

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



STUDIUM MATERIÁLŮ PRO HOJENÍ RAN
A REGENERACI KŮŽE

DISERTAČNÍ PRÁCE

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Nikola Ambrožová

STUDIUM MATERIÁLŮ PRO HOJENÍ RAN
A REGENERACI KŮŽE

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitelka: Ing. Adéla Galandáková, Ph.D.

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční (2012-2016) a kombinované (2016-2018) formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2012 – duben 2018.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s uvedením veškeré použité literatury. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne 14. 4. 2018

.....

Mgr. Nikola Ambrožová

Ráda bych poděkovala všem, díky kterým mohla vzniknout tato práce. Největší dík patří nepochybně mé školitelce Ing. Adéle Galandákové, PhD., která vše vedla a korigovala a naučila mě spoustě věcí. Velice si cením také toho, že i přes mateřské povinnosti, které jí během mého postgraduálního studia nastaly, si dokázala najít čas a mé doktorandské snažení se tak mohlo dotáhnout do zdárného konce. Nemohu zapomenout ani na pracovníky Ústavu lékařské chemie a biochemie, kteří pomáhali vytvářet dobré pracovní prostředí a poskytovali pomoc při řešení teoretických i praktických problémů. Jmenovitě pak Mgr. Veronice Tomšíčkové, PhD., která mi velmi pomáhala i co se týče formalit spojených se studiem a nezbytného odpočinku mezi experimenty a panu profesorovi MUDr., RNDr. Vilímu Šimánkovi, DrSc. za spoustu podnětů.

Dále bych ráda poděkovala:

MUDr. Kateřině Bogdanové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu LFUP za analýzu MIC nanoselenu u vybraných kmenů.

MUDr. Bohumilovi Zálešákovi, Ph.D. z Oddělení plastické a estetické chirurgie FNOL za poskytnutí biologického materiálu pro izolaci lidských kožních fibroblastů.

Mgr. Kateřině Čížkové, Ph.D. z Ústavu histologie a embryologie LFUP za provedení imunohistochemického barvení pro průkaz izolace lidských kožních fibroblastů a morfometrického stanovení.

Firmě Nanotrade s.r.o. za poskytnutí vzorků.

Pracovníkům Oddělení experimentální, diagnostické a speciální medicíny Univerzity v Boloni v Itálii, kde jsem se v rámci stáže naučila nové zajímavé metody a přístupy.

Závěrem ještě nesmím zapomenout poděkovat všem mým blízkým (i těm čtyřnohým) za podporu během celého studia.

Tato práce byla vypracována v rámci řešení projektů LF_2013_008, IGA_LF_2014_014, IGA_LF_2015_007, IGA_LF_2016_012, MPO FR-TI2/205, MSMT-LO 1304, CZ.1.07/2.2.00/28.0176 a Erasmus+.

SOUHRN

Kůže je největší orgán lidského těla zajišťující celou řadu funkcí. Důležitá je zejména její bariérová funkce neboli ochrana vnitřního prostředí těla před vnikem mikroorganismů, cizorodých látek či záření. Aby tato bariéra i další procesy probíhající v kůži správně fungovaly, je nezbytná její celistvost. Pokud dojde k poškození kůže, vzniká rána, jejíž hojení probíhá ve třech navazujících a vzájemně se prolínajících fázích. Během první zánětlivé fáze se zastavuje krvácení, stoupá teplota v tkáni a dochází k aktivaci obranné imunitní reakce. Následuje proliferační fáze, při které fibroblasty pomáhají ránu zacelit syntézou nových komponent extracelulární matrix, která je následně osídlena keratinocyty. V poslední remodelační fázi dochází k přeměně nově vytvořené tkáně z granulační na jizevnatou a ukončení hojivého procesu. Problematické jsou rány chronické, charakterizované dlouhou zánětlivou fází, jejichž výskyt narůstá společně se stárnutím populace. Tyto rány jsou nebezpečné nejen pro možnou infekci, ale i kvůli vyčerpávání organismu zdoluhavým hojivým procesem, případně léčbou samotnou. Proto je důležité hledat nové a inovovat již známé postupy léčby ran a regeneraci kůže.

První část předkládané disertační práce se zabývala studiem nanočástic stříbra (AgNPs) a iontového stříbra (Ag-I) s cílem prohloubit znalosti ve vztahu k procesu hojení ran. Různé formy stříbra jsou u hojení ran běžně využívány zejména pro antibakteriální a protizánětlivé účinky. Dlouhodobě je však diskutována jejich toxicita, proto je nezbytné studovat pozitivní i negativní účinky. Nejprve byla na buněčném modelu lidských kožních fibroblastů (HDF) stanovena toxicita AgNPs a Ag-I. Na základě výsledků byly vybrány netoxické koncentrace, u kterých byl na *in vitro* modelu pro studium hojení ran sledován vliv na morfologii buněk, markery oxidačního stresu, zánětu a buněčné ochrany, zarůstání rány a migraci buněk. Získané výsledky ukázaly, že AgNPs mají lepší vliv na hojení ran než Ag-I. Účinkem AgNPs došlo k aktivaci antioxidační dráhy Nrf2/HO-1, zvýšení hladiny chaperonového proteinu HSP90 a naopak ke snížení hladiny transkripčního faktoru NF- κ B a IL-6. Pozitivní vliv AgNPs na hojení ran byl potvrzen také rýhovým testem, tedy lepším zarůstáním narušené monovrstvy HDF. Působením Ag-I došlo ke zvýšení oxidačního stresu a negativní vliv na hojení ran byl rovněž prokázán rýhovým testem, neboť docházelo k horšímu zarůstání poškozené monovrstvy HDF.

Selen má výrazné antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální a antivirové účinky, rovněž stimuluje imunitní systém, a proto by mohl být vhodný pro urychlení hojení ran. Z tohoto důvodu byly v práci rovněž testovány nanočástice selenu (SeNPs). I v tomto případě

SOUHRN

nebyly opomenuty možné nežádoucí účinky. U SeNPs byl nejprve stanoven antimikrobiální účinek. Poté byla na modelu HDF stanovena toxicita. Na základě výsledků byly vybrány koncentrace, u kterých byl na *in vitro* modelu pro studium hojení ran sledován vliv na markery zánětu a buněčné ochrany a markery zapojené do procesu hojení ran. Výsledky prokázaly, že testované SeNPs mají antibakteriální a antimykotický účinek. Na *in vitro* modelu pro studium hojení ran bylo prokázáno, že SeNPs ovlivňují hladinu remodelačních proteinů MMP-2 a MMP-3 a antioxidačního proteinu HO-1. Při porovnání účinků AgNPs a SeNPs s ohledem na jejich zapojení do procesu hojení ran můžeme konstatovat, že účinek AgNPs je výraznější.

Další část disertační práce byla zaměřena na studium možnosti využití lidského séra (LS) od dárců různého věku (30-100 let) pro regenerativní medicínu. V současné době je LS používáno jen v menší míře pro tkáňové inženýrství a je předmětem zejména rejuvenačních studií. Na buněčném modelu HDF byl sledován vliv na životnost, proliferaci, buněčnou morfologii, buněčný cyklus, adhezi a markery zapojené do procesu stárnutí. V pilotní studii bylo potvrzeno, že HDF je možné kultivovat v médiu s přídavkem LS místo běžně používaného fetálního bovinního séra. U buněk kultivovaných v médiu s LS byla pozorována vyšší životnost a proliferace a tedy rychlejší dosažení konfluence. Dále bylo zjištěno, že v médiu s LS od 90 letých dárců rostly HDF lépe než v médiu s LS od dárců 30 letých. S ohledem na tyto výsledky je probíhající studium zaměřeno na detailní analýzu LS90 pro možný obsah rejuvenačních faktorů, které by mohly být využity v regenerativní medicíně, ale i hladinu hormonů, růstových faktorů či léčiv, které by rovněž mohly ovlivnit růst buněk.

Klíčová slova: fibroblasty, hojení ran, nanočástice stříbra, nanočástice selenu, iontové stříbro, lidské sérum, regenerace, senescence

SUMMARY

SUMMARY

The skin is the biggest organ of a human body that ensures a wide range of functions. Especially its barrier function is important, because it protects an internal body environment against an input of microorganisms, xenobiotics or radiation. The skin integrity is necessary for the right barrier function as well as other processes that take place in the skin. When the skin is damaged its healing occurs in three follow-up phases that mingle into each other. During the first inflammatory phase, the bleeding is stopped, a tissue temperature grows and a defensive immune reaction is activated. The next is the proliferation phase during which fibroblasts synthesize new extracellular matrix components that are colonized by keratinocytes in the process called reepitelization. In the last remodeling phase, a newly created granulation tissue is transformed to the scar tissue and the healing process finishes. Chronic wounds are characterized by the long inflammatory phase and are more common in higher age. These wounds are dangerous due to possible bacterial infection, enervation of organism by a long healing process and the treatment as well. Therefore, it is important to look for new and innovate types of wound healing and skin regeneration treatments in general.

The first part of the dissertation dealt with a study of silver nanoparticles (AgNPs) and ionic silver (Ag-I) in connection with the wound healing process. Various forms of silver have been commonly used for wounds treatment especially due to their antibacterial and anti-inflammatory effects. However, their toxicity has been discussed concurrently. That is why it is necessary to study their positive as well as negative effects. First of all, the toxicity of AgNPs and Ag-I was estimated on human dermal fibroblasts (HDF). Based on the results, the non-toxic concentrations were chosen for further studies on *in vitro* model for the wound healing estimation and the effects on cell morphology, oxidative stress, defensive and inflammatory markers, the overgrowing of the wound and cell migration were studied. The obtained results showed that AgNPs were more potent on wound healing compared to Ag-I. The results showed that AgNPs activated the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway, increased the level of chaperon protein HSP90 but on the other hand AgNPs decreased protein expression of the transcription factor NF- κ B and IL-6 level. The positive effect of AgNPs was also confirmed by the scratch assay - the scratched HDF monolayer overgrown better after the treatment with AgNPs. In the case of Ag-I, effects on the studied markers was not as potent as for AgNPs. Moreover, Ag-I increased oxidative stress

SUMMARY

and the negative effect on the wound healing was evident on the overgrowing of scratched HDF monolayer either.

Selenium has considerable antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, antibacterial and antiviral effects that could be beneficial in the wound healing. Therefore, we also tested selenium nanoparticles (SeNPs) to find out if they could be used for wound treatment. Even in this case, possible side effects should not be omitted. First of all, the antimicrobial effects of SeNPs were determined. Then the toxicity on HDF was estimated. Based on the results concentrations for evaluation of wound healing potential on in vitro model were chosen. SeNPs effects on defensive and inflammatory markers involved in the wound healing process were studied. Tested SeNPs showed antibacterial and antimycotic effects. It was proved on the *in vitro* wound healing model that SeNPs influence the expression of remodeling proteins MMP-2 and MMP-3 and the antioxidant protein HO-1. When effects of SeNPs are compared with AgNPs with respect to their involvement in the wound healing process, AgNPs influence the wound healing process more significantly.

The next part of the dissertation was focused on the study of the use of human serum (LS) from donors of various ages (30–100 years) for regenerative medicine. Currently LS is not used very often in tissue engineering and it is the subject of rejuvenation studies. The influence on the cell morphology, viability, proliferation, cell cycle, adhesion and markers involved in the aging were studied on HDF. A pilot study confirmed that HDF can be cultivated in medium supplemented with LS instead of the commonly used fetal bovine serum. In cells cultivated in the medium with LS, higher viability, proliferation and faster confluence were observed. Further, HDF grew better in the medium with LS from 90-year-old donors compared to the medium supplemented with LS from 30-year-old donors. In the view of these results, further ongoing studies focus on a detailed analysis of LS from 90-year-old donors, particularly on possible content of rejuvenation factors that could be used in the regenerative medicine as well as levels of hormones, growth factors and potential drugs that could also have an impact on the cell growth.

Key words: human dermal fibroblasts, wound healing, silver nanoparticles, selenium nanoparticles, ionic silver, human serum, regeneration, senescence

OBSAH

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY	3
2.1	Lidská kůže	3
2.2	Poranění kůže	6
2.2.1	Proces hojení	7
2.2.2	Chronické rány	9
2.2.3	Modely pro studium hojení ran	10
2.2.3.1	Modely <i>in vitro</i>	11
2.2.3.2	Modely <i>in vivo</i>	12
2.2.3.3	Modely <i>ex vivo</i>	13
2.2.3.4	Modely <i>in silico</i>	13
2.2.4	Markery pro hojení ran	13
2.2.4.1	Zánět	13
2.2.4.2	Oxidační a teplotní stres	15
2.2.4.3	Přestavba ECM	16
2.2.5	Podpora hojení ran	17
2.2.5.1	Nanočástice stříbra	18
2.2.5.2	Nanočástice selenu	20
2.2.5.3	Regenerativní medicína	21
3	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Biologický materiál	26
4.1.1	Primární kultura lidských kožních fibroblastů	26
4.1.2	Lidská séra	26
4.1.3	Mikroorganismy	26
4.2	Chemikálie, roztoky a přístroje	27
4.2.1	Nanočástice stříbra, iontové stříbro a nanočástice selenu	27
4.2.1.1	Příprava a charakterizace AgNPs	27
4.2.1.2	Příprava a charakterizace SeNPs	28
4.2.2	Chemikálie	29
4.2.3	Roztoky	31

