. Při vizuálním posouzení mikroskopických fotografií zánětlivé RHE (obr. 15 a 16) se vlivem nejnižší analyzované koncentrace DHS zdají morfologické změny, vyvolané povrchově aktivní látkou, méně významné. Vyšší účinnost DHS ve srovnání s ostatními analyzovanými polyfenoly může být opět vysvětlena jeho vyšší lipofilitou. DHS snáze proniká skrze lipofilní *stratum corneum* k živým buňkám a je rozpuštěn v hydrofobním mikroprostředí tkáně [278]. Žádoucí efekt pozorovaný v této práci však vymizel s jeho zvyšující se koncentrací. Případný koncentračně závislý pro-/protizánětlivý efekt se nepodařilo potvrdit metodou ELISA, protože nedošlo k signifikantním změnám v produkci zánětlivých markerů (obr. 14A, 14B). V obou analytických přístupech byla patrná interindividuální variabilita, proto by zdánlivě slibný výsledek bylo třeba podpořit dalšími měřeními. Samotné analyzované látky však RHE nenarušují. Jejich 24hodinová expozice nezpůsobuje

významnější morfologické změny (obr. 17), ani zvýšenou produkci cytokinů (obr. 14).

Součástí předkládané práce bylo rovněž posouzení účinku AgNČ na *in vitro* modelu zdravé epidermis RHE. V současnosti jsou nanočástice stříbra poměrně široce klinicky aplikovány jako součást antibakteriálních krycích materiálů podporujících hojení ran [7, 152]. Hlavní benefit aplikace AgNČ do hojivých materiálů je spatřován ve schopnosti inhibovat bakteriální růst s nízkým rizikem vzniku bakteriální rezistence [7]. Jejich schopnost podporovat hojení ran je však zřejmě mnohem komplexnější [162, 167, 169]. Přesto je jejich bezpečnost stále předmětem diskusí. Některé publikace uvádějí toxické účinky AgNČ na kožní buňky [171, 177, 185]. Diskutována je také možnost jejich penetrace skrze *stratum corneum*, transdermální absorpce do systémové cirkulace [200, 202, 279] a nežádoucí účinky na buňky tkání a orgánů [179, 181-183]. Uvádí se, že účinnost nanočástic stříbra stoupá s jejich zmenšující se velikostí [7, 151, 280, 281]. Nedávná studie antibakteriálního efektu AgNČ o rozměrech 5-100 nm demonstrovala výrazné zvýšení účinku nanočástic při snížení velikosti pod 10 nm. Nejúčinnější byla nejmenší studovaná velikost [280]. Předpokládá se, že čím menší je průměr nanočástice, tím intenzivnější je uvolňováním iontů Ag⁺ [153, 281]. Zatímco některé publikace uvádějí, že ionty Ag⁺ jsou primárně zodpovědné za biologický účinek AgNČ [178, 190, 282, 283], jiné považují za důležitější přímý kontakt mikroorganismů s větším měrným povrchem nanočástice [155, 284, 285]. Tento názor podporuje skutečnost, že množství iontů uvolněných z povrchu AgNČ je ve skutečnosti nesignifikantní [155, 284]. Snižující se velikost nanočástice je však také proporcionální její schopnosti penetrovat pokožkou. Penetrace AgNČ kůží byla diskutována v několika studiích s různými závěry [165, 200, 202, 279, 286, 287]. Larese a kol. uvádějí nízkou, přesto detekovatelnou absorpci nanočástic již o velikosti 25 ± 7,1 nm u zdravé kůže, která se však zvyšuje u kůže poškozené [286]. Na druhou stranu, podle výpočtů Watkinson a kol. by teoreticky byla možná pouze permeace nanočástic < 0,58 nm. Autoři uvažují intercelulární transport [288]. U různých typů buněk, včetně kožních, však byly nanočástice objeveny také

intracelulárně v cytoplazmě jako aglomeráty uvnitř endocytických vezikul [184, 188, 203].

V naší práci analyzující účinek nanostříbra na *in vitro* modelu zdravé lidské epidermis byla pozorována povrchová lokalizace na *stratum corneum* při vyšších aplikovaných koncentracích AgNČ (obr. 20). Průměrná velikost částic zjištěná TEM byla 10 ± 5 nm. Tento výsledek koresponduje s výpočty Watkinson a kol. [288] a dalšími studiemi, které uvádějí značně omezenou internalizaci AgNČ (> 10 nm) do buněk keratinocytů [171, 184, 188]. Podobně nedávná práce autorů Kraeling a kol. uvádí, že naprostá většina AgNČ (20 nm) zůstala na povrchu *stratum corneum*, pouze 3 % byla internalizována [200]. Autory Baroli a kol. byla pozorována rovněž pouze velice slabá penetrace částic o průměru $6 \pm 2,5$ nm přes *stratum corneum* k živým keratinocytům, kde došlo k jejich zachycení [289].

V případě, že iritant interaguje s živou buňkou, dochází k syntéze a uvolnění prozánětlivých mediátorů [1, 290]. Studie *in vitro* analyzující účinek AgNČ na monovrstvě proliferujících kožních buněk se rozcházejí, zda produkci cytokinů v kožních buňkách zvyšují [184, 188], potlačují nebo neovlivňují [169, 186, 189]. Je to zřejmě dáno větším počtem proměnných (velikost částic, koncentrace, příprava AgNČ), které významně ovlivňují výsledné chování buněk. Intradruhové rozdíly mohou být částečně vysvětleny odlišným složením média, které může ovlivnit solubilizaci AgNČ a uvolňování iontů [291]. Například autory Poon a kol. bylo pozorováno srovnání citlivosti keratinocytů a fibroblastů k Ag^+ po kultivaci ve shodném médiu [185].

V předložené práci byla využita RHE jako validovaná mezinárodně schválená *in vitro* alternativa testování na zvířatech umožňující posuzování dráždivých a cytotoxických účinků chemických látek [272, 292, 293]. Rekonstruovaná lidská epidermis má v důsledku přítomnosti zevní epidermální vrstvy *stratum corneum* bariérové vlastnosti, které monovrstva keratinocytů postrádá [209, 276, 294]. Proto k indukci zánětlivé odpovědi v monovrstvě buněk obvykle postačí nižší koncentrace látek [209, 276, 294]. Například autory Poon a kol. byla pozorována vyšší toxicita Ag^+ při aplikaci na monovrstvu kožních buněk

ve srovnání s trojrozměrným *in vitro* modelem (vytvořeném růstem NHEK na tzv. feeder-layer)[185].

Jak je patrné z obr. 19 v předložené práci, produkce IL-6 a IL-8 zůstává vlivem AgNČ či Ag⁺ ve srovnání s kontrolou nezměněna. Pokud by v případě našeho modelu zdravé epidermis došlo k potlačení produkce cytokinů pod úroveň kontroly, mohlo by dojít k oslabení přirozené bariérové funkce [295]. Podle obr. 20 a 21, nedocházelo po aplikaci žádné ze studovaných koncentrací metalického ani iontového stříbra ke změnám morfologie RHE. Podobné závěry uvádějí studie *in vitro* na 3D modelu lidské kůže EpiDermTM [296] a *in vivo* dokonce i v případě pacientů s atopickou dermatitidou [287]. Rychlejší hojení ran s omezením vzniku nežádoucích jizev, pozorované po aplikaci AgNČ, je v řadě publikací spojováno mimo jiné právě se schopností potlačovat nadměrný zánět [167, 207, 297-299].

Cílená analýza vlivu subtoxických koncentrací Ag⁺ na keratinocyty byla provedena v nedávné studii, kdy byla zjištěna podpora buněčné proliferace [191]. Zatímco nadprodukce ROS indukovaná toxickými koncentracemi Ag⁺ vede k buněčné smrti, mírné zvýšení ROS vlivem subtoxických koncentrací Ag⁺ aktivuje signální dráhy zvyšující proliferaci keratinocytů [191], čímž může podporovat reepitelizaci během hojení ran [162, 300].

Na druhou stranu, vzhledem k publikovaným toxickým účinkům iontů stříbra ke kožním buňkám, se jeví jako vhodnější vyvíjet a následně aplikovat na kůži materiály na bázi nanostříbra uvolňující jen velmi nízké koncentrace Ag⁺, zejména tehdy, je-li kožní bariéra narušena hojením, příp. chronickým zánětlivým onemocněním. A to i s ohledem na publikovanou skutečnost, že antimikrobiální účinnost AgNČ s menším průměrem částic (~ 10 nm) je ve srovnání s ionty vyšší [155].

7 ZÁVĚRY

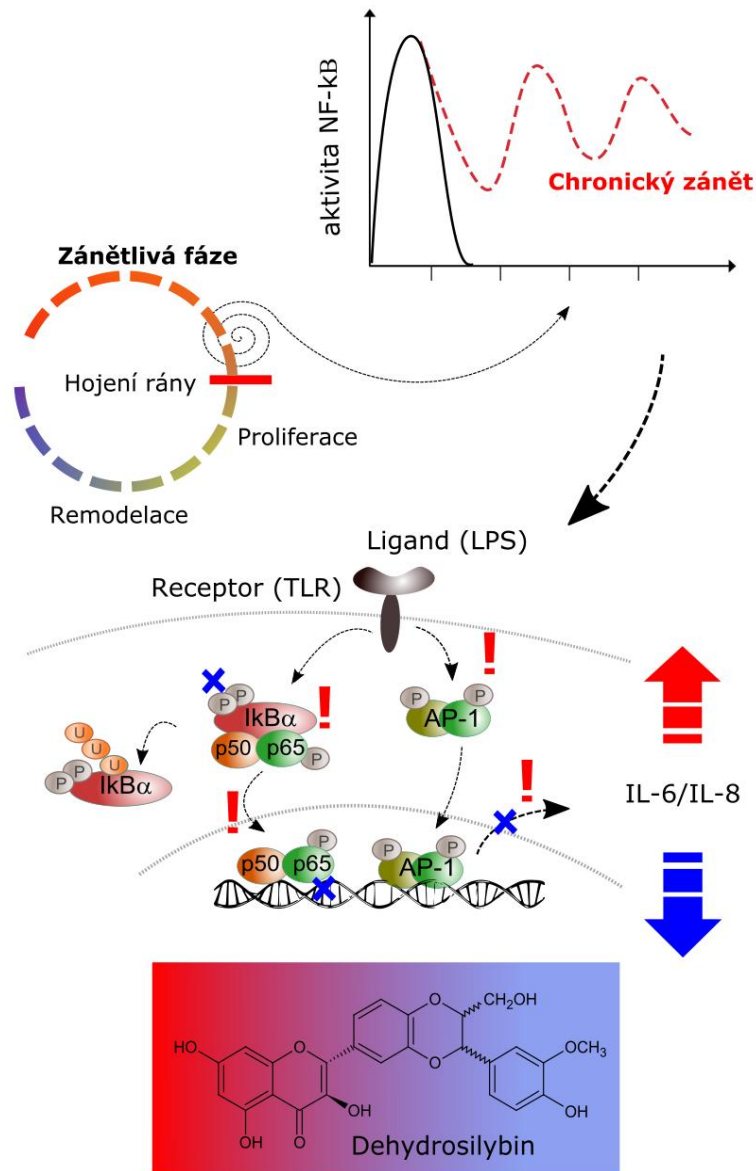
Předkládaná disertační práce je věnována studiu podpory hojení ran vlivem vybraných přírodních látek se zaměřením na zánětlivou fázi, a také analýze potenciálního prozánětlivého účinku nanočástic stříbra *in vitro* s využitím kožních buněk.

Výsledky práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- V rámci studovaného koncentračního rozmezí ($5\text{-}50\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vykazoval DHS mezi vybranými flavonoidy jako jediný cytotoxický účinek na buňky NHDF, avšak pouze při značně vysoké koncentraci (od $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, signifikantně při $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Na druhou stranu vykazoval nejvýznamnější efekt na produkci prozánětlivých markerů IL-6 a IL-8 v LPS-stimulované škrábnuté monovrstvě NHDF ovlivněním molekulárních dráh NF- κ B a AP-1. Jeho účinek byl dokonce výraznější ve srovnání s IND.
- Působení DHS na *in vitro* model infikované kožní rány však nebylo jednoznačné. Jako protizánětlivé byly vyhodnoceny tyto účinky; snížení množství uvolněných cytokinů IL-6 a IL-8, pokles fosforylace inhibitoru a vazebné aktivity NF- κ B v NHDF vystavených LPS. Naopak prozánětlivý charakter měly tyto účinky; zvýšení množství mRNA IL-8 a aktivace transkripčních účinků NF- κ B a AP-1, společně s inhibicí resyntézy I κ B po jeho degradaci indukované LPS.
- Aplikace $15\text{-}50\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SB, KVE, DHS a IND na RHE nevyvolala morfologické změny či prozánětlivé efekty. Naopak působením nejnižší aplikované koncentrace DHS došlo k mírnému zlepšení morfologie epidermis narušené vlivem SDS. Na druhou stranu DHS nezabránil zvýšené produkci prozánětlivých markerů v RHE poškozené SDS. Jeho účinek byl v obou případech podobný působení IND ve stejné koncentraci.
- S ohledem na značnou variabilitu působení DHS na průběh prozánětlivých molekulárních drah (obr. 22), a vzhledem k interindividuální variabilitě v odpovědích NHDF izolovaných z kůže jednotlivých pacientů, je třeba ověřit jeho možný hojivý potenciál dalšími studii. Protože DHS vykazoval určitou

synergii se zánětlivým působením LPS, neměl by být aplikován např. na kůži postiženou zánětlivými kožními chorobami.

- Analýzou tvorby prozánětlivých markerů či morfologických změn po aplikaci subtoxických koncentrací nanočástic či iontů stříbra na 3D *in vitro* modelu zdravé RHE nebyl zjištěn prozánětlivý účinek žádné ze studovaných forem stříbra.



✘ Protizánětlivý účinek ! Prozánětlivý účinek

Obrázek 22. Schematické znázornění působení DHS na buňky fibroblastů při zánětu indukovaném LPS dle výsledků předložené práce. Pokles fosforylace

inhibitoru I κ B α , inhibice vazebné schopnosti NF- κ B či pokles množství cytokinů IL-6 a IL-8 uvolněných buňkami do média, příp. snížení IL-6 mRNA, lze považovat za protizánětlivé působení DHS. Současně však byly pozorovány prozánětlivé účinky; podpora aktivace AP-1 a transportu NF- κ B do jádra (fosforylací NF- κ B a potlačením přítomnosti I κ B α), také zvýšená syntéza IL-8 (na úrovni mRNA). Některé z uvedených účinků bylo možné pozorovat bez předchozí stimulace LPS, vlivem LPS však byly zesíleny.

8 SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

Publikace vztahující se k disertaci

Juráňová J., Aury-Landas J., Boumediene K., Bauge C., Biedermann D., Ulrichová J., Franková J.: Modulation of Skin Inflammatory Response by Active Components of Silymarin. *Molecules* 2018, 24(1):123

Juráňová J., Franková J., Ulrichová J.: The role of keratinocytes in inflammation. *Journal of Applied Biomedicine* 2017, 15(3):169-179

Franková J., Juráňová J., Kamarád V., Zálešák B., Ulrichová J.: Effect of AgNPs on the human reconstructed epidermis. *Interdisciplinary Toxicology* 2018, 11(4):289-293

Franková J., Pivodová V., Vágnerová H., Juráňová J., Ulrichová J.: Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *J Appl Biomater Funct Mater* 2016, 14(2):e137-142

Publikace z oboru

Juráňová J.: Illuminating the cellular and molecular mechanism of the potential toxicity of methacrylate monomers used in biomaterials. *Drug and chemical toxicology* 2018:1-13

Abstrakt příspěvku na konferenci

Juráňová J., Franková J., Ulrichová J.: In vitro studium toxicity nanočástic stříbra na modelu rekonstruované lidské epidermis. *XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů*, 10.-12.11 2014, Brno, Česká republika

Juráňová J., Franková J., Zálešák B., Ulrichová J.: In vitro irritation model for prediction of wound healing potential of anti-inflammatory drug. *2nd Tissue models & Phenotypic screening*, 4.-7.5. 2015, Berlín, Německo

Juráňová J., Franková J., Zálešák B., Ulrichová J.: Assessment of the wound healing effect of selected flavonoids on *in vitro* irritation model. *EUSAAT Congress 2015 19th European Congress on Alternatives to Animal Testing*, 20.-23.9.2015, Linz, Rakousko

Juráňová J., Franková J., Ulrichová J.: Study of wound healing potential of active silymarin components using *in vitro* 3D model of skin inflammation. *RICT 2016 Interfacing Chemical Biology and Drug Discovery, 52nd International Conference on Medical Chemistry*, 6.-8.7.2016, Caen, Francie

Juráňová J., Franková J., Ulrichová J.: Wound healing potential of selected components of silymarin. *Trends in Natural Product Research – PSE Young Scientist Meeting Lille 2017, Natural Products in Health, Agrofood and Cosmetics*, 27.6.-1.7.2017, Lille, Francie

9 LITERATURA

1. Juráňová J, Franková J, Ulrichová J: **The role of keratinocytes in inflammation.** *Journal of Applied Biomedicine* 2017, **15**(3):169-179.
2. Powers JG, Higham C, Broussard K, Phillips TJ: **Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management.** *J Am Acad Dermatol* 2016, **74**(4):607-625; quiz 625-606.
3. Eming SA, Krieg T, Davidson JM: **Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms.** *The Journal of investigative dermatology* 2007, **127**(3):514-525.
4. Landen NX, Li D, Stahle M: **Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing.** *Cell Mol Life Sci* 2016, **73**(20):3861-3885.
5. Renner F, Schmitz ML: **Autoregulatory feedback loops terminating the NF-kappaB response.** *Trends Biochem Sci* 2009, **34**(3):128-135.
6. Reinke JM, Sorg H: **Wound repair and regeneration.** *Eur Surg Res* 2012, **49**(1):35-43.
7. Nam G, Rangasamy S, Purushothaman B, Song JM: **The Application of Bactericidal Silver Nanoparticles in Wound Treatment.** *Nanomaterials and Nanotechnology* 2015, **5**:5-23.
8. Zeng R, Lin C, Lin Z, Chen H, Lu W, Lin C, Li H: **Approaches to cutaneous wound healing: basics and future directions.** *Cell and tissue research* 2018, **374**(2):217-232.
9. Juráňová J, Aury-Landas J, Boumediene K, Bauge C, Biedermann D, Ulrichová J, Franková J: **Modulation of Skin Inflammatory Response by Active Components of Silymarin.** *Molecules* 2018, **24**(1):123.
10. Pasparakis M: **Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**(11):778-788.
11. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB: **Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1799**(10-12):775-787.
12. Lawrence T: **The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, **1**(6):a001651.
13. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA: **Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation.** *Nat Med* 2001, **7**(12):1291-1297.
14. Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M: **NF-kappaB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation.** *Cell Res* 2011, **21**(1):146-158.
15. Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Sclabas GM, Peng B, Uwagawa T, Li Z, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ: **NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(17):7806-7819.
16. Mihai MM, Preda M, Lungu I, Gestal MC, Popa MI, Holban AM: **Nanocoatings for Chronic Wound Repair-Modulation of Microbial Colonization and Biofilm Formation.** *Int J Mol Sci* 2018, **19**(4):1179.
17. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF: **Impaired wound healing.** *Clin Dermatol* 2007, **25**(1):19-25.
18. Singer AJ, Clark RA: **Cutaneous wound healing.** *N Engl J Med* 1999, **341**(10):738-746.