OBSAH

4.2.4	Přístroje.....	34
4.2.5	Ostatní materiál.....	36
4.3	Metody.....	36
4.3.1	Izolace primárních kultur lidských kožních fibroblastů.....	36
4.3.2	Histologické ověření izolované kultury HDF.....	37
4.3.3	Studium zapojení AgNPs a Ag-I do procesu hojení ran.....	38
4.3.3.1	Stanovení nežádoucích účinků AgNPs a Ag-I na HDF.....	38
4.3.3.2	Experimentální model rány.....	40
4.3.4	Studium možného využití SeNPs k hojení ran.....	46
4.3.4.1	Stanovení antimikrobiálního účinku SeNPs.....	46
4.3.4.2	Stanovení nežádoucích účinků SeNPs.....	46
4.3.4.3	Experimentální model rány.....	47
4.3.5	Studium využití lidského séra pro regenerativní medicínu.....	47
4.3.5.1	Stanovení optimální koncentrace HDF pro experimenty s LS.....	48
4.3.5.2	Stanovení vlivu LS na morfologii a proliferaci HDF.....	48
4.3.5.3	Stanovení vlivu LS na životnost HDF.....	49
4.3.5.4	Stanovení vlivu LS na buněčný cyklus HDF.....	50
4.3.5.5	Stanovení vlivu LS na senescenci HDF.....	51
4.3.5.6	Stanovení vlivu LS na adhezi HDF.....	52
4.3.5.7	Stanovení mykoplazmat.....	52
4.3.6	Stanovení koncentrace proteinů.....	53
4.3.6.1	Metoda dle Bradfordové.....	53
4.3.6.2	Metoda BCA.....	54
4.3.7	Statistická analýza.....	54
5	VÝSLEDKY.....	55
5.1	Mikroskopická charakterizace HDF.....	55
5.2	Studium zapojení AgNPs a Ag-I do procesu hojení ran.....	55
5.2.1	Stanovení nežádoucích účinků AgNPs a Ag-I na HDF.....	55
5.2.1.1	Stanovení toxicity AgNPs a Ag-I.....	55
5.2.1.2	Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na produkci ROS.....	58
5.2.1.3	Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na markery zánětu.....	59
5.2.2	Experimentální model rány.....	61
5.2.2.1	Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na morfologii buněk.....	61
5.2.2.2	Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na hladinu ROS.....	64
5.2.2.3	Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na expresi obranných stresových markerů.....	65
5.2.2.4	Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na markery zánětu.....	69
5.2.2.5	Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na zarůstání rány a migraci buněk.....	72

OBSAH

5.3	Studium možného využití SeNPs k hojení ran	77
5.3.1	Stanovení antimikrobiálního účinku SeNPs.....	77
5.3.2	Stanovení nežádoucích účinků SeNPs	77
5.3.2.1	Stanovení toxicity SeNPs	77
5.3.2.2	Stanovení vlivu SeNPs na produkci ROS a markery zánětu	80
5.3.3	Experimentální model rány	81
5.3.3.1	Stanovení obranných stresových markerů.....	83
5.3.3.2	Stanovení markerů zánětu	85
5.3.3.3	Stanovení markerů zapojených do procesu hojení ran	86
5.4	Studium využití lidského séra pro regenerativní medicínu	88
5.4.1	Stanovení optimální koncentrace HDF pro experimenty s LS	88
5.4.2	Stanovení vlivu LS na morfologii a proliferaci HDF.....	88
5.4.3	Stanovení vlivu LS na životnost HDF	91
5.4.4	Stanovení vlivu LS na buněčný cyklus HDF	92
5.4.5	Stanovení vlivu LS na senescenci HDF	94
5.4.6	Stanovení vlivu LS na adhezi HDF.....	97
5.4.7	Vyloučení kontaminace mykoplazmaty	98
6	DISKUSE	99
6.1	Zapojení AgNPs a Ag-I do procesu hojení ran	99
6.2	Zapojení SeNPs do procesu hojení ran.....	106
6.3	Studium využití lidského séra (LS) pro regenerativní medicínu	112
7	ZÁVĚR.....	115
7.1	Studium vlivu nanočástic stříbra a selenu na hojení ran	115
7.2	Studium vlivu lidského séra na HDF	117
8	SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI	118
9	LITERATURA	120

SEZAM ZKRATEK

SEZAM ZKRATEK

Ag-I	iontové stříbro	LS30	lidské sérum od 30letých dárců
AgNPs	nanočástice stříbra	LS70	lidské sérum od 70letých dárců
β -gal	beta-galaktozidáza	LS90	lidské sérum od 90letých dárců
BSA	bovinní sérový albumin	LS100z	lidské sérum od 100letých dárců v dobrém fyzickém stavu
BrdU	bromdeoxyuridin	LS100n	lidské sérum od 100letých dárců ve špatném fyzickém stavu
COX-2	cyklooxygenáza-2	MIC	minimální inhibiční koncentrace
dd H ₂ O	deionizovaná voda	MMP	matrixová metaloproteináza
DMEM	Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyltetrazolium bromid
DMSO	dimethylsulfoxid	NF- κ B	jaderný faktor kappa B
ECM	extracelulární matrix	Nrf2	transkripční faktor Nrf2
EGF	epidermální růstový faktor	PBS	fyzilogický roztok upravený fosfátem na pH 7,4
ELISA	imunoenzymatické stanovení	PDGF	růstový faktor odvozený od destiček
FBS	fetální hovězí sérum	PI	propidium jodid
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc	PTH	parathyreoidální hormon
FGF	fibroblastový růstový faktor	ROS	reaktivní formy kyslíku
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů	SD	směrodatná odchylka
HDF	primární kultura lidských kožních fibroblastů	SeNPs	nanočástice selenu
HO-1	hemoxygenáza-1	TGF- β	transformující růstový faktor beta
HSP	protein teplotního šoku	TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
HSPB	člen genové rodiny B (malých) proteinů teplotního šoku	VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
IC ₅₀	koncentrace látky, při které je dosaženo 50% inhibice	X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactosid
IL	interleukin		
LFUP	Lékařská fakulta Univerzity Palackého		
LPS	lipopolysacharid		
LS	lidské sérum		

1 Úvod

Neporušená kožní bariéra je klíčová pro ochranu vnitřního prostředí lidského těla před vnikem mikroorganismů, cizorodých látek a záření. Zároveň umožňuje smyslové vnímání, termoregulaci a syntézu vitamínu D, vizualizaci lidských emocí a ovlivňuje psychický stav jedince. Pokud dojde k poškození kožního krytu, vzniká rána. Rány se mohou dělit podle mnoha kritérií, nejjednodušší je z hlediska délky hojení, kde rozlišujeme rány akutní (hojení trvá maximálně 6–8 týdnů) a chronické (hojení v řádu měsíců).

Chronické rány jsou velmi nebezpečné zejména kvůli možnému nasednutí infekce a jejího rozšíření do celého těla. Zdlouhavý proces hojení organismus vyčerpává, je bolestivý a pro pacienta nepříjemný i po psychické stránce, zejména je-li rána na viditelné části těla nebo omezuje-li ho v běžných aktivitách. V neposlední řadě se jedná i o významné zatížení zdravotnického systému, protože léčba chronických ran bývá nákladná jak z hlediska délky terapie, tak z hlediska používaného zdravotnického materiálu a léčiv.

Studie uvádějí, že během života se s chronickou ránou setká 1–2 % lidí. Vzhledem ke stárnutí světové populace lze předpokládat, že toto množství ještě poroste, protože výskyt nehojících se ran vysoce koreluje s věkem. Ohrožení jsou také pacienti s diabetem, u kterých bývají velmi časté defekty na nohou (vlivem diabetické neuropatie pacienti mnohdy necítí bolest a drobná ranka se může změnit na hluboký defekt a zvýšená glykemie vytváří ideální prostředí pro růst plísní). Samostatnou kapitolu pak tvoří imunokomprimovaní jedinci, kde je rizikové zejména mikrobiální osídlení rány. Z výše uvedeného vyplývá, že je důležité inovovat známé postupy a hledat nové látky, které mohou pozitivně ovlivňovat hojivý proces.

O inovaci můžeme mluvit např. u stříbra, které dnes zažívá svou renesanci. Přestože jeho antibakteriální a protizánětlivé účinky využíval již Hippokrates, s objevem antibiotik bylo odsunuto do pozadí. Vzhledem k významnému vzrůstu rezistence vůči antibiotikům se však stříbro vrací do popředí zájmu lékařů, a to zejména díky svému působení na různé procesy mikrobiálního metabolismu. Rezistence vůči stříbru vzniká jen velmi vzácně a je účinné i na multirezistentní bakteriální kmeny. Výhodná je i jeho nízká systémová toxicita. Vedle dusičnanu stříbrného a sulfadiazinu se dnes stále častěji využívají nanočástice stříbra. Jejich předností je, že mohou být tvořeny čistým stříbrem, což snižuje nežádoucí účinky pozorované u sloučenin stříbra. Díky velkému povrchu jsou reaktivní a snadněji se uvolňují ionty stříbra, které jsou nositeli antibakteriálních účinků. Přesto je potřeba sledovat nejen pozitivní vlastnosti, ale myslet i na možnou toxicitu a akumulaci. Před uvedením nového přípravku

ÚVOD

s obsahem nanostříbra je tedy nutné provést celou řadu *in vitro* a následně *in vivo* testů, aby se stanovila bezpečná dávka a délka použití.

Mezi další hojně využívané nanomateriály v současnosti patří nanočástice selenu. Selen je významný antioxidant, který zhasí volné radikály a chrání tak buňky před oxidačním poškozením. U nanočástic selenu byly prokázány také protizánětlivé, antibakteriální a antivirové účinky. Nejčastěji se však využívají protinádorové vlastnosti selenu, neboť působí např. stimulačně na imunitní systém. Vzhledem k výše uvedeným vlastnostem lze předpokládat, že by nanočástice selenu mohly najít nové uplatnění také při hojení ran.

Vedle exogenních látek se dnes v medicíně využívají také složky tělu vlastní, např. buňky, sérum nebo štěpy pro kožní transplantace, které jsou pacientem daleko lépe přijímány a riziko imunitní reakce a inkompatibility významně klesá. Zároveň při použití lidského séra (ideálně autologního) jako zdroje růstových faktorů, rostou buňky užité při transplantaci daleko lépe než při využití séra bovinního.

Disertační práce byla zaměřena na studium nanočástic stříbra a selenu s cílem prohloubit znalosti o jejich vlivu na proces hojení ran. Vedle možných nežádoucích účinků (cytotoxicita, produkce reaktivních forem kyslíku, sekrece prozánětlivých cytokinů) byl sledován vliv na významné markery procesu hojení ran. Další část práce se zabývala možným využitím lidského séra v regenerativní medicíně. Na buněčném modelu lidských kožních fibroblastů byl sledován vliv na životnost, proliferaci, buněčnou morfolonii, buněčný cyklus, adhezi a proces stárnutí.

2 Přehled současného stavu problematiky

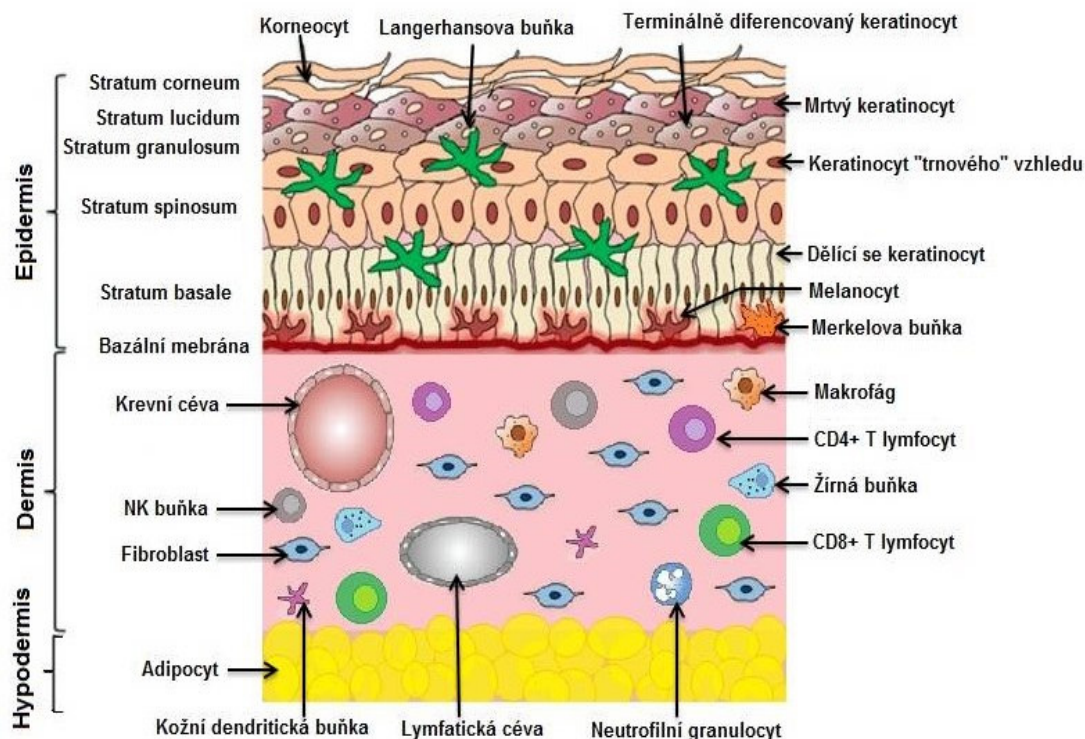
2.1 *Lidská kůže*

Kůže je největším a nejtěžším orgánem lidského těla. U dospělého člověka tvoří přibližně 15 – 20 % jeho celkové váhy [1, 2] a zaujímá plochu 1,5 – 2 m² [2, 3]. Je tvořena z několika vrstev a produkuje speciální struktury známé jako kožní adnexa, tedy vlasy, chlupy, nehty, potní, mazové a mléčné žlázy [1, 2, 4]. Zajišťuje celou řadu významných funkcí [2, 5], které se vzájemně prolínají a doplňují:

- **Ochranná:** bariéra mezi vnějším a vnitřním prostředím chrání tělo před vnikem mikroorganismů, cizorodých látek a UV zářením a to mechanicky (pevnost, pružnost, soudržnost; rohová vrstva), chemicky (kyselá sekrece) a biologicky (komezální mikroflóra)
- **Imunitní:** kůže se často dostává do kontaktu s antigeny zevního prostředí; významnou roli v kožních imunitních reakcích hrají Langerhansovy buňky
- **Termoregulační:** kůže pomocí kožních cév a potních žláz pomáhá udržovat tělesnou teplotu
- **Smyslová:** kůže zajišťuje hmatové vjemy díky nervovým zakončením s receptory reagujícími na chlad, teplo, doteky, tlak, vibrace, svědění či bolest (poranění) a zajišťuje tak adekvátní reakci na okolní prostředí
- **Metabolická:** v kůži vzniká ze steroidních prekurzorů vlivem UV záření majoritní množství vitamínu D; kůže se dále podílí na metabolismu sacharidů, tuků a bílkovin
- **Depotní:** v kůži je velká zásoba krve a glukózy, v podkožní vazivě je skladován tuk a na kolagenová vlákna je vázána voda
- **Sekreční funkce:** v kůži se nacházejí mazové a potní žlázy, které svými sekrety chrání kůži před mikroorganismy a zároveň se podílejí na vylučování cizorodých látek z těla, a melanocyty, které sekrecí melaninu zajišťují fotoprotektivní funkci
- **Resorpční:** zdravá kůže je schopna resorbovat malé množství látek rozpustných v tucích a absorbovat dýchací plyny (tato funkce však pro člověka nemá větší význam)

- **Psychosociální:** přes kůži se vizualizují lidské emoce (červenání, zblednutí), její vzhled zároveň ovlivňuje psychický stav jedince i chování okolí k němu

Tloušťka kůže kolísá v rozmezí 0,03 – 4 mm v závislosti na lokalizaci (nejtenčí je na očních víčkách, nejtlustší na zádech) [1, 2]. Základní anatomické členění (Obr. 1) zahrnuje epidermis (pokožku), dermis (škáru) a hypodermis (podkožní vazivo).



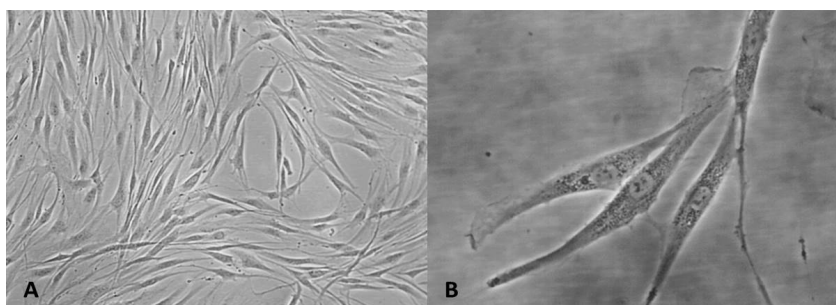
Obrázek 1. Struktura lidské kůže včetně vyskytujících se buněk (upraveno podle [6,7]).

Vlastní povrch těla tvoří rohovatějící vrstva **epidermis**. Je tvořena ze čtyř nebo pěti vrstev buněk. Majoritní zastoupení zde mají keratinocyty, které vznikají ve *Stratum basale* z epidermálních kmenových buněk, mají cylindrický tvar a mohou se dělit. Časem diferencují a migrují do vyšších vrstev. *Stratum spinosum* vytváří 2 – 5 vrstev keratinocytů, které jsou smršťené, proto se jim říká trnové nebo též ostnité buňky. Ve *Stratum granulosum* je možné pozorovat keratinocyty s výraznými granuly, která obsahují keratohyalin. Jedná se o terminálně diferencované keratinocyty. Výše se již nacházejí pouze mrtvé buňky. *Stratum lucidum*, která je u člověka patrná pouze v oblastech s výraznějším rohovatěním kůže, jako jsou dlaně a chodidla, je tvořena mrtvými keratinocyty, které ještě mají jádro. Naproti tomu *Stratum corneum* již

obsahuje mrtvé bezjaderné keratinocyty, které jsou kompletně keratinizované a říká se jim korneocyty. Vytvořením zrohovatělých buněk může epidermis plnit svou hlavní funkci, což je mechanicky i chemicky odolná, pro vodu téměř nepropustná difuzní bariéra [3]. Mezi další buňky zastoupené v epidermis patří dendritické antigen prezentující Langerhansovy buňky, melanocyty odpovědné za pigmentaci kůže a dotekové receptory Merkelovy buňky [3, 6, 7].

Dermis, která je oddělena od epidermis bazální membránou, zajišťuje odolnost kůže. Je protkána sítí kapilár, které díky prostupnosti bazální membrány vyživují také epidermis, konkrétně *Stratum basale*. Nachází se zde celá řada nervových zakončení umožňující smyslové vnímání hmatu a teploty, vlasové folikuly, potní a mazové žlázy [5]. Histologicky se skládá z vaziva protkaného kolagenními a elastickými vlákny. Vrchní část tvořena z řídkého vaziva se nazývá *Stratum papillare*. Z této vrstvy vystupují speciální kolagenová vlákna pojící epidermis k dermis. Spodní část *Stratum reticulare* je z neuspořádaného hustého vaziva tvořeného zejména kolagenem I [3]. Obrannou funkci zde zajišťuje celá řada buněk imunitního systému, jako jsou makrofágy, CD4+ a CD8+ T lymfocyty, NK buňky (natural killer), neutrofilní granulocyty, kožní dendritické buňky a žírné buňky [6, 7].

Základními buňkami vazivové tkáně jsou **fibroblasty** (Obr. 2). Jejich úkolem je řízení metabolismu mezibuněčné hmoty – extracelulární matrix (ECM). Podílejí se na syntéze a odbourávání kolagenu (zejména typu I a III), elastinu, glykosaminoglykanů, proteoglykanů a adhezních proteinů ECM [3]. Jejich činností vzniká také bazální membrána [5]. Tyto buňky mají vřetenovitý tvar (protáhlé tělo a dlouhé výběžky) a mohou diferencovat v další buňky pojivové tkáně, jako jsou osteoblasty/osteocyty, chondrocyty, adipocyty a myocyty hladké svaloviny [5].



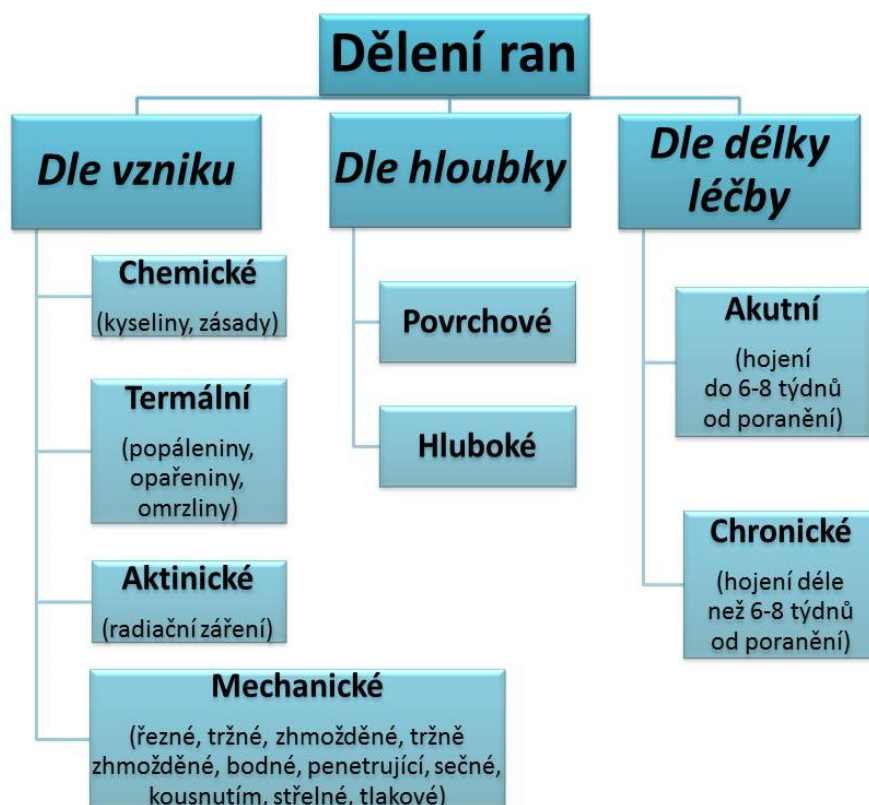
Obrázek 2. Lidské kožní fibroblasty. Zvětšeno (A) 10x, (B) 40x.

Nejspodnější vrstvou kůže je **hypodermis**, která je tvořena z řídkého vaziva. Na některých místech upevňuje kůži ke svalům nebo kostře. Toto připojení je volné a umožňuje volný pohyb kůže [3, 5]. Často obsahuje adipocyty, které napomáhají mechanickým a izolačním schopnostem kůže a zároveň jsou zásobárnou energie a vitamínů rozpustných v tucích [5].

2.2 Poranění kůže

Při poranění kůže dochází k porušení její integrity a tedy i celistvosti kožního krytu a vzniká rána, neboli kožní defekt [8]. Mezi typické projevy rány patří krvácení a bolest. Bolest má za úkol zajistit adekvátní ošetření poraněné oblasti, protože i u malé rány může při nesprávném ošetření dojít k závažné až fatální infekci. Obecně však představují nebezpečí rány, které jsou rozsáhlé nebo hluboké (riziko rychlého vykrvácení), případně rány, které se nehojí (riziko infekce, nekrózy tkáně až amputace) [9].

Rány můžeme dělit na základě mnoha kritérií. Jejich rozdělení podle vzniku, hloubky či délky léčby znázorňuje následující schéma (Obr. 3):



Obrázek 3. Rozdělení ran (upraveno podle [8]).

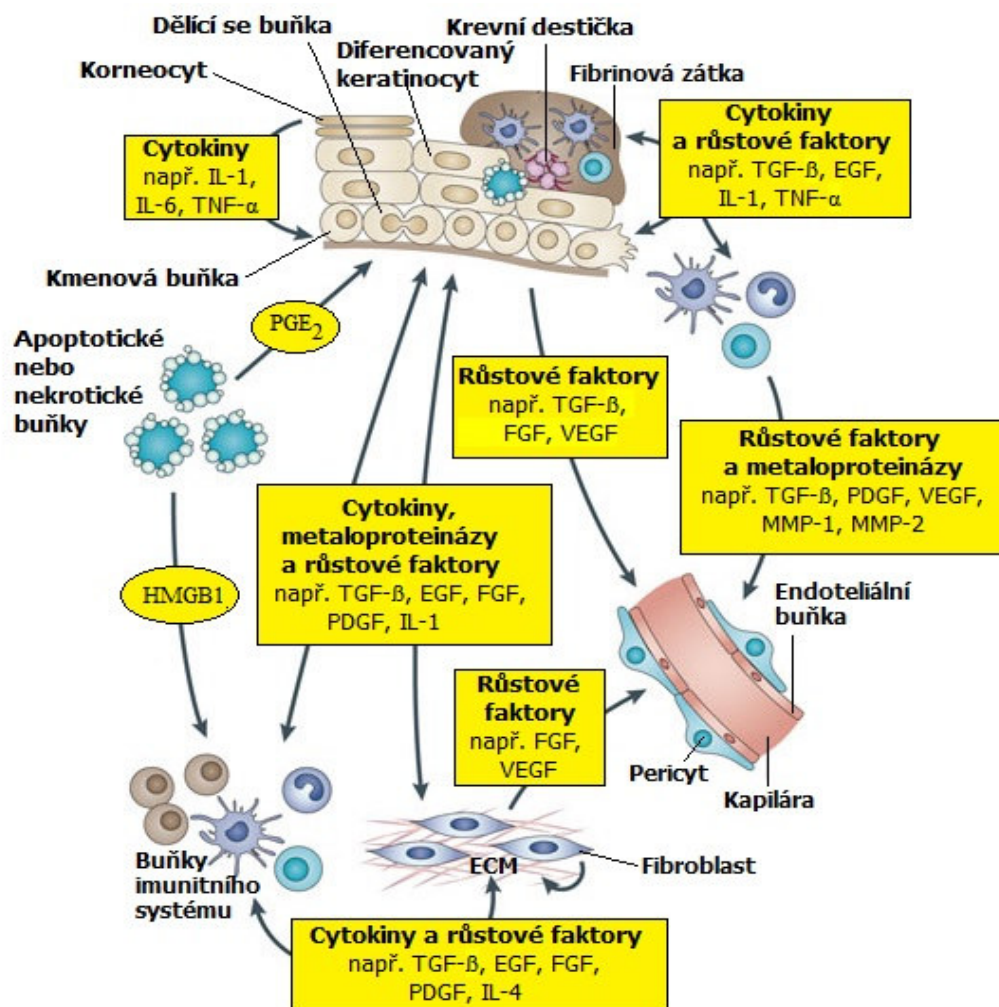
2.2.1 PROCES HOJENÍ

Hojení je obranný mechanismus reagující na porušení integrity kožního krytu, který se spouští v okamžiku, kdy k tomuto porušení dojde [8]. Rozlišuje se hojení ran primární a sekundární. Primární hojení představuje přirozený reparační proces, který se vyskytuje u zdravých jedinců, zatímco sekundární hojení bývá u ran s komplikacemi, jakou jsou infekce, zhoršený zdravotní stav, nutriční deficit nebo věk nad 65 let [8, 10, 11]. Sekundární hojení bývá provázeno tkáňovým deficitem, který musí být doplněn novotvorbou ztracené tkáně, což je zdoluhavý proces a výsledkem jsou jizvy. Vzhledem k délce reparace pak mluvíme o ráně chronické [8].

Proces hojení ran (Obr. 4) se skládá z několika fází, které na sebe plynule navazují a zároveň se prolínají [8]. Obvykle se dělí na tři fáze – zánětlivou, proliferační a remodelační. Někteří autoři ještě vyčleňují fázi hemostatickou [11], která se jinak řadí na začátek zánětlivé fáze nebo mezi zánětlivou a proliferační fázi zařazují fázi migrační [12].

Úkolem **zánětlivé fáze** je co nejrychleji zastavit krvácení, ránu co nejefektivněji vyčistit a připravit vhodné prostředí pro následující procesy [8]. Koagulum vzniklé z krevních destiček a fibrinových vláken slepuje okraje rány k sobě, zabraňuje ztrátám tekutin a zároveň vytváří bariéru proti vniknutí další infekce [10]. Zánětlivá fáze je charakterizována reakcemi řízenými cytokiny, chemokiny a růstovými faktory, které jsou produkovány buňkami migrujícími do oblasti rány (krevní destičky a buňky imunitního systému) [13]. Působky produkované prozánětlivými buňkami migrujícími do rány, mimo jiné, vedou ke zvýšení teploty v okolní tkáni [14]. Destičky uvolňují růstové faktory jako epidermální růstový faktor (EGF), růstový faktor odvozený od destiček (PDGF) a transformující růstový faktor β (TGF- β). Je aktivován komplement (složky C3 a C5) a další chemotaktické a opsonizační faktory, např. tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a interleukiny (IL-) IL-1, IL-4 a IL-6 [10, 15], což vede k následné infiltraci rány neutrofilními granulocyty [11], které se v ráně objevují přibližně po deseti minutách od jejího vzniku [10]. V tomto případě hovoříme o časném stádiu zánětlivé fáze, která trvá 1–2 dny od poranění. V pozdějším stádiu zánětlivé fáze (2.–3. den od poranění) se krevní monocyty diferencují na tkáňové makrofágy [11] a fagocytózou eliminují zaniklou tkáň a cizí tělesa [10]. Spolu s neutrofilny a dalšími buňkami v ráně secernují celou řadu růstových faktorů, např. TGF- β , PDGF, fibroblastový růstový faktor (FGF), vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), EGF

nebo faktor stimuluje kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), a tak je aktivována buněčná migrace, proliferace a diferenciace [11].