19. Diegelmann RF, Evans MC: **Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2004, **9**:283-289.
20. Han G, Ceilley R: **Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments.** *Adv Ther* 2017, **34**(3):599-610.
21. Simoes D, Miguel SP, Ribeiro MP, Coutinho P, Mendonca AG, Correia IJ: **Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review.** *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2018, **127**:130-141.
22. Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S: **Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012, **26**(7):812-820.
23. Wallace HA, Bhimji SS: **Wound, Healing, Phases.** In: *StatPearls.* [Online] Treasure Island (FL); 2018. [cit. 11.2.2020] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/>
24. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM: **Wound healing dressings and drug delivery systems: A review.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008, **97**(8):2892-2923.
25. Werner S, Grose R: **Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.** *Physiol Rev* 2003, **83**(3):835-870.
26. Baum CL, Arpey CJ: **Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events.** *Dermatol Surg* 2005, **31**(6):674-686; discussion 686.
27. Henry G, Garner WL: **Inflammatory mediators in wound healing.** *The Surgical clinics of North America* 2003, **83**(3):483-507.
28. Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G: **Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 1999, **7**(6):442-452.
29. MacLeod AS, Mansbridge JN: **The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds.** *Advances in wound care* 2016, **5**(2):65-78.
30. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ: **Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease.** *Biochimica et biophysica acta* 2014, **1843**(11):2563-2582.
31. Uchi H, Terao H, Koga T, Furue M: **Cytokines and chemokines in the epidermis.** *Journal of dermatological science* 2000, **24 Suppl 1**:S29-38.
32. Percival SL: **Biofilms and their potential role in wound healing.** *Wounds* 2004, **16**:234-240.
33. Lu J, Yang M: **Antibiotics for treating infected burn wounds.** *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016, **2**.
34. Bianchi ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 2007, **81**(1):1-5.
35. Koff JL, Shao MX, Kim S, Ueki IF, Nadel JA: **Pseudomonas lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade.** *J Immunol* 2006, **177**(12):8693-8700.
36. Bell S, Degitz K, Quirling M, Jilg N, Page S, Brand K: **Involvement of NF-kappaB signalling in skin physiology and disease.** *Cell Signal* 2003, **15**(1):1-7.
37. Kren V, Walterova D: **Silybin and silymarin--new effects and applications.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005, **149**(1):29-41.

38. Saliou C, Valacchi G, Rimbach G: **Assessing bioflavonoids as regulators of NF-kappa B activity and inflammatory gene expression in mammalian cells.** *Methods Enzymol* 2001, **335**:380-387.
39. Hoesel B, Schmid JA: **The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer.** *Mol Cancer* 2013, **12**:86.
40. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S: **Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways.** *Nat Immunol* 2011, **12**(8):695-708.
41. Oeckinghaus A, Ghosh S: **The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, **1**(4):a000034.
42. Pires BRB, Silva R, Ferreira GM, Abdelhay E: **NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin.** *Genes (Basel)* 2018, **9**(1):24.
43. O'Leary KA, de Pascual-Teresa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G: **Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription.** *Mutat Res* 2004, **551**(1-2):245-254.
44. Aggarwal BB: **Nuclear factor-kappaB: the enemy within.** *Cancer Cell* 2004, **6**(3):203-208.
45. Karin M, Lin A: **NF-kappaB at the crossroads of life and death.** *Nat Immunol* 2002, **3**(3):221-227.
46. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC: **NF-kappaB signaling in inflammation.** *Signal Transduct Target Ther* 2017, **2**:17023.
47. Sun SC, Liu ZG: **A special issue on NF-kappaB signaling and function.** *Cell Res* 2011, **21**(1):1-2.
48. Klement JF, Rice NR, Car BD, Abbondanzo SJ, Powers GD, Bhatt PH, Chen CH, Rosen CA, Stewart CL: **IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**(5):2341-2349.
49. Natoli G, Chiocca S: **Nuclear ubiquitin ligases, NF-kappaB degradation, and the control of inflammation.** *Sci Signal* 2008, **1**(1):pe1.
50. Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin AS, Jr.: **Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II.** *J Biol Chem* 2000, **275**(42):32592-32597.
51. Chen L, Fischle W, Verdin E, Greene WC: **Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation.** *Science* 2001, **293**(5535):1653-1657.
52. Sacconi S, Marazzi I, Beg AA, Natoli G: **Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response.** *J Exp Med* 2004, **200**(1):107-113.
53. Yang XD, Huang B, Li M, Lamb A, Kelleher NL, Chen LF: **Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit.** *The EMBO journal* 2009, **28**(8):1055-1066.
54. Collins PE, Mitxitorena I, Carmody RJ: **The Ubiquitination of NF-kappaB Subunits in the Control of Transcription.** *Cells* 2016, **5**(2):23.
55. Tanaka A, Muto S, Jung K, Itai A, Matsuda H: **Topical application with a new NF-kappaB inhibitor improves atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice.** *The Journal of investigative dermatology* 2007, **127**(4):855-863.
56. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM: **The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development.** *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**(1):17-26.
57. Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, Libert C: **New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation.** *Endocrinology* 2013, **154**(3):993-1007.

58. Ahluwalia A: **Topical glucocorticoids and the skin--mechanisms of action: an update.** *Mediators Inflamm* 1998, **7**(3):183-193.
59. van Wenum E, Jurczakowski R, Litwinienko G: **Media Effects on the Mechanism of Antioxidant Action of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin: Role of the Enol Group.** *Journal of Organic Chemistry* 2013, **78**(18):9102-9112.
60. Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, Schmidt-Supprian M, Nenci A, Toksoy A, Krampert M, Goebeler M, Gillitzer R, Israel A *et al*: **TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2.** *Nature* 2002, **417**(6891):861-866.
61. Omori E, Matsumoto K, Sanjo H, Sato S, Akira S, Smart RC, Ninomiya-Tsuji J: **TAK1 is a master regulator of epidermal homeostasis involving skin inflammation and apoptosis.** *J Biol Chem* 2006, **281**(28):19610-19617.
62. Omori E, Morioka S, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J: **TAK1 regulates reactive oxygen species and cell death in keratinocytes, which is essential for skin integrity.** *J Biol Chem* 2008, **283**(38):26161-26168.
63. Smahi A, Courtois G, Vabres P, Yamaoka S, Heuertz S, Munnich A, Israel A, Heiss NS, Klauck SM, Kioschis P *et al*: **Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium.** *Nature* 2000, **405**(6785):466-472.
64. Melchionna R, Bellavia G, Romani M, Straino S, Germani A, Di Carlo A, Capogrossi MC, Napolitano M: **C/EBPgamma regulates wound repair and EGF receptor signaling.** *The Journal of investigative dermatology* 2012, **132**(7):1908-1917.
65. Beg AA, Baltimore D: **An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death.** *Science* 1996, **274**(5288):782-784.
66. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM: **Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB.** *Science* 1996, **274**(5288):787-789.
67. Etemadi N, Chopin M, Anderton H, Tanzer MC, Rickard JA, Abeysekera W, Hall C, Spall SK, Wang B, Xiong Y *et al*: **TRAF2 regulates TNF and NF-kappaB signalling to suppress apoptosis and skin inflammation independently of Sphingosine kinase 1.** *Elife* 2015, **4**:e10592.
68. Poon IK, Chiu YH, Armstrong AJ, Kinchen JM, Juncadella IJ, Bayliss DA, Ravichandran KS: **Unexpected link between an antibiotic, pannexin channels and apoptosis.** *Nature* 2014, **507**(7492):329-334.
69. Stalinska K, Guzdek A, Rokicki M, Koj A: **Transcription factors as targets of the anti-inflammatory treatment. A cell culture study with extracts from some Mediterranean diet plants.** *J Physiol Pharmacol* 2005, **56 Suppl 1**:157-169.
70. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF: **Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**(1):201.
71. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R: **The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation.** *Biochim Biophys Acta* 2011, **1813**(9):1619-1633.
72. Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S, Nguyen DU, Pham CG, Nelsbach AH, Melis T *et al*: **Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**(2):146-153.
73. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO: **Mechanisms regulating skin immunity and inflammation.** *Nat Rev Immunol* 2014, **14**(5):289-301.

74. Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M: **Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology.** *Oncogene* 2001, **20**(19):2413-2423.
75. Florin L, Hummerich L, Dittrich BT, Kokocinski F, Wrobel G, Gack S, Schorpp-Kistner M, Werner S, Hahn M, Lichter P *et al*: **Identification of novel AP-1 target genes in fibroblasts regulated during cutaneous wound healing.** *Oncogene* 2004, **23**(42):7005-7017.
76. Schonthaler HB, Guinea-Viniegra J, Wagner EF: **Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway.** *Annals of the rheumatic diseases* 2011, **70 Suppl 1**:i109-112.
77. Uluckan O, Guinea-Viniegra J, Jimenez M, Wagner EF: **Signalling in inflammatory skin disease by AP-1 (Fos/Jun).** *Clinical and experimental rheumatology* 2015, **33**(4 Suppl 92):S44-49.
78. Stein B, Baldwin AS, Jr., Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P: **Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function.** *The EMBO journal* 1993, **12**(10):3879-3891.
79. Krappmann D, Wegener E, Sunami Y, Esen M, Thiel A, Mordmuller B, Scheidereit C: **The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(14):6488-6500.
80. Tu YC, Huang DY, Shiah SG, Wang JS, Lin WW: **Regulation of c-Fos gene expression by NF-kappaB: a p65 homodimer binding site in mouse embryonic fibroblasts but not human HEK293 cells.** *PLoS One* 2013, **8**(12):e84062.
81. Perfetto B, Donnarumma G, Criscuolo D, Paoletti I, Grimaldi E, Tufano MA, Baroni A: **Bacterial components induce cytokine and intercellular adhesion molecules-1 and activate transcription factors in dermal fibroblasts.** *Res Microbiol* 2003, **154**(5):337-344.
82. Yang J, Lin Y, Guo Z, Cheng J, Huang J, Deng L, Liao W, Chen Z, Liu Z, Su B: **The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation.** *Nat Immunol* 2001, **2**(7):620-624.
83. Hirano M, Osada S, Aoki T, Hirai S, Hosaka M, Inoue J, Ohno S: **MEK kinase is involved in tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation and degradation of IkappaB-alpha.** *J Biol Chem* 1996, **271**(22):13234-13238.
84. Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T: **Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway.** *Cell* 1997, **88**(2):213-222.
85. Pastore S, Mascia F, Mariotti F, Dattilo C, Mariani V, Girolomoni G: **ERK1/2 regulates epidermal chemokine expression and skin inflammation.** *J Immunol* 2005, **174**(8):5047-5056.
86. Lakshminarayanan V, Drab-Weiss EA, Roebuck KA: **H2O2 and tumor necrosis factor-alpha induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells.** *J Biol Chem* 1998, **273**(49):32670-32678.
87. Hwang D, Jang BC, Yu G, Boudreau M: **Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages.** *Biochem Pharmacol* 1997, **54**(1):87-96.
88. Tak PP, Firestein GS: **NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases.** *The Journal of clinical investigation* 2001, **107**(1):7-11.
89. De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, Cong R, Franzoso G: **Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling.** *Nature* 2001, **414**(6861):308-313.

90. Javelaud D, Besancon F: **NF-kappa B activation results in rapid inactivation of JNK in TNF alpha-treated Ewing sarcoma cells: a mechanism for the anti-apoptotic effect of NF-kappa B.** *Oncogene* 2001, **20**(32):4365-4372.
91. Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A: **Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes.** *Nature* 2001, **414**(6861):313-317.
92. Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X: **A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis.** *Cell* 2003, **115**(1):61-70.
93. Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao JH, Xue X, Okumura K: **Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK.** *Cell Death Differ* 2006, **13**(5):730-737.
94. Potapovich AI, Lulli D, Fidanza P, Kostyuk VA, De Luca C, Pastore S, Korkina LG: **Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFkappaB and AhR and EGFR-ERK pathway.** *Toxicology and applied pharmacology* 2011, **255**(2):138-149.
95. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P *et al*: **DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival.** *Cell* 1998, **93**(4):531-541.
96. Ratz-Lyko A, Arct J, Majewski S, Pytkowska K: **Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin.** *Phytother Res* 2015, **29**(4):509-517.
97. Dhanalakshmi S, Mallikarjuna GU, Singh RP, Agarwal R: **Dual efficacy of silibinin in protecting or enhancing ultraviolet B radiation-caused apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes.** *Carcinogenesis* 2004, **25**(1):99-106.
98. Hirata Y, Takahashi M, Morishita T, Noguchi T, Matsuzawa A: **Post-Translational Modifications of the TAK1-TAB Complex.** *International journal of molecular sciences* 2017, **18**(1):205.
99. Kawai T, Akira S: **Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors.** *Trends in molecular medicine* 2007, **13**(11):460-469.
100. Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L: **Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection.** *Int Wound J* 2015, **12**(1):47-52.
101. Gupta PD, Birdi TJ: **Development of botanicals to combat antibiotic resistance.** *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* 2017, **8**(4):266-275.
102. Dzialo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A: **The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders.** *International Journal of Molecular Sciences* 2016, **17**(2):160.
103. Mohanty C, Sahoo SK: **Curcumin and its topical formulations for wound healing applications.** *Drug Discovery Today* 2017, **22**(10):1582-1592.
104. Bajpai SK, Ahuja S, Chand N, Bajpai M: **Nano cellulose dispersed chitosan film with Ag NPs/Curcumin: An in vivo study on Albino Rats for wound dressing.** *Int J Biol Macromol* 2017, **104**(Pt A):1012-1019.
105. Shao M, Hussain Z, Thu HE, Khan S, de Matas M, Silkstone V, Qin HL, Bukhari SNA: **Emerging Trends in Therapeutic Algorithm of Chronic Wound Healers: Recent Advances in Drug Delivery Systems, Concepts-to-Clinical Application and Future Prospects.** *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2017, **34**(5):387-452.
106. Garcia-Orue I, Gainza G, Gutierrez FB, Aguirre JJ, Evora C, Pedraz JL, Hernandez RM, Delgado A, Igartua M: **Novel nanofibrous dressings containing rhEGF and**

- Aloe vera for wound healing applications.** *International Journal of Pharmaceutics* 2017, **523**(2):556-566.
107. Pereira RF, Bartolo PJ: **Traditional Therapies for Skin Wound Healing.** *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016, **5**(5):208-229.
 108. Vedakumari WS, Ayaz N, Karthick AS, Senthil R, Sastry TP: **Quercetin impregnated chitosan-fibrin composite scaffolds as potential wound dressing materials - Fabrication, characterization and in vivo analysis.** *Eur J Pharm Sci* 2017, **97**:106-112.
 109. Samanta R, Pattnaik AK, Pradhan KK, Mehta BK, Pattanayak SP, Banerjee S: **Wound Healing Activity of Silibinin in Mice.** *Pharmacognosy research* 2016, **8**(4):298-302.
 110. Martinotti S, Ranzato E: **Honey, Wound Repair and Regenerative Medicine.** *J Funct Biomater* 2018, **9**(2):34.
 111. Aziz Z, Abdul Rasool Hassan B: **The effects of honey compared to silver sulfadiazine for the treatment of burns: A systematic review of randomized controlled trials.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2017, **43**(1):50-57.
 112. Papuc C, Goran GV, Predescu CN, Nicorescu V, Stefan G: **Plant Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-Life Extension of Meat and Meat Products: Classification, Structures, Sources, and Action Mechanisms.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2017, **16**(6):1243-1268.
 113. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A: **Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases.** *Antioxid Redox Signal* 2013, **18**(14):1818-1892.
 114. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L: **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *American Journal of Clinical Nutrition* 2004, **79**(5):727-747.
 115. Arct J, Pytkowska K: **Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals.** *Clin Dermatol* 2008, **26**(4):347-357.
 116. Naik A, Kalia YN, Guy RH: **Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function.** *Pharm Sci Technolo Today* 2000, **3**(9):318-326.
 117. Cushnie TPT, Lamb AJ: **Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in Staphylococcus aureus by measuring potassium loss.** *Journal of ethnopharmacology* 2005, **101**(1-3):243-248.
 118. Wu T, He M, Zang X, Zhou Y, Qiu T, Pan S, Xu X: **A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of E. coli by membrane interaction effect.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1828**(11):2751-2756.
 119. Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M: **Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review.** *Food chemistry* 2007, **104**(2):466-479.
 120. Stermitz FR, Tawara-Matsuda J, Lorenz P, Mueller P, Zenewicz L, Lewis K: **5'-Methoxyhydnocarpin-D and pheophorbide A: Berberis species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant Staphylococcus aureus.** *J Nat Prod* 2000, **63**(8):1146-1149.
 121. Jung HJ, Lee DG: **Synergistic antibacterial effect between silybin and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide in clinical Pseudomonas aeruginosa isolates.** *J Microbiol* 2008, **46**(4):462-467.
 122. Pastore S, Potapovich A, Kostyuk V, Mariani V, Lulli D, De Luca C, Korkina L: **Plant polyphenols effectively protect HaCaT cells from ultraviolet C-triggered**

- necrosis and suppress inflammatory chemokine expression. *Ann N Y Acad Sci* 2009, **1171**:305-313.
123. Korkina L, De Luca C, Pastore S: **Plant polyphenols and human skin: friends or foes.** *Ann N Y Acad Sci* 2012, **1259**:77-86.
 124. Huber A, Thongphasuk P, Erben G, Lehmann WD, Tuma S, Stremmel W, Chamulitrat W: **Significantly greater antioxidant anticancer activities of 2,3-dehydrosilybin than silybin.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1780**(5):837-847.
 125. Priyadarsini KI, Guha SN, Rao MN: **Physico-chemical properties and antioxidant activities of methoxy phenols.** *Free radical biology & medicine* 1998, **24**(6):933-941.
 126. Gazak R, Svobodova A, Psotova J, Sedmera P, Prikrylova V, Walterova D, Kren V: **Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity.** *Bioorg Med Chem* 2004, **12**(21):5677-5687.
 127. Varga Z, Seres I, Nagy E, Ujhelyi L, Balla G, Balla J, Antus S: **Structure prerequisite for antioxidant activity of silybin in different biochemical systems in vitro.** *Phytomedicine* 2006, **13**(1-2):85-93.
 128. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C: **Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?** *Free radical biology & medicine* 2004, **36**(7):838-849.
 129. Serhan CN, Savill J: **Resolution of inflammation: the beginning programs the end.** *Nat Immunol* 2005, **6**(12):1191-1197.
 130. Medzhitov R: **Origin and physiological roles of inflammation.** *Nature* 2008, **454**(7203):428-435.
 131. Fernandez MT, Mira ML, Florencio MH, Jennings KR: **Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study.** *J Inorg Biochem* 2002, **92**(2):105-111.
 132. Shi J, Shan S, Li H, Song G, Li Z: **Anti-inflammatory effects of millet bran derived-bound polyphenols in LPS-induced HT-29 cell via ROS/miR-149/Akt/NF-kappaB signaling pathway.** *Oncotarget* 2017, **8**(43):74582-74594.
 133. Owczarek K, Hrabec E, Fichna J, Sosnowska D, Koziolkiewicz M, Szymanski J, Lewandowska U: **Flavanols from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit suppress expression of cyclooxygenase-2, metalloproteinase-9, and nuclear factor-kappaB in human colon cancer cells.** *Acta Biochim Pol* 2017, **64**(3):567-576.
 134. Oz HS: **Chronic Inflammatory Diseases and Green Tea Polyphenols.** *Nutrients* 2017, **9**(6):561.
 135. Pajonk F, Riedisser A, Henke M, McBride WH, Fiebich B: **The effects of tea extracts on proinflammatory signaling.** *BMC Med* 2006, **4**:28.
 136. Tewari-Singh N, Jain AK, Inturi S, Agarwal C, White CW, Agarwal R: **Silibinin attenuates sulfur mustard analog-induced skin injury by targeting multiple pathways connecting oxidative stress and inflammation.** *PLoS One* 2012, **7**(9):e46149.
 137. Han MH, Yoon WK, Lee H, Han SB, Lee K, Park SK, Yang KH, Kim HM, Kang JS: **Topical application of silymarin reduces chemical-induced irritant contact dermatitis in BALB/c mice.** *International immunopharmacology* 2007, **7**(13):1651-1658.
 138. Dzubak P, Hajduch M, Gazak R, Svobodova A, Psotova J, Walterova D, Sedmera P, Kren V: **New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity.** *Bioorg Med Chem* 2006, **14**(11):3793-3810.

139. Giorgi VS, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF: **Silibinin modulates the NF-kappaB pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women.** *J Reprod Immunol* 2012, **95**(1-2):67-72.
140. Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB: **Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis.** *J Immunol* 1999, **163**(12):6800-6809.
141. Vicentini FT, He T, Shao Y, Fonseca MJ, Verri WA, Jr., Fisher GJ, Xu Y: **Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF-kappaB pathway.** *Journal of dermatological science* 2011, **61**(3):162-168.
142. Tilley C, Deep G, Agarwal C, Wempe MF, Biedermann D, Valentova K, Kren V, Agarwal R: **Silibinin and its 2,3-dehydro-derivative inhibit basal cell carcinoma growth via suppression of mitogenic signaling and transcription factors activation.** *Molecular carcinogenesis* 2016, **55**(1):3-14.
143. Correa FR, Schanuel FS, Moura-Nunes N, Monte-Alto-Costa A, Daleprane JB: **Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFkappaB.** *Biomed Pharmacother* 2017, **86**:162-171.
144. Liu W, Li Y, Zheng X, Zhang K, Du Z: **Potent inhibitory effect of silibinin from milk thistle on skin inflammation stimuli by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.** *Food Funct* 2015, **6**(12):3712-3719.
145. Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R: **Silibinin inhibits constitutive and TNFalpha-induced activation of NF-kappaB and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to TNFalpha-induced apoptosis.** *Oncogene* 2002, **21**(11):1759-1767.
146. Pastore S, Lulli D, Potapovich AI, Fidanza P, Kostyuk VA, Dellambra E, De Luca C, Maurelli R, Korkina LG: **Differential modulation of stress-inflammation responses by plant polyphenols in cultured normal human keratinocytes and immortalized HaCaT cells.** *Journal of dermatological science* 2011, **63**(2):104-114.
147. Fujii T, Wakaizumi M, Ikami T, Saito M: **Amla (*Emblica officinalis* Gaertn.) extract promotes procollagen production and inhibits matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts.** *Journal of ethnopharmacology* 2008, **119**(1):53-57.
148. Martins VL, Caley M, O'Toole EA: **Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair.** *Cell and tissue research* 2013, **351**(2):255-268.
149. Khokha R, Murthy A, Weiss A: **Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity.** *Nat Rev Immunol* 2013, **13**(9):649-665.
150. Moffett J, Griffin NE, Ritz MC, George FR: **Pulsed radio frequency energy field treatment of cells in culture results in increased expression of genes involved in the inflammation phase of lower extremity diabetic wound healing.** *The Journal of Diabetic Foot Complications* 2010, **2**(3):57-64.
151. Ullah Khan S, Saleh TA, Wahab A, Khan MHU, Khan D, Ullah Khan W, Rahim A, Kamal S, Ullah Khan F, Fahad S: **Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold.** *Int J Nanomedicine* 2018, **13**:733-762.
152. Konop M, Damps T, Misicka A, Rudnicka L: **Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care: A Minireview.** *Journal of Nanomaterials* 2016: 1-10

153. Labouta HI, Schneider M: **Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review.** *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2013, **9**(1):39-54.
154. Holt KB, Bard AJ: **Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of Escherichia coli: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺.** *Biochemistry* 2005, **44**(39):13214-13223.
155. Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, Tam PK-H, Chiu J-F, Che C-M: **Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles.** *Journal of proteome research* 2006, **5**(4):916-924.
156. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO: **A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus.** *Journal of biomedical materials research* 2000, **52**(4):662-668.
157. Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, Sharma VK, Nevecna T, Zboril R: **Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity.** *Journal of Physical Chemistry B* 2006, **110**(33):16248-16253.
158. Ip M, Lui SL, Poon VK, Lung I, Burd A: **Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison.** *J Med Microbiol* 2006, **55**(Pt 1):59-63.
159. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY *et al*: **Antimicrobial effects of silver nanoparticles.** *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2007, **3**(1):95-101.
160. Lu Z, Rong K, Li J, Yang H, Chen R: **Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria.** *J Mater Sci Mater Med* 2013, **24**(6):1465-1471.
161. Burd A, Kwok CH, Hung SC, Chan HS, Gu H, Lam WK, Huang L: **A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2007, **15**(1):94-104.
162. Liu X, Lee PY, Ho CM, Lui VC, Chen Y, Che CM, Tam PK, Wong KK: **Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing.** *ChemMedChem* 2010, **5**(3):468-475.
163. Lin YH, Hsu WS, Chung WY, Ko TH, Lin JH: **Evaluation of various silver-containing dressing on infected excision wound healing study.** *J Mater Sci Mater Med* 2014, **25**(5):1375-1386.
164. Ahamed MI, Sankar S, Kashif PM, Basha SK, Sastry TP: **Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles.** *Int J Biol Macromol* 2015, **72**:680-686.
165. Keleştemur S: **Wound healing properties of modified silver nanoparticles and their distribution in mouse organs after topical application.** *Nano Biomed Eng* 2012, **4**(4):170.
166. Kwan KH, Liu X, To MK, Yeung KW, Ho CM, Wong KK: **Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing.** *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2011, **7**(4):497-504.
167. Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, Chiu JF, Tam PK: **Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing.** *ChemMedChem* 2007, **2**(1):129-136.