Obrázek 4. Hojení ran. *ECM* – extracelulární matrix; *EGF* – epidermální růstový faktor; *FGF* – fibroblastový růstový faktor; *HMGB1* – histon (*High-mobility group box 1*); *IL* – interleukin; *MMP* – matrixová metaloproteináza; *PDGF* – růstový faktor odvozený od destiček; *PGE₂* – prostaglandin *E₂*; *TGF-β* – transformující růstový faktor beta; *TNF-α* – tumor nekrotizující faktor alfa; *VEGF* – vaskulární endotelový růstový faktor; (upraveno podle [15]).

Proliferační fáze je charakteristická migrací fibroblastů do rány [10, 11], která je aktivována výše uvedenými růstovými faktory. Fibroblasty se objevují přibližně 2–4 dny od vzniku rány a o den později jsou následovány endotelovými buňkami [11]. Úkolem fibroblastů je, jak již bylo zmíněno, syntéza fibronektinů, kolagenových a jiných vláken, hyaluronanů a proteoglykanů, které formují novou ECM [10, 11].

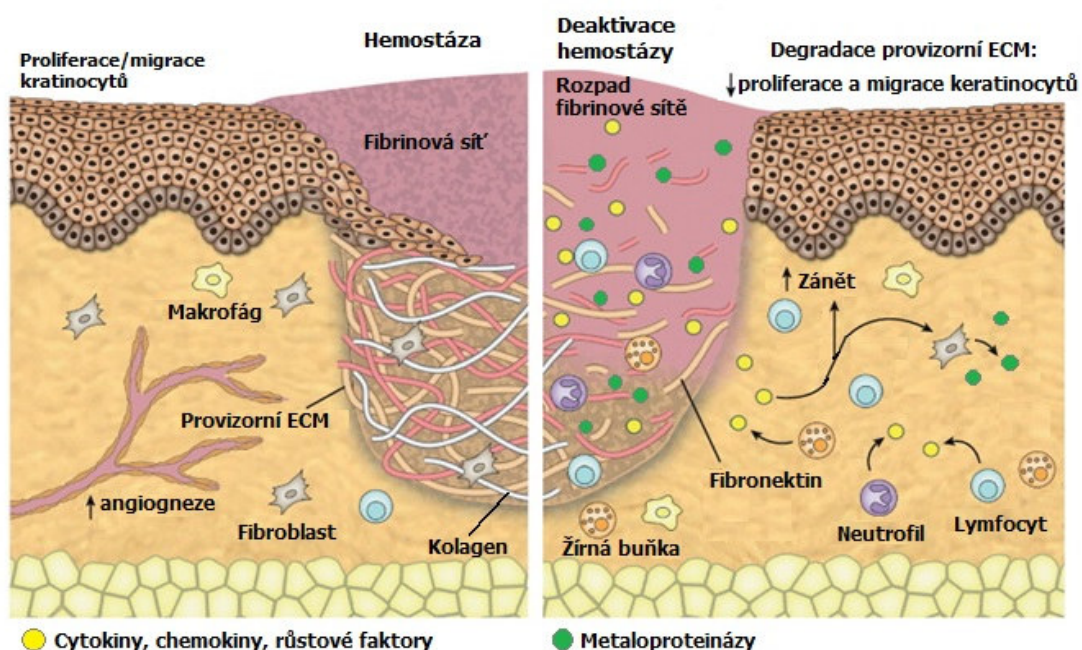
Zároveň z endotelových buněk vznikají nové kapiláry, které zabezpečují výživu [10, 16]. Nově vytvořená tkáň se nazývá granulační a je nezbytná pro správné hojení ran, protože re-epitelizace proliferujícími keratinocyty může začít až poté, co je celá poškozená oblast vyplněna a pokryta bazální membránou. Nová bazální membrána vzniká na povrchu granulační tkáně činností fibroblastů [5]. Epidermální proliferace je dále stimulována prostaglandinem E₂ (PGE₂), který uvolňuje apoptotické a nekrotické buňky v ráně. Tyto buňky také nepřímo secernují histon HMGB1, který aktivuje makrofágy a vyvolává další produkci cytokinů [15]. Proliferační fáze začíná přibližně 3. den po poranění a trvá 2–4 týdny [11].

Jako poslední nastává **fáze remodelační**. Začíná během prvního týdne od poranění [11, 16]. Během této fáze pokračuje syntéza ECM a zároveň dochází k její přestavbě, na níž se podílejí proteolytické enzymy matrixové metaloproteinázy (MMP), které jsou produkovány fibroblasty, makrofágy a neutrofilů v ráně [11]. Granulační tkáň se přeměňuje na jizevnatou [12], ze které se vytrácí voda a cévy [10]. Dále dozrávají kolagenní vlákna a myofibroblasty řídí kontrakci rány [10]. Nová kůže nikdy nedosahuje původní pevnosti, ačkoli proces zvyšování pevnosti může trvat až dva roky od poranění [10, 17]. To však již neovlivňuje funkčnost kůže jakožto bariéry, jejíž celistvost je u bezproblémových ran plně obnovena do 6–8 týdnů v závislosti na velikosti rány [8].

2.2.2 CHRONICKÉ RÁNY

Pro chronické (nehojící se) rány je typické, že jsou okraje příliš daleko od sebe, [17] případně vznikají v místech, která jsou troficky pozměněná (špatné prokrvení) nebo zde dochází k lokálnímu působení tlaku či záření [8]. Tyto rány se pak vyznačují prodloužením zánětlivé fáze, překrvením, exudací a celý jejich prostor je prosycen serózní tekutinou, která je vhodným prostředím pro růst bakterií, a proto bývají chronické rány často infikované. Infekce sama o sobě může způsobit vznik chronické rány. V ráně dlouhodobě zůstávají buňky imunitního systému a dochází k nerovnováze mezi růstovými faktory, chemokiny, cytokiny a proteázami [11, 18]. Nadprodukce růstových faktorů může vést až k přerůstání granulační tkáně přes okraje rány, což zastaví proces re-epitelizace. Zvýšené hladiny proteáz naopak rychle degradují kolagen a další vlákna ECM, což zpomaluje přeměnu na jizevnatou tkáň a v některých případech dochází až k úplnému rozpadu granulační tkáně. Rozkladné produkty navíc dále

podporují zánětlivou reakci v ráně [19]. Vzniká tak začarovaný kruh a hojení se opět prodlužuje. Porovnání hojení u akutní a chronické rány ukazuje Obr. 5.



Obrázek 5. Porovnání akutní – dobře se hojící (vlevo) a chronické – špatně se hojící (vpravo) rány. ECM – extracelulární matrix; (upraveno podle [18]).

Chronické rány jsou v současné době velkým problémem jak pro pacienty, kterým výrazně snižují kvalitu života, tak pro zdravotní systém, neboť jejich léčba je velmi nákladná. Uvádí se, že 1–2 % lidí má během svého života zkušenost s nehojící se ránou [20] a toto číslo bude dále narůstat vzhledem ke stárnutí populace v rozvinutých zemích [21]. Je prokázáno, že prevalence chronických ran vysoce koreluje s narůstajícím věkem [22]. Proto je velmi důležité problematiku ran studovat a hledat nové přístupy, které pozitivně ovlivňují hojení.

2.2.3 MODELÝ PRO STUDIUM HOJENÍ RAN

Problematika ran je velmi rozsáhlá. Jak již bylo uvedeno, obecně lze rány klasifikovat na základě jejich vzniku, hloubky a délky hojivého procesu, to však není vyčerpávající. Mezi chronické rány patří například bérkové vředy, které se podle etiologie dělí na diabetické, tlakové nebo ischemické [19].

Pro všechny základní typy ran, stejně jako pro podmínky, které je mohou dále ovlivňovat (diabetes mellitus [23, 24], transplantace [25], kožní štěpy u terapie popálenin [26], cizí tělesa v ráně [27] a stresové situace [28]) existují speciální modely pro jejich studium. Podle uspořádání experimentu lze modely rozdělit do čtyř hlavních skupin: *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* a *in silico*.

2.2.3.1 Modely *in vitro*

In vitro modely pro hojení ran vycházejí z různých typů primárních buněk nebo buněčných linií. Tyto buňky mohou být jak lidské, tak zvířecí. Nejčastěji se jedná o epidermální keratinocyty a fibroblasty. Pro komplexnější modely lze použít i další buňky, které se vyskytují v kůži, jako jsou endotelové buňky, makrofágy [27], melanocyty nebo Langerhansovy buňky [29, 30]. Primární kultury lidských keratinocytů, fibroblastů a melanocytů lze kultivovat z kožních štěpů získaných od dobrovolných dárců buď přímo pro vědecké účely nebo při plastických operacích jako je obřízka či zmenšování prsou [31]. Primární endotelové buňky se nejčastěji izolují z pupečníku nebo předkožky [32]. Makrofágy se získávají diferenciací krevních monocytů [33] a Langerhansovy buňky ze subpopulace dendritických buněk z CD34+ hematopoetických progenitorů pomocí GM-CSF a TNF- α [30]. Z imortalizovaných buněčných linií se velmi často používají lidské keratinocyty HaCaT [34, 35] a myši fibroblasty Balb/3T3 nebo makrofágy RAW264.7 [36].

Jednou z nejběžnějších a nejjednodušších metod pro studium hojení ran v rámci *in vitro* experimentů je rýhový test („scratch assay“). Metoda je založena na skutečnosti, že po vytvoření rýhy v konfluentní monovrstvě buněk začnou buňky z okrajů rýhy migrovat směrem do rýhy, dokud se opět nevytvoří nové mezibuněčné kontakty. Vliv studované látky na migraci a proliferaci buněk je možné vyhodnotit jednoduchým porovnáním s kontrolou nebo vyfocením a změřením šířky rýhy ihned po jejím vytvoření a následně po uplynutí experimentu [37]. Další možností je stanovení specifických markerů v médiu nebo buňkách [38]. Přidáním dalších faktorů, jako je např. zahřátí, lze základní metodu dále modifikovat [39].

V současné době je snaha o vytvoření buněčných modelů, které by co nejlépe odpovídaly struktuře lidské kůže. Vznikají proto jednoduché ko-kultury buněk, ale i složité 3D konstrukty využívající pro buňky speciální nosiče (inserty), aby se co nejvíce přiblížily vrstvám v kůži. Nosiče mohou být z hydrogelů [40],

kolagenových matric, lyofilizovaných membrán inertních filtrů nebo z dermis získané po odstranění epidermis [41].

Výhodou *in vitro* modelů je jejich cena (jsou relativně levné), jednoduchost a méně přísná pravidla pro získání povolení etické komise. Využitím stejných buněk pro všechny experimenty je vyloučena inherentní heterogenita a správnou laboratorní praxí měnící se vlivy prostředí [27], stejně jako vliv zbytku organismu [29]. Problémem však je extrapolace výsledků z *in vitro* modelů na celý organismus [27].

2.2.3.2 Modely *in vivo*

In vivo modely pro studium hojení ran jsou náročnější na provedení, dražší a musí splňovat přísná kritéria pro udělení souhlasu etické komise. Nicméně jejich výsledky, přinášející holistický pohled na danou problematiku, jsou u studovaného organismu mnohdy nenahraditelné [27]. Bylo zjištěno, že někdy může mít stejný faktor jiný účinek *in vitro* a *in vivo*, např. u TGF- β byla pozorována *in vitro* inhibice proliferace monovrstvy endotelových buněk zatímco *in vivo* podpora angiogeneze. Jako jedno z vysvětlení se uvádí, že TGF- β v organismu ovlivňuje makrofágy, které následně produkují pro-angiogenní faktory, zatímco *in vitro* k tomuto efektu nedochází [42].

In vivo modely mohou být zvířecí a lidské, přičemž zvířecí jsou častější, protože u lidí mohou být vytvořeny pouze malé a čisté rány [27]. Velkou výhodou lidských modelů je, že testovaná osoba může vyhodnotit bolestivost, depresivní symptomy [43] a psychický stres [28], které mohou negativně ovlivnit proces hojení.

Ze zvířat se nejčastěji využívají savci, konkrétně krysy, myši, prasata a králíci [27]. Je velice důležité vybrat pro každý experiment správný model, aby byla následná extrapolace na člověka co nejpřesnější. Pro podmínky zhoršeného hojení, ke kterému dochází např. u diabetes mellitus nebo u obézních jedinců stejně jako pro další patologické stavy, existují speciální modely [23, 27]. Musí být dodržena správná laboratorní praxe. Před vlastním experimentem je nutno nechat zvířata aklimatizovat a rány vytvářet v celkové anestezii [44]. Na základě platné legislativy Evropské Unie, Izraele, Indie a Státu São Paulo v Brazílii je možné provádět testování na zvířatech pouze pro léčebné účely, v žádném případě nelze testovat kosmetiku [45].

2.2.3.3 Modely *ex vivo*

Mezi přístupy *in vitro* a *in vivo* stojí experimenty *ex vivo*. Kožní explantáty mohou být získány od živých a mrtvých zvířat nebo lidí, ale byť odběr z živých jedinců (např. při plastických operacích) umožňuje zabránit posmrtným změnám. Na explantátech lze použít speciální metody pro testování síly zahojené tkáně [46], pro studium transdermálního transportu nebo pro sledování růstu cév a jejich permeability v průběhu hojení [47].

2.2.3.4 Modely *in silico*

Vzhledem k neustále narůstajícímu množství informací o hojení ran je tvorba teoretických modelů velmi složitá a v praxi se tyto modely příliš nepoužívají. Přesto existují modely pro různé markery, buňky či jednotlivé fáze procesu hojení ran stejně jako modely pro akutní a chronické rány [48, 49]. Bylo zjištěno, že všechny chronické rány mají pozoruhodně shodné signální dráhy v procesu hojení a také podobný zánětlivý profil [19]. Matematické modely mohou na základě zadaných dat napomoci k odhalení příčiny špatného hojení [48].