168. Boucher W, Stern JM, Kotsinyan V, Kempuraj D, Papaliodis D, Cohen MS, Theoharides TC: **Intravesical nanocrystalline silver decreases experimental bladder inflammation.** *J Urol* 2008, **179**(4):1598-1602.
169. Franková J, Pivodová V, Vágnerová H, Juráňová J, Ulrichová J: **Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model.** *J Appl Biomater Funct Mater* 2016, **14**(2):e137-142.
170. Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H: **PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes.** *Toxicology letters* 2009, **190**(2):156-162.
171. Zanette C, Pelin M, Crosera M, Adami G, Bovenzi M, Larese FF, Florio C: **Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2011, **25**(5):1053-1060.
172. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ: **Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species.** *Journal of Physical Chemistry B* 2008, **112**(43):13608-13619.
173. Orłowski P, Zmigrodzka M, Tomaszewska E, Ranoszek-Soliwoda K, Czupryn M, Antos-Bielska M, Szemraj J, Celichowski G, Grobelny J, Krzyzowska M: **Tannic acid-modified silver nanoparticles for wound healing: the importance of size.** *Int J Nanomedicine* 2018, **13**:991-1007.
174. Conrad AH, Tramp CR, Long CJ, Wells DC, Paulsen AQ, Conrad GW: **Ag⁺ alters cell growth, neurite extension, cardiomyocyte beating, and fertilized egg constriction.** *Aviat Space Environ Med* 1999, **70**(11):1096-1105.
175. Sambale F, Wagner S, Stahl F, Khaydarov RR, Scheper T, Bahnemann D: **Investigations of the Toxic Effect of Silver Nanoparticles on Mammalian Cell Lines.** *Journal of Nanomaterials* 2015: 1-9
176. Anisha BS, Biswas R, Chennazhi KP, Jayakumar R: **Chitosan-hyaluronic acid/nano silver composite sponges for drug resistant bacteria infected diabetic wounds.** *Int J Biol Macromol* 2013, **62**:310-320.
177. Zou SB, Yoon WY, Han SK, Jeong SH, Cui ZJ, Kim WK: **Cytotoxicity of silver dressings on diabetic fibroblasts.** *Int Wound J* 2013, **10**(3):306-312.
178. Chernousova S, Epple M: **Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal.** *Angewandte Chemie* 2013, **52**(6):1636-1653.
179. Greulich C, Diendorf J, Gessmann J, Simon T, Habijan T, Eggeler G, Schildhauer TA, Epple M, Koller M: **Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles.** *Acta biomaterialia* 2011, **7**(9):3505-3514.
180. Greulich C, Braun D, Peetsch A, Diendorf J, Siebers B, Epple M, Koller M: **The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range.** *Rsc Adv* 2012, **2**(17):6981-6987.
181. Rosas-Hernandez H, Jimenez-Badillo S, Martinez-Cuevas PP, Gracia-Espino E, Terrones H, Terrones M, Hussain SM, Ali SF, Gonzalez C: **Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings.** *Toxicology letters* 2009, **191**(2-3):305-313.
182. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ: **In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2005, **19**(7):975-983.

183. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S: **Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells.** *ACS nano* 2009, **3**(2):279-290.
184. Samberg ME, Oldenburg SJ, Monteiro-Riviere NA: **Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro.** *Environmental health perspectives* 2009, **118**(3):407-413.
185. Poon VK, Burd A: **In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2004, **30**(2):140-147.
186. Galandakova A, Frankova J, Ambrozova N, Habartova K, Pivodova V, Zalesak B, Safarova K, Smekalova M, Ulrichova J: **Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes.** *Human & experimental toxicology* 2016, **35**(9):946-957.
187. Sur I, Altunbek M, Kahraman M, Culha M: **The influence of the surface chemistry of silver nanoparticles on cell death.** *Nanotechnology* 2012, **23**(37):375102.
188. Orłowski P, Krzyzowska M, Zdanowski R, Winnicka A, Nowakowska J, Stankiewicz W, Tomaszewska E, Celichowski G, Grobelny J: **Assessment of in vitro cellular responses of monocytes and keratinocytes to tannic acid modified silver nanoparticles.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2013, **27**(6):1798-1808.
189. Orłowski P, Soliwoda K, Tomaszewska E, Bien K, Fruba A, Gniadek M, Labeledz O, Nowak Z, Celichowski G, Grobelny J *et al*: **Toxicity of tannic acid-modified silver nanoparticles in keratinocytes: potential for immunomodulatory applications.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2016, **35**:43-54.
190. Loza K, Diendorf J, Sengstock C, Ruiz-Gonzalez L, Gonzalez-Calbet JM, Vallet-Regi M, Koller M, Epple M: **The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media.** *J Mater Chem B* 2014, **2**(12):1634-1643.
191. Duan X, Peng D, Zhang Y, Huang Y, Liu X, Li R, Zhou X, Liu J: **Sub-cytotoxic concentrations of ionic silver promote the proliferation of human keratinocytes by inducing the production of reactive oxygen species.** *Frontiers of medicine* 2018, **12**(3):289-300.
192. Garvey M, Padmanabhan SC, Pillai SC, Cruz-Romero MC, Kerry JP, Morris MA: **In vitro cytotoxicity of water soluble silver (Ag) nanoparticles on HaCat and A549 cell lines.** 2017, **1**(3):16.
193. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM: **Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells.** *Toxicology and applied pharmacology* 2009, **236**(3):310-318.
194. Greulich C, Diendorf J, Simon T, Eggeler G, Epple M, Koller M: **Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells.** *Acta biomaterialia* 2011, **7**(1):347-354.
195. Liu N, Tang M: **Toxic effects and involved molecular pathways of nanoparticles on cells and subcellular organelles.** *Journal of Applied Toxicology* 2019, **40**(1):16-36
196. Pratsinis A, Hervella P, Leroux JC, Pratsinis SE, Sotiriou GA: **Toxicity of silver nanoparticles in macrophages.** *Small* 2013, **9**(15):2576-2584.
197. Nadworny PL, Wang J, Tredget EE, Burrell RE: **Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model.** *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine* 2008, **4**(3):241-251.

198. Arora S, Jain J, Rajwade J, Paknikar K: **Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies.** *Toxicology letters* 2008, **179**(2):93-100.
199. Korani M, Rezayat S, Gilani K, Bidgoli SA, Adeli S: **Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig.** *International journal of nanomedicine* 2011, **6**:855.
200. Kraeling MEK, Topping VD, Keltner ZM, Belgrave KR, Bailey KD, Gao X, Yourick JJ: **In vitro percutaneous penetration of silver nanoparticles in pig and human skin.** *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 2018, **95**:314-322.
201. Djokic S: **Treatment of various surfaces with silver and its compounds for topical wound dressings, catheter and other biomedical applications.** *ECS transactions* 2008, **11**(21):1-12.
202. George R, Merten S, Wang TT, Kennedy P, Maitz P: **In vivo analysis of dermal and systemic absorption of silver nanoparticles through healthy human skin.** *Australas J Dermatol* 2014, **55**(3):185-190.
203. Rigo C, Ferroni L, Tocco I, Roman M, Munivrana I, Gardin C, Cairns WR, Vindigni V, Azzena B, Barbante C *et al*: **Active silver nanoparticles for wound healing.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**(3):4817-4840.
204. Stojkowska J, Djurdjevic Z, Jancic I, Bufan B, Milenkovic M, Jankovic R, Miskovic-Stankovic V, Obradovic B: **Comparative in vivo evaluation of novel formulations based on alginate and silver nanoparticles for wound treatments.** *Journal of biomaterials applications* 2018, **32**(9):1197-1211.
205. Singla R, Soni S, Patial V, Kulurkar PM, Kumari A, Mahesh S, Padwad YS, Yadav SK: **In vivo diabetic wound healing potential of nanobiocomposites containing bamboo cellulose nanocrystals impregnated with silver nanoparticles.** *International journal of biological macromolecules* 2017, **105**:45-55.
206. Faedmaleki F, Shirazi FH, Ejtemaeimehr S, Anjarani S, Salarian AA, Ahmadi Ashtiani H, Rastegar H: **Study of Silymarin and Vitamin E Protective Effects on Silver Nanoparticle Toxicity on Mice Liver Primary Cell Culture.** *Acta medica Iranica* 2016, **54**(2):85-95.
207. Zhang C, Li YN, Liu LL, Gong Y, Xie YX, Cao Y: **Chemical Structures of Polyphenols That Critically Influence the Toxicity of ZnO Nanoparticles.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018, **66**(7):1714-1722.
208. Zdarilova A, Svobodova A, Simanek V, Ulrichova J: **Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid suppress lipopolysaccharide-induced alteration in human gingival fibroblasts.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2009, **23**(3):386-392.
209. Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, Herin M, Coquette A: **A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies.** *Archives of dermatological research* 2004, **296**(5):203-211.
210. Gabriellova E, Kren V, Jaburek M, Modriansky M: **Silymarin component 2,3-dehydrosilybin attenuates cardiomyocyte damage following hypoxia/reoxygenation by limiting oxidative stress.** *Physiological research* 2015, **64**(1):79-91.
211. Svobodova A, Walterova D, Psotova J: **Influence of silymarin and its flavanolignans on H₂O₂-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2006, **32**(8):973-979.
212. Agyare C, Osafo N, Boakye YD: **Biomarkers of Wound Healing.** In: *Wound Healing-Current Perspectives.* IntechOpen; 2018. DOI: 10.5772/intechopen.80222.