2.2.4 MARKERY PRO HOJENÍ RAN

Zatímco v klinické praxi se pro hodnocení hojení ran využívá zejména morfologická charakterizace případně mikrobiologické stěry, ve vědeckých studiích bývají často stanovovány specifické markery ovlivňující reparační procesy v kůži. Do každé fáze hojení ran je jich zapojena celá řada, přičemž mnohé mohou působit ve více fázích, případně po celou dobu hojení. Výběr vhodných markerů proto není jednoduchý a měl by odrážet očekávané účinky studovaného vlivu. Je-li testována nová látka, vždy se musí začít stanovením možné cytotoxicity a jiných nežádoucích účinků, jako je aktivace zánětu, oxidačního či jiného stresu. Důležitým parametrem jsou také faktory ovlivňující přestavbu ECM, která je klíčová pro konečné zhojení rány.

2.2.4.1 Zánět

Zánětlivých mediátorů existuje v těle celá řada. V současné době je často studovaný nukleární faktor kappa B (**NF- κ B**), který ovlivňuje expresi genů, jejichž produkty jsou zapojeny do zánětlivé reakce a odpovědi na oxidační stres (cyklooxygenáza-2 (COX-2), protein teplotního šoku (HSP) 90-a, indukibilní NO-syntáza (iNOS),

superoxiddismutáza (SOD) 1 a SOD2), diferenciaci (např. IL-2, IL-6) proliferaci (např. GM-CSF, PDGF řetězec β), apoptózu (např. Bax, Bcl-2, kaspáza-1) a buněčnou adhezi (např. CD44, fibronectin) [50]. Jeho exprese je aktivována v rámci vrozené imunitní reakce téměř ve všech buňkách s cílem zabránit bakteriální infekci po poranění [51]. Za fyziologických podmínek je vázán v cytoplasmě na své inhibiční proteiny I κ B, které jsou však v prostředí buněčného stresu (např. v přítomnosti ROS) odbourávány. Uvolněný NF- κ B se přesouvá do jádra, kde po vazbě na DNA aktivuje/inhibuje expresi výše uvedených genů [50, 52]. Výsledkem je produkce celé řady chemokinů, cytokinů, enzymů, adhezních molekul a inhibitorů apoptózy, jako jsou IL-1 β , IL-6 a IL-8, iNOS a COX-2 [52]. Tyto účinky jsou důležité pro odpověď na poškození organismu, ovšem jeho dlouhodobá exprese může způsobit chronický zánět [53].

Během zánětlivé fáze je výrazně zvýšen také **IL-6**. K jeho expresi dochází zejména u polymorfonukleárních leukocytů a makrofágů [54]. V prostředí kožní rány zajišťují jeho produkci keratinocyty, pro které má funkci mitogenu [54, 55], což je důležité pro re-epitelizaci. Nadprodukce IL-6 je spojována s chronickým zánětem, vznikem jizev [56] a mnoha patologickými stavy kůže, jako jsou psoriáza, skleroderma a systémový lupus erythematosus [55]. Na druhou stranu jeho nedostatek vede k nekvalitnímu hojení ran charakterizovanému výrazně zpožděnou re-epitelizací [54-56].

Další důležitý marker zánětu je **COX-2**, jejíž syntéza je indukována počínajícím zánětem u buněk zapojených v této odpovědi, jako jsou makrofágy, fibroblasty a endotelové buňky [57]. Sama COX-2 následně svými produkty – metabolity kyseliny arachidonové – zánět dále rozvíjí. Dochází ke zvýšení tělesné teploty (lokální nebo celkové), permeability cév, vazodilataci a aktivaci nociceptorů [58]. Tyto metabolity – prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany však nelze příliš dobře stanovit z důvodu rychlého odbourávání – např. prostaglandin E₂ je v krevní cirkulaci odbourán již po 30 s [59]. Naproti tomu biologický poločas COX-2 je asi 3,5 – 8 hodin [60].

Zvýšená exprese těchto i dalších prozánětlivých proteinů může vést k nadměrné zánětlivé odpovědi, která výrazně zhoršuje hojení ran. U nehojících se ran často dochází k chronickému zánětu, který v některých případech způsobí až nádorovou transformaci [61]. Na druhou stranu nedostatečná zánětlivá reakce ohrožuje poraněného špatnou obranou reakcí [56] s následnou bakteriální infekcí a může opět směřovat k chronické ráně. Proto je při hodnocení experimentu nutno přihlídnout k případnému využití studované látky/vlivu v klinické praxi.

2.2.4.2 Oxidační a teplotní stres

Všechny živé organismy jsou neustále vystaveny stresu z okolního prostředí. Stres může být způsoben teplotním, oxidačním nebo hypoxickým šokem, nedostatkem živin a poškozením DNA. Pro přežití je nezbytné na tento stres adekvátně reagovat [62]. Stresové prostředí se vytváří i při fyziologickém hojení ran. Buňky na okrajích léze jsou dehydratovány a vystaveny kyslíku v důsledku poškození epiteliální bariéry. Vznik krevní zátky blokuje přístup živin, a proto dochází k aktivaci anaerobní glykolýzy a produkovaný laktát snižuje pH až na 6,8. Makrofágy a neutrofilny produkují celou řadu zánětlivých mediátorů, cytokinů a růstových faktorů, které také vyvolávají stresovou odpověď buňky [63]. Přestože mírná stresová zátěž (hormeze) má na hojení ran pozitivní vliv [64], nedostatečná reakce na ni může vést k dlouhodobému až fatálnímu poškození buněk, a tak výrazně zpomalit tento proces [65].

Oxidační stres vzniká v důsledku nerovnováhy mezi tvorbou a odbouráváním ROS. Ty jsou tvořeny v rámci buněčného metabolismu a ve zvýšeném množství také jako obranná reakce proti mikroorganismům, kdy jsou produkovány leukocyty. Během hojení ran oxidační stres aktivuje již uvedený transkripční faktor **NF-κB**, který se svými prozánětlivými účinky podílí na tvorbě dalších ROS, jakožto vrozené obrané reakci [51]. Déle trvající akumulace ROS vede k vážnému poškození buňky včetně možné nádorové transformace [66]. Klíčovým regulátorem odpovědi na oxidační stres v mnoha tkáních a orgánech včetně kůže je transkripční faktor **Nrf2**. Za fyziologického stavu je vázán v cytoplazmě pomocí Keap-1 proteinu, což umožňuje jeho ubikvitinaci a následnou proteozomální degradaci [66, 67]. V buňkách vystavených stresu však dochází k uvolnění Nrf2 z vazby na Keap-1 a jeho translokaci do jádra [66, 68-70]. Zde dochází k heterodimerizaci s malými Maf proteiny [67] a vazbě na promotorové oblasti genů, které kódují mnoho antioxidantních enzymů a enzymů druhé fáze detoxikace, jako jsou hemoxygenáza-1 (HO-1), glutathionperoxidáza, glutathion-S-transferáza, glutamátcystein ligáza, NAD(P)H-chinonoxidoreduktáza a peroxiredoxin I. Všechny tyto enzymy jsou velmi důležité pro stresovou odpověď buňky, protože umožňují odstranit cytotoxické elektrofilny a ROS [71]. K expresi Nrf2 dochází zejména v makrofázích

a keratinocytech, které se vyskytují v hyperproliferujícím epitelu rány. Jeho velký význam pro hojení ran byl potvrzen v rámci studie na knock-outovaných zvířatech, u kterých byla pozorována prodloužená zánětlivá reakce [69] a tak zhoršené hojení.

Enzym **HO-1**, jeden z antioxidantních proteinů regulovaných Nrf2, bývá zvýšený působením různých stimulů zahrnujících prozánětlivé cytokiny, těžké kovy, hypoxii a oxidační činidla. Jeho hlavním úkolem je katalýza degradace pro-oxidačního hemu za vzniku volného železa, oxidu uhelnatého a biliverdinu, který je následně konvertován na bilirubin. Takto vzniklý oxid uhelnatý a bilirubin mají v nižších koncentracích silný antioxidantní a protizánětlivý účinek [72].

O **teplotním šoku** hovoříme, pokud se buňky nacházejí v prostředí s teplotou nižší než 32 °C (studený) nebo vyšší než 42-43 °C (tepelný) [73]. Buněčnou odpovědí na zvýšenou teplotu je aktivace HSP proteinů, které ale chrání buňky i proti metabolickým výkyvům (např. extrémnímu pH nebo těžkým kovům) [74]. Ve vztahu k hojení ran moduluje zánět, buněčnou proliferaci, migraci a syntézu kolagenu [75]. Podle velikosti, která se pohybuje přibližně mezi 15 – 110 kDa, a funkce se rozděluje do několika skupin. Mezi tzv. malé HSP patří např. **HSP27**, který má anti-apoptické účinky, stabilizuje mikrofilamenta a napomáhá termotoleranci nebo **HSP32**, což je jiný název pro již zmíněnou HO-1. Lépe prostudované jsou potom HSP o vyšší molekulové hmotnosti, jako jsou **HSP70** a **HSP90** s chaperonovou a anti-apoptickou funkcí [74].

2.2.4.3 Přestavba ECM

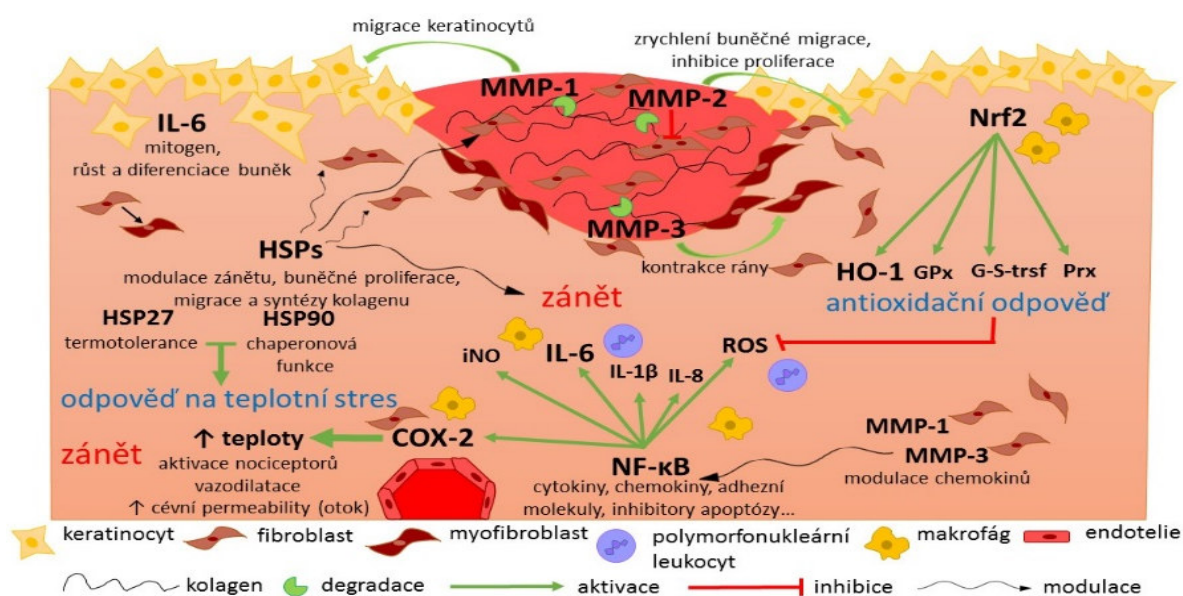
Jak již bylo zmíněno, remodelace, tedy přestavba ECM s odbouráním provizorní matrix [76], je poslední fází hojení ran, na které se výrazně podílejí MMP. Ty jsou však sekretovány fibroblasty, keratinocyty a zánětlivými buňkami (makrofágy a endotelovými buňkami) po celou dobu hojení [76] a zapojují se i do aktivace růstových faktorů, morfogeneze, angiogeneze nebo signalizace mezi buňkami a buňkami a ECM [76-78]. Jejich nepřítomnost vede k narušení hojení ran. Na druhou stranu i jejich zvýšená exprese může negativně ovlivnit hojení ran, případně vést až k poškození zdravé okolní tkáně [76]. V současné době existuje asi 27 typů MMP a dělí se do sedmi skupin na základě substrátu, který preferenčně štěpí [77]. Během hojení ran mají důležitou roli zejména kolagenázy, želatinázy a stromelyziny [76].

MMP-1 (kolagenáza-1) iniciuje degradaci ECM rozvolněním trojšroubovicové struktury kolagenu, čímž se stává dostupným pro konečné štěpení želatinázami a MMP-3 [76]. Je důležitá pro migraci keratinocytů. Během remodelační fáze hojení ran dochází k její maximální expresi, zatímco po dokončení re-epitelizace je již nedetekovatelná. Tato down-regulace je velmi důležitá, protože její nadměrná produkce může re-epitelizaci zpožďovat [77].

MMP-2 (želatináza A) zastupuje druhou skupinu MMP. Její exprese je významně vyšší u fibroblastů ve srovnání s keratinocyty [76]. Kromě želatiny štěpí také různé typy kolagenu, laminin, agrekan a fibronektin a přispívá tak ke zrychlení buněčné migrace [77]. Na rozdíl od většiny ostatních MMP se předpokládá, že by společně s MMP-9 mohla mít inhibiční účinek na buněčnou proliferaci [78].

MMP-3 (stromelyzin-1) vedle štěpení ECM ovlivňuje i kontrakci rány [77]. Je sekretována zejména fibroblasty [76]. Společně s MMP-1 patří mezi MMP k hlavním regulátorům chemokinů [77]. Její nedostatek zpomaluje hojení ran díky nedostatečné kontrakci. Plochy rány je tak větší a epitelální buňky musí urazit větší vzdálenost [78].

Zapojení výše uvedených markerů do jednotlivých procesů při hojení ran ukazuje Obr. 6.



Obrázek 6. Vybrané markery a jejich zapojení do jednotlivých procesů při hojení ran. *COX-2* – cyklooxygenáza-2; *GPx* – glutationperoxidáza; *G-S-trsf* – glutation-S-transferáza; *HO-1* – hemoxygenáza-1; *HPS* – protein teplotního šoku; *IL* – interleukin; *iNOS* – inducibilní *NO*-syntáza; *MMP* – matrixová metaloproteináza; *NF-κB* – jaderný faktor kappa B; *Nrf2* – transkripční faktor *Nrf2*; *Prx* – peroxiredoxin I; *ROS* – reaktivní formy kyslíku.

2.2.5 PODPORA HOJENÍ RAN

Jak již bylo uvedeno, zejména chronické rány výrazně snižují kvalitu života. Dlouhodobý boj s infekcí navíc vede k selekci rezistentních kmenů a snižování účinnosti antibiotik a antimykotik [79]. Proto je velmi důležité objevovat nové přístupy

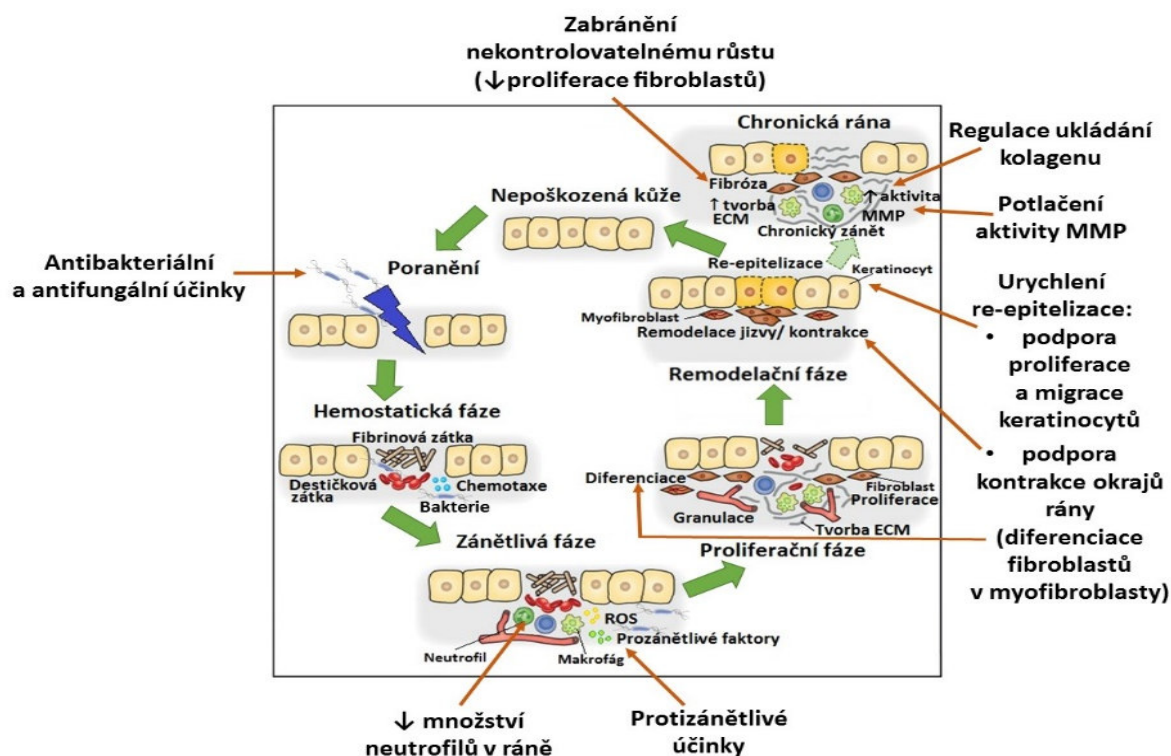
pro hojení ran a hledat látky, které nejen podporují hojení, ale mají také antimikrobiální účinky. Hojně využívané jsou dnes různé nanomateriály. Na druhé straně je snaha přizpůsobit terapii co nejvíce konkrétnímu pacientovi (tzv. personalizovaná medicína), což vede k využívání autologních materiálů, jako jsou buňky nebo sérum.

2.2.5.1 Nanočástice stříbra

Stříbro jako takové bylo využíváno v medicíně již před naším letopočtem pro své antibakteriální, antifungální a protizánětlivé účinky. Sám Hippokrates používal stříbro při léčbě vředů a k podpoře hojení ran [80]. Vzhledem k narůstající rezistenci bakterií proti antibiotikům se stříbro s nízkou systémovou toxicitou, jehož antibakteriální působení zůstává účinné i na multirezistentní mikroorganismy, dostává opět do popředí zájmu lékařů. Důvodem vzácného výskytu bakterií rezistentních k účinkům stříbra je pravděpodobně fakt, že stříbro působí na více místech bakteriálního metabolismu současně. Ionty stříbra způsobují zvýšenou propustnost membrán a dopravu substrátu v nich, ztrátu hybné síly protonů, ovlivňují látkovou výměnu, potlačují dýchání a bazální metabolismus a brání replikaci DNA [81]. Reakcí s thiolovými skupinami proteinů inaktivují bakteriální enzymy a také uvolňují ROS, které jsou pro bakterie toxické [82]. U hojení ran se využívají rovněž protizánětlivé účinky, snížení množství neutrofilů v ráně, potlačení aktivity MMP (zvýšená aktivita může vést k deaktivaci růstových faktorů a stagnaci hojení) a urychlení re-epitelizace [79]. Vedle dusičnanu stříbrného a sulfadiazinu, které se aplikují topicky, se dnes stále častěji využívají nanočástice stříbra (AgNPs). Jejich předností je, že mohou být tvořeny čistým stříbrem, což snižuje nežádoucí účinky pozorované u stříbrných sloučenin. Dále jsou díky velkému povrchu hodně reaktivní a snáz uvolňují stříbrné ionty, které jsou nositeli antibakteriálních účinků [83].

Bylo prokázáno, že aplikace AgNPs na řezné rány a popáleniny vedla u myši k lepšímu hojení díky zrychlení re-epitelizace a rychlejší kontrakci rány. Dále byly pozorovány zlepšené tahové vlastnosti nové kůže regulací ukládání kolagenu a zabráněním nekontrolovaného růstu [84]. Pozitivní účinky byly pozorovány i u ran bez zánětlivé složky či infekce což potvrzuje, že AgNPs ovlivňují proces hojení přímo, pravděpodobně modulací cytokinů. AgNPs dále zrychlují uzavírání ran podporou proliferace a migrace keratinocytů a diferenciací fibroblastů v myofibroblasty. Současně dochází ke snížení proliferace fibroblastů, což předchází tvorbě jizev

a keloidů – nadměrně rostoucí jizevnatá tkáň [85]. Vliv AgNPs na hojení ran ukazuje Obr. 7.



Obrázek 7. Pozitivní účinky AgNPs na hojení ran. *ECM* – extracelulární matrix; *MMP* – matrixové metaloproteinázy; *ROS* – reaktivní formy kyslíku; (upraveno podle [86]).

I přes pozitivní vliv AgNPs na hojení ran však nesmíme zapomínat na možné nežádoucí účinky, a to jak na lidské zdraví, tak na životní prostředí. Vzhledem k širokému spektru využití AgNPs (krytí na rány, kosmetika, oděvy, potrubí, barvy atd.) a možnému riziku se mnoho vědeckých skupin zabývá studiem cytotoxicity AgNPs [72, 87-91]. Bylo zjištěno, že AgNPs mohou způsobovat buněčnou smrt nejen u bakteriálních buněk pravděpodobně generací ROS [72, 88, 90]. Přesný mechanismus cytotoxického účinku AgNPs není zatím uspokojivě vysvětlen. Podle jedné z teorií mají AgNPs schopnost přilnout k buněčné stěně a následně jí penetrovat, což vede ke strukturálním změnám buněčné membrány. Vzniká tak prohlubeň na povrchu buňky, kde se nanočástice akumulují, dochází ke změně permeability buněčné membrány a následné smrti buňky. Jako další mechanismus možného poškození buněčné membrány se uvádí vznik volných radikálů, které v ní vytvoří póry neslučitelné

s fungováním buňky. Předpokládá se i to, že by AgNPs mohly uvolňovat ionty stříbra, které by interagovaly s thiolovými skupinami mnoha životně důležitých enzymů a tak je inaktivovaly [92]. Vlastní toxicita AgNPs však závisí na různých faktorech. Vedle koncentrace je to zejména velikost, která úzce souvisí s plochou. Nanorozměry zajišťují, že tyto částice mají větší povrch v přepočtu na hmotnost ve srovnání s většími částicemi a mají tedy větší procento interakcí s buňkou. Bylo prokázáno, že baktericidní účinek klesá s narůstající velikostí AgNPs. Důležitý je také tvar – nejtoxičtější jsou trojúhelníkovité nanočástice, které inhibují růst bakterií už při koncentracích 1 µg, zatímco sférické nanočástice potřebují pro stejný účinek koncentraci 12,5 µg a tyčinkovité dokonce 50 – 100 µg [93].

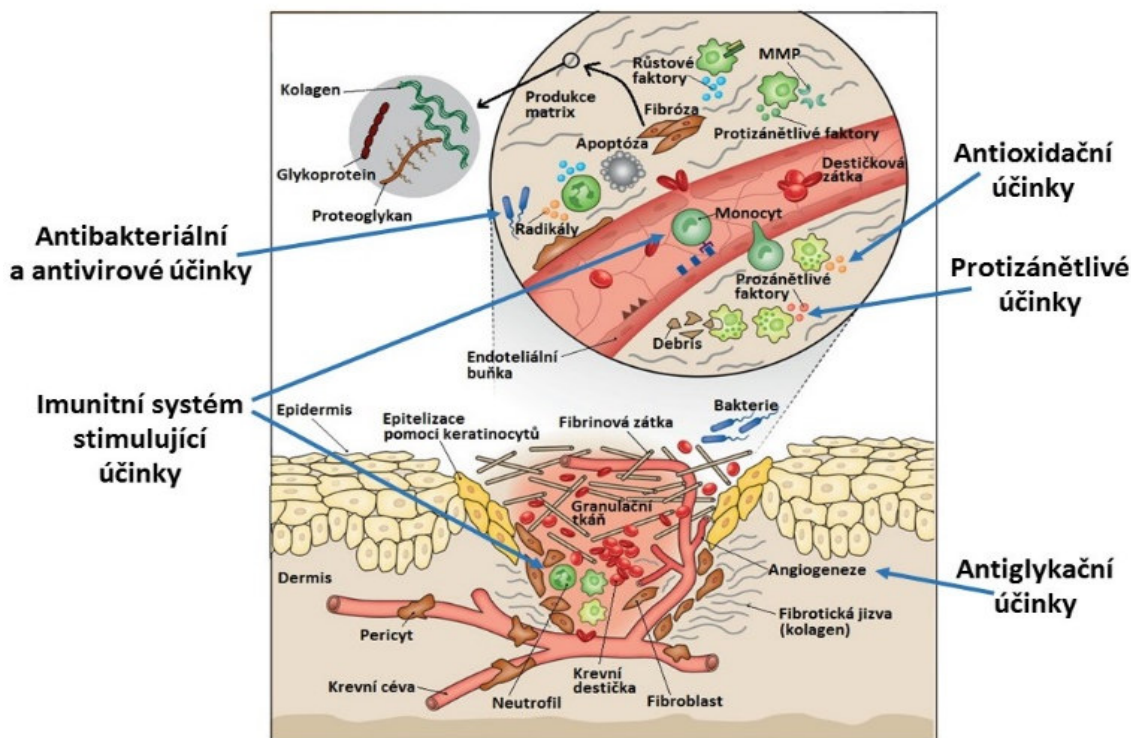
2.2.5.2 Nanočástice selenu

Mezi jedny z nejnovějších nanomateriálů, které jsou v současné době testovány, patří nanočástice s obsahem selenu (SeNPs). Selen je poměrně vzácný polokov známý jako stopový prvek s antioxidačními vlastnostmi. Kromě prospěšných vlastností je známá i jeho toxicita [94]. S ohledem na toxicitu a možnou akumulaci nanočástic v těle se vědci touto problematikou důsledně zabývají a studují vedlejší účinky SeNPs *in vitro* a *in vivo* [95]. Hranice mezi prospěšnými a toxickými účinky SeNPs jsou velmi úzké [96], závisí zejména na jejich dávce a chemické formě [97-99]. Bylo by tedy nerozumné upustit od jejich využití, protože mohou mít spoustu užitečných uplanění, výbornou biodostupnost a nízkou toxicitu [96-100].

Jak již bylo uvedeno, SeNPs mají pozoruhodné antioxidační vlastnosti. V *in vitro* a *in vivo* studiích bylo prokázáno, že dovedou zhaset volné radikály, což je dáno pravděpodobně tím, že selen je klíčovým aktivátorem selenoenzymů, které jsou nezbytné pro ochranu buňky před oxidačním poškozením [96-98, 100, 101]. Zhášení volných radikálů napomáhá předcházet oxidaci DNA [101] a glykaci proteinů [102]. Selenoenzymy působí také protizánětlivě [96]. Zajímavá jsou i zjištění že SeNPs stimulují imunitní odpověď [98, 99] a mají antimikrobiální a antivirové účinky [103].

Nejvíce studované jsou však jejich protinádorové vlastnosti. Sám selen negativně ovlivňuje růst nádoru [96, 97] a celkově snižuje úmrtnost na rakovinu [97, 99]. SeNPs inhibují buněčnou proliferaci a angiogenezi (pravděpodobně zástavou růstu buněk v S-fázi) [97, 99], indukují apoptózu [99, 100] a stimulují imunitní systém [99]. Při onkoterapii je výhodnou jejich chemoprotektivní [104] a synergický účinek s léčbou [105].

Přestože vědci věnují pozornost především protinádorovým vlastnostem SeNPs, vzhledem k jejich antimikrobiálním, antivirovým, protizánětlivým, imunitní systém stimulačním a antioxidačním účinkům lze předpokládat, že by SeNPs mohly najít uplatnění i při hojení ran (Obr. 8).



Obrázek 8. Možné zapojení SeNPs do procesu hojení ran. *MMP* – *matrixové metaloproteinázy*; (upraveno podle [86]).

2.2.5.3 Regenerativní medicína

S narůstající délkou života se do popředí dostává nový obor, kterým je regenerativní medicína. Zabývá se studiem procesů tvorby, inženýrství a regenerace lidských tkání a orgánů s cílem obnovit či dosáhnout jejich normálních funkce. Vědci se v této oblasti snaží nejen o vyřešení problému s nedostatkem dárců tkání a orgánů, ale také eliminaci rizika inkompatibility a imunitních reakcí u recipienta po transplantaci [106].