- Dostupné z: <https://www.intechopen.com/online-first/biomarkers-of-wound-healing/>
213. Kim BR, Seo HS, Ku JM, Kim GJ, Jeon CY, Park JH, Jang BH, Park SJ, Shin YC, Ko SG: **Silibinin inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through inhibition of NF-kappaB signaling pathway in HMC-1 human mast cells.** *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 2013, **62**(11):941-950.
 214. Behrens A, Sibilica M, Wagner EF: **Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation.** *Nature genetics* 1999, **21**(3):326-329.
 215. Dhanasekaran DN, Reddy EP: **JNK signaling in apoptosis.** *Oncogene* 2008, **27**(48):6245-6251.
 216. Magcwebeba T, Riedel S, Swanevelder S, Bouic P, Swart P, Gelderblom W: **Interleukin-1alpha Induction in Human Keratinocytes (HaCaT): An In Vitro Model for Chemoprevention in Skin.** *Journal of skin cancer* 2012, **2012**:393681.
 217. Gibbs S: **In vitro irritation models and immune reactions.** *Skin pharmacology and physiology* 2009, **22**(2):103-113.
 218. Roubalova L, Dinkova-Kostova AT, Biedermann D, Kren V, Ulrichova J, Vrba J: **Flavonolignan 2,3-dehydrosilydianin activates Nrf2 and upregulates NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in Hepa1c1c7 cells.** *Fitoterapia* 2017, **119**:115-120.
 219. Hudson LG, Newkirk KM, Chandler HL, Choi C, Fossey SL, Parent AE, Kusewitt DF: **Cutaneous wound reepithelialization is compromised in mice lacking functional Slug (Snai2).** *Journal of dermatological science* 2009, **56**(1):19-26.
 220. Nithya S, Radhika T, Jeddy N: **Loricrin - an overview.** *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP* 2015, **19**(1):64-68.
 221. Peral MC, Rachid MM, Gobbato NM, Huaman Martinez MA, Valdez JC: **Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with Lactobacillus plantarum.** *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2010, **16**(3):281-286.
 222. Sharifi R, Pasalar P, Kamalinejad M, Dehpour AR, Tavangar SM, Paknejad M, Natanzi MM, Nourbakhsh M, Ashtiani HRA, Akbari M *et al*: **The effect of silymarin (Silybum marianum) on human skin fibroblasts in an in vitro wound healing model.** *Pharmaceutical biology* 2013, **51**(3):298-303.
 223. Svobodova A, Zdarilova A, Maliskova J, Mikulkova H, Walterova D, Vostalova J: **Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin.** *Journal of dermatological science* 2007, **46**(1):21-30.
 224. Molavi O, Narimani F, Asiaee F, Sharifi S, Tarhriz V, Shayanfar A, Hejazi M, Lai R: **Silibinin sensitizes chemo-resistant breast cancer cells to chemotherapy.** *Pharmaceutical biology* 2017, **55**(1):729-739.
 225. Sharifi R, Rastegar H, Kamalinejad M, Dehpour AR, Tavangar SM, Paknejad M, Mehrabani Natanzi M, Ghannadian N, Akbari M, Pasalar P: **Effect of topical application of silymarin (Silybum marianum) on excision wound healing in albino rats.** *Acta medica Iranica* 2012, **50**(9):583-588.
 226. Biedermann D, Vavrikova E, Cvak L, Kren V: **Chemistry of silybin.** *Natural product reports* 2014, **31**(9):1138-1157.
 227. Gomathi K, Gopinath D, Rafiuddin Ahmed M, Jayakumar R: **Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat.** *Biomaterials* 2003, **24**(16):2767-2772.

228. Caddeo C, Diez-Sales O, Pons R, Fernandez-Busquets X, Fadda AM, Manconi M: **Topical anti-inflammatory potential of quercetin in lipid-based nanosystems: in vivo and in vitro evaluation.** *Pharmaceutical research* 2014, **31**(4):959-968.
229. Chen H, Lu C, Liu H, Wang M, Zhao H, Yan Y, Han L: **Quercetin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice via the NF-kappaB pathway.** *International immunopharmacology* 2017, **48**:110-117.
230. Cho BO, Ryu HW, So Y, Jin CH, Baek JY, Park KH, Byun EH, Jeong IY: **Hepatoprotective effect of 2,3-dehydrosilybin on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats.** *Food chemistry* 2013, **138**(1):107-115.
231. Aiba-Kojima E, Tsuno NH, Inoue K, Matsumoto D, Shigeura T, Sato T, Suga H, Kato H, Nagase T, Gonda K *et al*: **Characterization of wound drainage fluids as a source of soluble factors associated with wound healing: comparison with platelet-rich plasma and potential use in cell culture.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2007, **15**(4):511-520.
232. Grimstad O, Sandanger O, Ryan L, Otterdal K, Damaas JK, Pukstad B, Espevik T: **Cellular sources and inducers of cytokines present in acute wound fluid.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2011, **19**(3):337-347.
233. Raja, Sivamani K, Garcia MS, Isseroff RR: **Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2007, **12**:2849-2868.
234. Kolar M, Szabo P, Dvorankova B, Lacina L, Gabius HJ, Strnad H, Sachova J, Vlcek C, Plzak J, Chovanec M *et al*: **Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses.** *Biology of the cell* 2012, **104**(12):738-751.
235. Zimmermann-Klemd AM, Konradi V, Steinborn C, Ucker A, Falanga CM, Woelfle U, Huber R, Jurgenliemk G, Rajbhandari M, Grundemann C: **Influence of traditionally used Nepalese plants on wound healing and immunological properties using primary human cells in vitro.** *Journal of ethnopharmacology* 2019, **235**:415-423.
236. Abe M, Yokoyama Y, Syuto T, Ishibuchi H, Ishikawa O: **Interleukin-6 counteracts effects of cyclosporin A on extracellular matrix metabolism by human dermal fibroblasts.** *Cell and tissue research* 2008, **333**(2):281-288.
237. Jiang WG, Sanders AJ, Ruge F, Harding KG: **Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC-gamma and potential clinical implications.** *Experimental and therapeutic medicine* 2012, **3**(2):231-236.
238. Wang J, Hori K, Ding J, Huang Y, Kwan P, Ladak A, Tredget EE: **Toll-like receptors expressed by dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring.** *Journal of cellular physiology* 2011, **226**(5):1265-1273.
239. Iocono JA, Colleran KR, Remick DG, Gillespie BW, Ehrlich HP, Garner WL: **Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2000, **8**(3):216-225.
240. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA: **Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators.** *Frontiers in pharmacology* 2014, **5**:123.
241. Sfrent-Cornateanu R, Mihai C, Balan S, Ionescu R, Moldoveanu E: **The IL-6 promoter polymorphism is associated with disease activity and disability in**

- systemic sclerosis.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2006, **10**(4):955-959.
242. Liechty KW, Crombleholme TM, Cass DL, Martin B, Adzick NS: **Diminished interleukin-8 (IL-8) production in the fetal wound healing response.** *The Journal of surgical research* 1998, **77**(1):80-84.
 243. Azghani AO, Neal K, Idell S, Amaro R, Baker JW, Omri A, Pendurthi UR: **Mechanism of fibroblast inflammatory responses to Pseudomonas aeruginosa elastase.** *Microbiology* 2014, **160**(Pt 3):547-555.
 244. Gallucci RM, Sloan DK, Heck JM, Murray AR, O'Dell SJ: **Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration.** *The Journal of investigative dermatology* 2004, **122**(3):764-772.
 245. Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N: **Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice.** *Journal of leukocyte biology* 2003, **73**(6):713-721.
 246. Liu Y, Beyer A, Aebersold R: **On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance.** *Cell* 2016, **165**(3):535-550.
 247. Arai KY, Fujioka A, Okamura R, Nishiyama T: **Stimulatory effect of fibroblast-derived prostaglandin E(2) on keratinocyte stratification in the skin equivalent.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2014, **22**(6):701-711.
 248. Chen MR, Dragoo JL: **The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on tissue healing.** *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 2013, **21**(3):540-549.
 249. Weinberg E, Topaz M, Dard M, Lyngstadaas P, Nemcovsky C, Weinreb M: **Differential effects of prostaglandin E(2) and enamel matrix derivative on the proliferation of human gingival and dermal fibroblasts and gingival keratinocytes.** *Journal of periodontal research* 2010, **45**(6):731-740.
 250. Reno F, Grazianetti P, Cannas M: **Effects of mechanical compression on hypertrophic scars: prostaglandin E2 release.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2001, **27**(3):215-218.
 251. Kalish BT, Kieran MW, Puder M, Panigrahy D: **The growing role of eicosanoids in tissue regeneration, repair, and wound healing.** *Prostaglandins & other lipid mediators* 2013, **104-105**:130-138.
 252. Romana-Souza B, Santos JS, Bandeira LG, Monte-Alto-Costa A: **Selective inhibition of COX-2 improves cutaneous wound healing of pressure ulcers in mice through reduction of iNOS expression.** *Life sciences* 2016, **153**:82-92.
 253. Iwanaga K, Okada M, Murata T, Hori M, Ozaki H: **Prostaglandin E2 promotes wound-induced migration of intestinal subepithelial myofibroblasts via EP2, EP3, and EP4 prostanoid receptor activation.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2012, **340**(3):604-611.
 254. Muller-Decker K, Hirschner W, Marks F, Furstenberger G: **The effects of cyclooxygenase isozyme inhibition on incisional wound healing in mouse skin.** *The Journal of investigative dermatology* 2002, **119**(5):1189-1195.
 255. Honma Y, Arai I, Hashimoto Y, Futaki N, Sugimoto M, Tanaka M, Nakaike S: **Prostaglandin D2 and prostaglandin E2 accelerate the recovery of cutaneous barrier disruption induced by mechanical scratching in mice.** *European journal of pharmacology* 2005, **518**(1):56-62.
 256. Iwamoto S, Koga T, Ohba M, Okuno T, Koike M, Murakami A, Matsuda A, Yokomizo T: **Non-steroidal anti-inflammatory drug delays corneal wound**

- healing by reducing production of 12-hydroxyheptadecatrienoic acid, a ligand for leukotriene B4 receptor 2.** *Scientific reports* 2017, **7**(1):13267.
257. Lin JC, Rapuano CJ, Laibson PR, Eagle RC, Jr., Cohen EJ: **Corneal melting associated with use of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs after ocular surgery.** *Archives of ophthalmology* 2000, **118**(8):1129-1132.
258. Ahronowitz I, Fox L: **Severe drug-induced dermatoses.** *Seminars in cutaneous medicine and surgery* 2014, **33**(1):49-58.
259. Basavaraj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK: **The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis.** *International journal of dermatology* 2010, **49**(12):1351-1361.
260. Arasa J, Terencio MC, Andres RM, Marin-Castejon A, Valcuende-Cavero F, Paya M, Montesinos MC: **Defective Induction of COX-2 Expression by Psoriatic Fibroblasts Promotes Pro-inflammatory Activation of Macrophages.** *Frontiers in immunology* 2019, **10**:536.
261. Okamura M, Takano Y, Hiramatsu N, Hayakawa K, Yao J, Paton AW, Paton JC, Kitamura M: **Suppression of cytokine responses by indomethacin in podocytes: a mechanism through induction of unfolded protein response.** *American journal of physiology Renal physiology* 2008, **295**(5):F1495-1503.
262. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G: **Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2001, **15**(12):2057-2072.
263. Zhao J, Sharma Y, Agarwal R: **Significant inhibition by the flavonoid antioxidant silymarin against 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-caused modulation of antioxidant and inflammatory enzymes, and cyclooxygenase 2 and interleukin-1alpha expression in SENCAR mouse epidermis: implications in the prevention of stage I tumor promotion.** *Molecular carcinogenesis* 1999, **26**(4):321-333.
264. Chang L, Karin M: **Mammalian MAP kinase signalling cascades.** *Nature* 2001, **410**(6824):37-40.
265. Rajnochova Svobodova A, Gabrielova E, Ulrichova J, Zalesak B, Biedermann D, Vostalova J: **A pilot study of the UVA-photoprotective potential of dehydrosilybin, isosilybin, silychristin, and silydianin on human dermal fibroblasts.** *Archives of dermatological research* 2019, **311**(6):477-490.
266. Pyszkova M, Biler M, Biedermann D, Valentova K, Kuzma M, Vrba J, Ulrichova J, Sokolova R, Mojovic M, Popovic-Bijelic A *et al*: **Flavonolignan 2,3-dehydroderivatives: Preparation, antiradical and cytoprotective activity.** *Free radical biology & medicine* 2016, **90**:114-125.
267. Neub A, Houdek P, Ohnemus U, Moll I, Brandner JM: **Biphasic regulation of AP-1 subunits during human epidermal wound healing.** *The Journal of investigative dermatology* 2007, **127**(10):2453-2462.
268. Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K: **Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression.** *Journal of leukocyte biology* 1994, **56**(5):554-558.
269. Rennekampff HO, Hansbrough JF, Kiessig V, Dore C, Sticherling M, Schroder JM: **Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing.** *The Journal of surgical research* 2000, **93**(1):41-54.
270. Kutuk O, Poli G, Basaga H: **Resveratrol protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by blocking JNK and c-JUN/AP-1 signaling.** *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2006, **90**(1):120-132.
271. Bossy-Wetzell E, Bakiri L, Yaniv M: **Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun.** *The EMBO journal* 1997, **16**(7):1695-1709.

272. **NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2019/1390 ze dne 31. července 2019, kterým se přizpůsobuje technickému pokroku příloha nařízení (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH)** [Dostupné z: [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/pravni_predpisy_chemicke_latky_2012/\\$FILE/oer-narizeni_1390-20191017.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/pravni_predpisy_chemicke_latky_2012/$FILE/oer-narizeni_1390-20191017.pdf)]
273. Jung KM, Lee SH, Jang WH, Jung HS, Heo Y, Park YH, Bae S, Lim KM, Seok SH: **KeraSkin-VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2014, **28**(5):742-750.
274. Cornelissen LH, Bronneberg D, Bader DL, Baaijens FP, Oomens CW: **The transport profile of cytokines in epidermal equivalents subjected to mechanical loading.** *Annals of biomedical engineering* 2009, **37**(5):1007-1018.
275. Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF: **The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport.** *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2005, **60**(2):167-178.
276. Coquette A, Berna N, Vandenbosch A, Rosdy M, De Wever B, Poumay Y: **Analysis of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2003, **17**(3):311-321.
277. Alam H, Sehgal L, Kundu ST, Dalal SN, Vaidya MM: **Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells.** *Molecular biology of the cell* 2011, **22**(21):4068-4078.
278. Kosina P, Paloncyova M, Svobodova AR, Zalesak B, Biedermann D, Ulrichova J, Vostalova J: **Dermal Delivery of Selected Polyphenols from Silybum marianum. Theoretical and Experimental Study.** *Molecules* 2018, **24**(1).
279. Bianco C, Kezic S, Crosera M, Svetlicic V, Segota S, Maina G, Romano C, Larese F, Adami G: **In vitro percutaneous penetration and characterization of silver from silver-containing textiles.** *Int J Nanomedicine* 2015, **10**:1899-1908.
280. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S: **Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy.** *Rsc Adv* 2014, **4**(8):3974-3983.
281. Espinosa-Cristobal LF, Martinez-Castanon GA, Martinez-Martinez RE, Loyola-Rodriguez JP, Patino-Marin N, Reyes-Macias JF, Ruiz F: **Antibacterial effect of silver nanoparticles against Streptococcus mutans.** *Materials Letters* 2009, **63**(29):2603-2606.
282. Falconer JL, Grainger DW: **In vivo comparisons of silver nanoparticle and silver ion transport after intranasal delivery in mice.** *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2018, **269**:1-9.
283. Santoro CM, Duchsherer NL, Grainger DW: **Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles.** *Nanobiotechnology : the journal at the intersection of nanotechnology, molecular biology, and biomedical sciences* 2007, **3**(2):55-65.

284. Khan ST, Musarrat J, Al-Khedhairi AA: **Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: current status.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2016, **146**:70-83.
285. Sotiriou GA, Meyer A, Knijnenburg JT, Panke S, Pratsinis SE: **Quantifying the origin of released Ag⁺ ions from nanosilver.** *Langmuir* 2012, **28**(45):15929-15936.
286. Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G: **Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin.** *Toxicology* 2009, **255**(1-2):33-37.
287. Pluut OA, Bianco C, Jakasa I, Visser MJ, Krystek P, Larese-Filon F, Rustemeyer T, Kezic S: **Percutaneous penetration of silver from a silver containing garment in healthy volunteers and patients with atopic dermatitis.** *Toxicology letters* 2015, **235**(2):116-122.
288. Watkinson AC, Bunge AL, Hadgraft J, Lane ME: **Nanoparticles do not penetrate human skin--a theoretical perspective.** *Pharmaceutical research* 2013, **30**(8):1943-1946.
289. Baroli B, Ennas MG, Loffredo F, Isola M, Pinna R, López-Quintela MA: **Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin.** *Journal of Investigative Dermatology* 2007, **127**(7):1701-1712.
290. Franková J, Juráňová J, Kamarád V, Zálešák B, Ulrichová J: **Effect of AgNPs on the human reconstructed epidermis.** *Interdisciplinary Toxicology* 2018, **11**(4):289-293.
291. Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A: **Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review.** *Archives of toxicology* 2013, **87**(7):1181-1200.
292. Mehling A, Adriaens E, Casati S, Hubesch B, Irizar A, Klaric M, Letasiova S, Manou I, Muller BP, Roggen E *et al*: **In vitro RHE skin sensitisation assays: Applicability to challenging substances.** *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 2019, **108**:104473.
293. Pedrosa TDN, Catarino CM, Pennacchi PC, Assis SR, Gimenes F, Consolaro MEL, Barros SBM, Maria-Engler SS: **A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2017, **42**:31-37.
294. Welss T, Basketter DA, Schroder KR: **In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2004, **18**(3):231-243.
295. Hänel KH, Cornelissen C, Lüscher B, Baron JM: **Cytokines and the skin barrier.** *International journal of molecular sciences* 2013, **14**(4):6720-6745.
296. Kim H, Choi J, Lee H, Park J, Yoon B-I, Jin SM, Park K: **Skin corrosion and irritation test of nanoparticles using reconstructed three-dimensional human skin model, EpiDermTM.** *Toxicological research* 2016, **32**(4):311.
297. Alarcon EI, Udekwu KI, Noel CW, Gagnon LB-P, Taylor PK, Vulesevic B, Simpson MJ, Gkotzis S, Islam MM, Lee C-J: **Safety and efficacy of composite collagen–silver nanoparticle hydrogels as tissue engineering scaffolds.** *Nanoscale* 2015, **7**(44):18789-18798.
298. Wong KK, Cheung SO, Huang L, Niu J, Tao C, Ho CM, Che CM, Tam PK: **Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles.** *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery* 2009, **4**(7):1129-1135.

299. Naraginti S, Kumari PL, Das RK, Sivakumar A, Patil SH, Andhalkar VV: **Amelioration of excision wounds by topical application of green synthesized, formulated silver and gold nanoparticles in albino Wistar rats.** *Materials Science and Engineering: C* 2016, **62**:293-300.
300. Mohseni M, Shamloo A, Aghababaie Z, Afjoul H, Abdi S, Moravvej H, Vossoughi M: **A comparative study of wound dressings loaded with silver sulfadiazine and silver nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation.** *International journal of pharmaceutics* 2019, **564**:350-358.