Jednu z nejčastějších transplantací v chirurgii představuje transplantace kůže. Využívá se k zakrytí plošných defektů např. po odstranění kožního nádoru, při ztrátových poraněních, chronických defektech (rozsáhlé bércové vředy) nebo při popáleninách. Použité kožní štěpy mohou být různě tlusté. Tenčí štěpy, jako dermoepidermální blána nebo dermoepidermální štěpy, se přihojují lépe než kožní

transplantáty v plné tloušťce. Podle dárce můžeme mluvit o autotransplantaci (kůže je z břicha nebo hýždí poraněného), allotransplantaci (štěp pochází od zdravého dárce stejného druhu) a xenotransplantaci (u lidí je možné využít provizorně kůži z prasat). Je možné využít i cizorodý materiál, potom se jedná o alloplastiku [107].

Hlavním cílem vědců však zůstává zajistit možnost autotransplantace i pro pacienty s rozsáhlými kožními defekty. Vyvíjejí se postupy jak z malého vzorku kůže vypěstovat pro poraněného vlastní, dostatečně velký náhradní kožní kryt.

2.2.5.3.1 *Využití lidského séra*

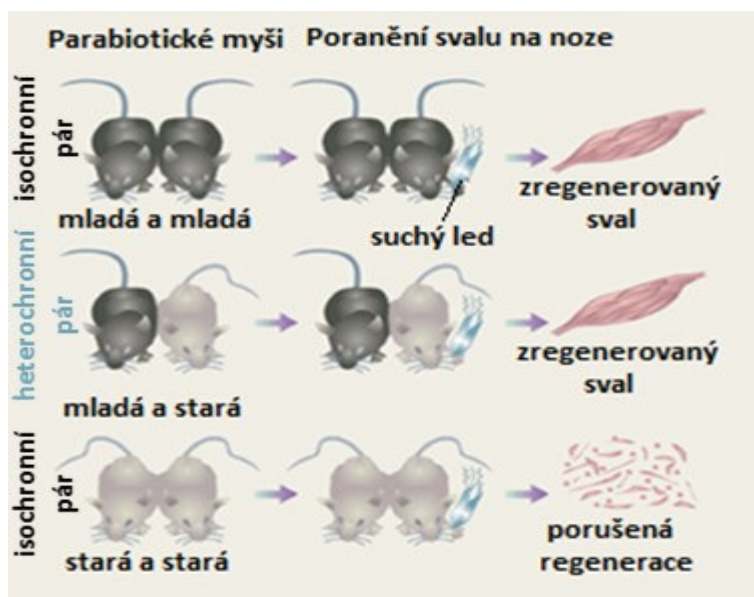
Standardní kultivační metody pro primární kultury buněk využívají jako zdroj růstových faktorů fetální bovinní sérum (FBS). Jedná se o relativně snadno dostupný zdroj obsahující mnoho proteinů, cytokinů, vitamínů a hormonů [108]. Na druhou stranu se šarže od šarže liší a hrozí riziko přenosu zvířecích retrovirových infekcí, mykoplazmat a prionů [109, 110]. Zatímco u *in vitro* experimentů může taková infekce vést ke špatné interpretaci získaných dat, v rámci tkáňového inženýrství hrozí v jejím důsledku, stejně jako u případné imunitní reakce, vážné komplikace. Z těchto důvodů se hledají jiné zdroje růstových faktorů. Jedním z nejlepších je lidské sérum, a to jak autologní tak allogenní. Jeho výhodou je, že buňky s jeho suplementací, ve srovnání s FBS, rostou rychleji a vykazují vyšší životnost [108]. Pokud se porovná sérum allogenní a autologní, lepších výsledků je logicky dosaženo při použití séra od stejného dárce, který dodal i vzorek kůže [108, 111].

2.2.5.3.2 *Parabióza*

S regenerační medicínou úzce souvisí rejuvenační studie. Díky nim se v roce 2005 opět dostala do popředí zájmu parabióza známá již od 19. století [112]. Například byla studována regenerační kapacita svalu pomocí dvou myších párů se spojenými krevními oběhy (Obr. 9). Páry byly isochronní (obě myši byly stejného věku, tedy staré nebo mladé) a heterochronní (jedna myš byla stará a druhá mladá). Bylo zjištěno, že systémové faktory modulující signální dráhy aktivující tkáňovou regenerační kapacitu klesají s narůstajícím věkem. Pokud však byl starý organismus vystaven prostředí mladého organismu, došlo k významnému zlepšení reparačních schopností tkání [113, 114]. Tyto výsledky byly potvrzeny i pro mozkovou [115], jaterní nebo kostní tkáň [116]. To, že s věkem zůstává zachována regenerační kapacita, přináší velkou naději pro medicínu. Pokud by vědci přesně identifikovali u mladých organismů

molekuly, které regeneraci aktivují, mohly by se využít pro hojení nejen kožních defektů, ale i všech ostatních degenerativních poruch.

Vzhledem k náročnosti vytvoření heterochronní parabiózy *in vivo* se nyní hledají alternativní modely, jako jsou primární buněčné kultury v nízké (mladé) a vysoké (senescentní) pasáži, na které se aplikují například krevní séra nebo destičkové lyzáty od dárců různého věku [117-121]. Tyto modely mohou sloužit nejen pro snazší hledání klíčových molekul pro regeneraci tkání, ale zároveň pro potvrzení dat získaných *in vivo* [122].



Obrázek 9. Účinky isochronní a heterochronní parabiózy na poraněný sval (upraveno podle [114]).

3 Cíle disertační práce

Záměrem předkládané disertační práce bylo prohloubit znalosti o zapojení nanočástic (AgNPs) a iontového (Ag-I) stříbra do procesu hojení ran a potvrdit nebo vyvrátit možné využití nanočástic selenu (SeNPs) k hojení ran.

Dalším cílem bylo studium využití lidského séra pro regenerativní medicínu. Tato část disertační práce byla realizována v rámci studijního pobytu (9 měsíců) na Oddělení experimentální, diagnostické a speciální medicíny Univerzity v Boloni v Itálii.

Konkrétní cíle byly:

1. Studium vlivu AgNPs a Ag-I na proces hojení ran:

- Stanovení nežádoucích účinků AgNPs a Ag-I na buněčném modelu primárních lidských kožních fibroblastů (HDF).
- Na *in vitro* modelu pro studium hojení ran stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na:
 - morfologii buněk
 - oxidační stres
 - obranné stresové markery (Nrf2, HO-1, HSP27 a HSP90)
 - markery zánětu (IL-6, NF-κB a COX-2)
 - zarůstání a migraci buněk (MMP-2)

2. Studium možného využití SeNPs k hojení ran:

- Stanovení antimikrobiálního účinku SeNPs.
- Stanovení nežádoucích účinků SeNPs na buněčném modelu HDF.
- Na *in vitro* modelu pro studium hojení ran stanovení vlivu SeNPs na:
 - obranné stresové proteiny (HO-1, HSP27 a HSP90)
 - markery zánětu (IL-6 a COX-2)
 - markery zapojené do procesu hojení ran (MMP-1, MMP-2 a MMP-3)

3. Studium využití lidského séra (LS) pro regenerativní medicínu:

- Stanovení optimální koncentrace HDF pro experimenty s LS.
- Na buněčném modelu HDF stanovení vlivu LS na:
 - morfologii a proliferaci
 - životnost buněk
 - buněčný cyklus
 - markery zapojené do procesu stárnutí (β -galaktosidáza, inhibitory cyklin dependentních kináz p16 a p21 a lamin B)
 - adhezi (vimentin)

4 Experimentální část

4.1 *Biologický materiál*

4.1.1 PRIMÁRNÍ KULTURA LIDSKÝCH KOŽNÍCH FIBROBLASTŮ

Lidské kožní fibroblasty (HDF) byly izolovány z fragmentů kůže získaných z Oddělení Plastické a estetické chirurgie Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL) a od dárců poskytujících vzorky pro vědecké účely pro Oddělení experimentální, diagnostické a speciální medicíny Univerzity v Boloni v Itálii. Vzorky byly odebírány z distální abdominální oblasti, z oblasti ventrální strany thoraxu (Olomouc) nebo z před sluncem chráněné části antebrachia (Boloňa).

Odběr a zpracování bylo prováděno s povolením příslušné etické komise v souladu s českou/italskou legislativou a s podepsaným informovaným souhlasem pacientů. Vzorky lidských tkání byly odebírány pouze zdravým pacientům.

4.1.2 LIDSKÁ SÉRA

Vzorky plné krve pro izolaci lidského séra (LS) byly získány od dobrovolných dárců poskytujících vzorky pro vědecké účely pro Oddělení experimentální, diagnostické a speciální medicíny Univerzity v Boloni v Itálii. Odběr byl proveden za standardních podmínek. LS bylo z plné krve izolováno centrifugací (1500 RPM, 20 min., 4°C) a skladováno při -80 °C. Odběr a zpracování bylo provedeno s povolením místní etické komise v souladu s italskou legislativou a s podepsaným informovaným souhlasem dárců.

4.1.3 MIKROORGANISMY

Bakterie:

- Referenční kmeny – přirozeně citlivé (Česká sbírka mikroorganismů, CMM)
Enterococcus faecalis CCM 4224
Staphylococcus aureus CCM 3953
Escherichia coli CCM 3954
Pseudomonas aeruginosa CCM 3955
- Kmeny izolované z klinických materiálů ve sbírce Ústavu Mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (LFUP) a ve FNOL

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4591MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

A/16568 – fluorochinolon rezistentní *Staphylococcus haemolyticus*

C/16702 – fluorochinolon rezistentní *Escherichia coli*

A/16575 – fluorochinolon rezistentní *Pseudomonas aeruginosa*

Kvasinky:

- Kmeny izolované z klinických materiálů ve sbírce Ústavu Mikrobiologie LFUP a FNOL

Candida albicans 1

Candida krusei 2

Candida tropicalis 5

Candida parapsilosis 6

4.2 Chemikálie, roztoky a přístroje

4.2.1 NANOČÁSTICE STŘÍBRA, IONTOVÉ STŘÍBRO A NANOČÁSTICE SELENU

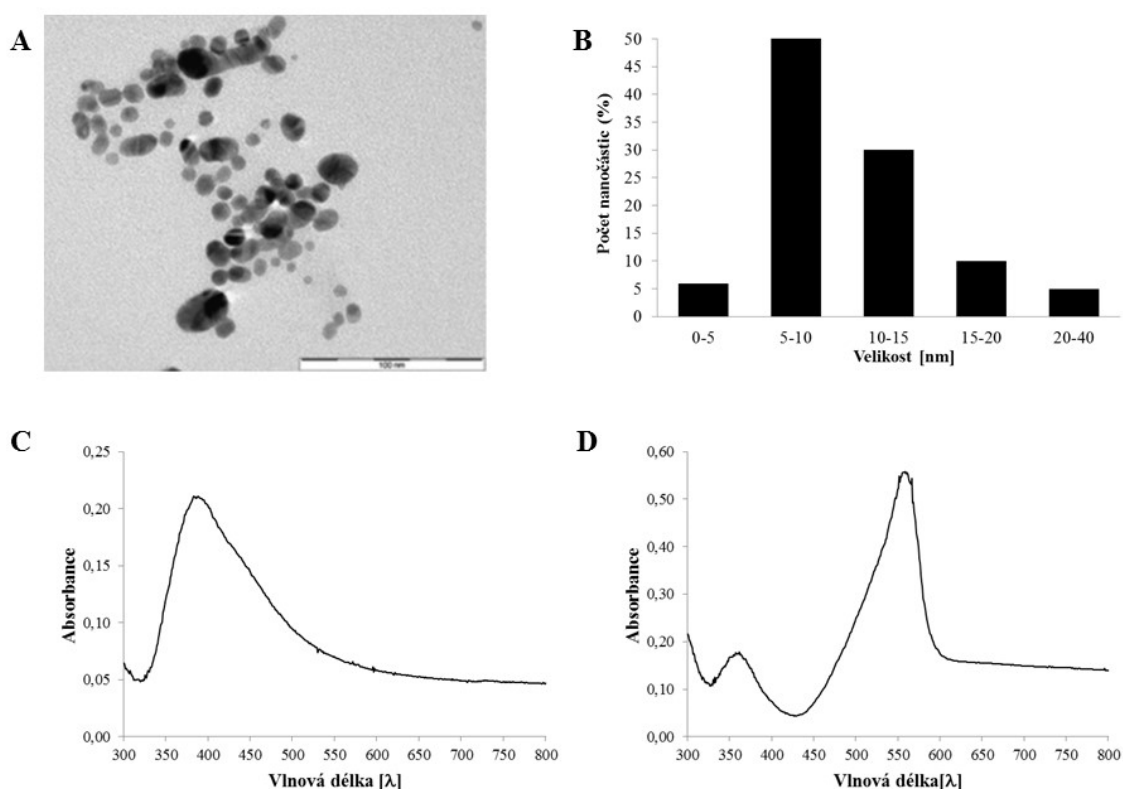
Vzorky nanočástic stříbra (AgNPs; 1000 µg/ml), iontového stříbra (Ag-I; roztok AgNO₃, 2000 µg/ml) a nanočástic selenu (SeNPs; 100 µg/ml) byly poskytnuty firmou NanoTrade s.r.o., Česká Republika v rámci společně řešeného grantového projektu (MPO FR-TI2/205).

4.2.1.1 Příprava a charakterizace AgNPs

Nanočástice byly připraveny redukcí dusičnanu stříbrého (AgNO₃) tetrahydridoboritanem sodným (NaBH₄) [123]. AgNO₃ (1,7 g) byl rozpuštěn v destilované vodě (800 ml, míchání 500 RPM) a poté byl do roztoku přidán polyakrylát sodný (2,22 g, molekulová hmotnost 1200, 45% roztok). Po rozpuštění byly otáčky míchání zvýšeny na 800 RPM a do reakční směsi byl velmi rychle přidán NaBH₄ (200 ml; 0,05 mmol/l). Hodnota pH finální disperze byla upravena na 7,4.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro stanovení přesné velikosti, tvaru a stavu disperze byl použit transmisní elektronový mikroskop (TEM; JEOL 2010, JEOL Ltd., Japonsko). Zeta potenciál byl změřen na Zetasizeru Nano (Malvern Instruments, Worcestershire, Velká Británie) a ke zjištění absorpčního spektra byl použit UV-VIS spektrofotometr (Helios Alpha, Thermo Electron Corporation, Velká Británie). Připravené AgNPs byly monodisperzní, sférické (Obr. 10 A) s průměrnou velikostí $10,43 \pm 4,74$ nm (Obr. 10 B) a zeta potenciálem -22 mV. Absorpční maximum AgNPs ve vodě bylo 388 nm (Obr. 10 C) a v bezsérovém DMEM 557 nm (Obr. 10 D). Před vlastními experimenty byly nanočástice 30 min sonikovány.



Obrázek 10. Charakterizace AgNPs. Morfologie (A), distribuce velikosti (B), absorbance ve vodě (C) a bezsérovém DMEM (D).

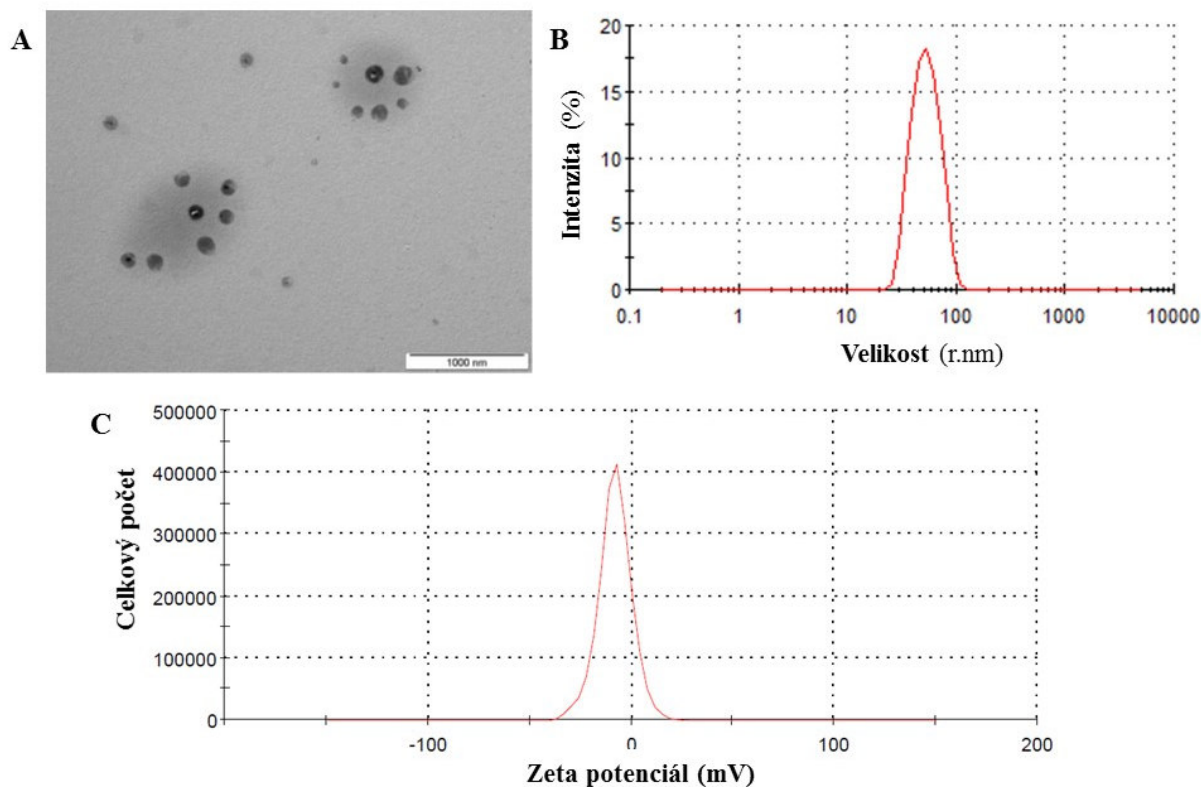
4.2.1.2 Příprava a charakterizace SeNPs

SeNPs byly syntetizovány z Na_2SeO_3 . Detailní postup je předmětem budoucího patentu, a proto není uveden.

Pro stanovení přesné velikosti, tvaru a stavu disperze připravených nanočástic byl použit Transmisní elektronový mikroskop (TEM; JEOL 2010, JEOL Ltd., Japonsko). Zeta potenciál byl změřen na Zetasizeru Nano (Malvern Instruments,

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Worcestershire, Velká Británie). Připravené SeNPs byly monodisperzní, sférické (Obr. 11 A) s průměrnou velikostí 55 nm (Obr. 11 B) a zeta potenciálem -8,15 mV (Obr. 11 C). Před vlastními experimenty byly nanočástice 30 min sonikovány a sterilizovány v autoklávu (20 min, 100°C, bez přetlaku).



Obrázek 11. Charakterizace SeNPs. Morfologie (A), distribuce velikosti (B) a zeta potenciál (C).

4.2.2 CHEMIKÁLIE

Primární myší protilátky Anti-Cytokeratin 14 [ab7800] a Hsp27 [2B4] (Abcam, Velká Británie).

Odtučněné sušené mléko Laktino (ARTIFEX Instant s.r.o., ČR).

Přenosový pufr Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad Laboratories, USA).

Pufry Tris-glycine a Tris-glycine-SDS (BioTech, ČR).

Projasňovací roztoky pro sekundární protilátky (Calbiochem, USA).

Vývojka a ustalovač Carastream® Kodak® autoradiography GBX (Carestream, USA).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

EnVision™ Detection System (Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse), primární myší protilátka Vimentin IR630 a roztok pro ředění protilátek Dako REAL™ Antibody diluent, Rabbit/Mouse, Protein Block serum free (**Dako, Dánsko**).

Standard molekulové hmotnosti PageRuler™ (**GeneTiCA, ČR**).

Aceton, amoniak, citrát trisodný, monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), N, N-dimethylformamid, dimethylsulfoxid (DMSO), ethanol, fluorid sodný (NaF), roztok formaldehydu (36-38%), glycerol, hexakynoželezitan draselný ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), trihydrát hexakynoželezitanu draselného ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu draselného ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4), hydroxid sodný (NaOH), chlorid draselný (KCl), chlorid hořečnatý (MgCl_2), hexahydrát chloridu hořečnatého ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), chlorid sodný (NaCl), chlorid vápenatý (CaCl_2), kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina octová (CH_3COOH), kyselina orto-fosforečná (H_3PO_4), kyselina sírová (H_2SO_4), ledová kyselina octová (CH_3COOH), methanol, monohydrát kyseliny citrónové, roztok peroxidu vodíku (H_2O_2), TWEEN® 20, xylen a ostatní chemikálie stupně čistoty p.a. (**Lach-ner, Česká republika**).

Substrát pro chemiluminiscenční detekci WesternSure™ PREMIUM (**LI-COR Biosciences, USA**).

Oxid uhličitý od firmy **Linde Technoplyn Praha, Česká republika**.

Roztok akrylamidu s N,N'-metylenbisakrylamidem (29:1, 40%) (**Merck Millipore, Německo**).

BCA™ protein assay kit (**Pierce®, USA**).

Primární myší protilátka Human Vimentin Antibody (**R&D Systems, USA**).

cOmplete – Protease Inhibitor Cocktail Tablet (**Roche, Švýcarsko**)

Primární myší protilátky HSP 90 (4F10), p53 (C11), tubulin (10D8), primární králičí protilátky Nrf2 (C-20), NFκB p65 (C-20), HO-1 (H-105), MMP-1/8 (H-300), MMP-2 (H-76), p21 (C19), kozí primární protilátky actin (I-19), COX-2 (M-19), lamin B (C-20), MMP-3 (C-19), sekundární kozí protilátky (goat anti-rabbit IgG-HRP a goat anti-mouse IgG-HRP) a sekundární králičí protilátka (rabbit anti-goat IgG-HRP) konjugované s křenovou peroxidázou, Western Blotting Luminol Reagent (**Santa Cruz Biotechnology, USA**).

Adenin, amonium persulfát, amphotericin B, borax ($\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), bromdeoxyuridin (BrdU) myší monoklonální protilátka, Anti-BrdU myší monoklonální protilátka, bromfenolová modř, hovězí albumin (BSA), citrátový pufr, Coomassie

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

briliantová modř G-250, 4',6-diamidin-2'-fenylindol dihydrochlorid (DAPI), dithiotreitol (DTT), eosin B, epidermální růstový faktor (EGF), ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), fetální bovinní sérum (FBS), glukóza, L-glutamin, hematoxylin, HEPES, Hoechst 33342 (bisbenzamidin H), hydrokortizon, insulin, médium Dulbecco's modified Eagle's, médium Nutrient Mixture F-12 Ham, krystalová violet, dihydrofluorescein-diacetát, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), lipopolysacharid (LPS) z *Escherichia coli*, stabilizovaný roztok penicilinu (10 000 U/ml) se streptomycinem (10 mg/ml), Ponceau S, propidium jodid (PI), sekundární kozí protilátka (goat anti-mouse IgG) značená FITC, sodium dodecyl sulfát (SDS), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Tergitol® typ NP-40, 3,3',5-trijodo-L-thyronin, Tris(hydroxymethyl)aminoetan (TRIS), Trypsin inhibitor from *Glycine max* T 6522, trypanová modř (0,4%), trypsin-EDTA (0,25%), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactosid (X-gal) (**Sigma-Aldrich, USA**).

Primární myši protilátka P16 (5A8A4) (**Thermo Scientific, USA**).

Krevní agar a pomnožovací bujón, mozko-srdcový bujón, Sabouraudův agar (**TRIOS®, Česká Republika**).

4.2.3 ROZTOKY

Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS)

10× PBS: NaCl (0,137 mol/l), KCl (0,00268 mol/l), Na₂HPO₄ (0,00896 mol/l), KH₂PO₄ (0,00147 mol/l); pro experimenty byl zásobní roztok 10x zředěn

Roztoky pro izolaci a kultivaci lidských fibroblastů

Transportní roztok: PBS, amphotericin B (0,25 µg/ml), penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml)

Médium pro izolaci: DMEM : F-12 Ham (v poměru 3:1), FBS (10%, v/v), adenin (0,8 µg/ml), amphotericin B (0,25 µg/ml), penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), hydrokortizon (0,8 µg/ml), inzulin (0,12 U/ml), EGF (1 ng/ml), 3,3',5-trijodo-L-thyronin (0,136 µg/ml)

Kultivační médium: DMEM, FBS (10%, v/v), penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/l)

Médium pro experimenty: DMEM, penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/l)

Roztoky pro histologické ověření izolovaných HDF

Fixační roztok: methanol : aceton (1:1)

Oplachovací roztok: 1× PBS

Protilátka proti cytokeratinu 14: pro experimenty ředěna 1:100 v Dako REAL™

Antibody diluent

Protilátka proti vimentinu: naředěna výrobcem pro okamžité použití

Roztok pro stanovení toxicity

Zásobní roztok MTT: MTT (5 mg/ml; dd H₂O), pro experimenty byl zásobní roztok 10x zředěn v médiu pro experimenty

Roztoky pro stanovení generace ROS

Zásobní roztok sondy: dihydrofluorescein diacetát v ethanolu (50 mmol/l)

Pracovní roztok sondy: dihydrofluorescein diacetát (500 µmol/l; 100 x ředěný zásobní roztok sondy v PBS), pro experimenty byl roztok ředěn 100x do média pro experimenty

Roztoky pro stanovení IL-6

Blokovací pufr: BSA (1%, m/v) v PBS

Promývací roztok: Tween 20 (0,05%, m/v) v PBS

Zastavovací roztok: H₂SO₄ (2 mol/l)

Roztoky pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blot

Lyzační roztok pro celkový extrakt: TRIS (20 mmol/l), NaCl (150 mmol/l), NaF (1 mmol/l), 1 tableta cOmplete, HCl (1 mol/l; pH 7,5), SDS (0,2 %, m/v)

Pufr A (lyzační roztok pro cytosolický extrakt): HEPES (10 mmol/l; pH 7,9), KCl (10 mmol/l), MgCl₂ (1,5 mmol/l), DTT (0,5 mmol/l), Tergitol® typ NP-40 (0,1 %, v/v)

Pufr B (lyzační roztok pro jaderný extrakt): HEPES (20 mmol/l; pH 7,9), NaCl (0,42 mol/l), EDTA (0,2 mmol/l), MgCl₂ (1,5 mmol/l), DTT (0,5 mmol/l), PMSF (0,5 mmol/l), glycerol (25 %, v/v)

Migrační pufr: TRIS-Cl (0,025 mol/l), glycin (0,192 mol/l), SDS (0,1 %, m/v), pH 8,3

Zaostřovací pufr: TRIS-Cl (0,5 mol/l; pH 6,8)

Vzorkový pufr: TRIS-Cl (0,5 mol/l; pH 6,8), glycerol (20 %, v/v), bromfenolová modř (0,02 %, m/v), DTT (0,2 mol/l), SDS (4 %, m/v)

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Migrační gel: 10% SDS polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (24,7%, v/v), dd H₂O (48,5%), migrační pufr (24,7%, v/v), 10% SDS (1%, v/v), 10% APS (1%, v/v), TEMED (0,1%, v/v)

Zaostřovací gel: 4% SDS polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (10%, v/v), dd H₂O (63%), zaostřovací pufr (24,8%, v/v), 10% SDS (1%, v/v), 10% APS (0,7%, v/v), TEMED (0,1%, v/v)

Přenosový pufr: TRIS-Cl (0,025 mol/l), glycin (0,192 mol/l), methanol (20 %, v/v), SDS (0,1 %, m/v); pH 8,3

10x TBS (Tris-buffered saline): TRIS (0,1 mol/l), NaCl (0,137 mol/l); pH 7,5, pro experimenty byl roztok zředěn 10 x

TBS/T: TWEEN® 20 (0,05%, v/v) v TBS

TBS/T/mléko: TWEEN® 20 (0,05%, v/v), sušené mléko (5%, m/v) v TBS

TBS/T/BSA: TWEEN® 20 (0,05%, v/v), BSA (5%, m/v) v TBS

Barvicí roztok: kyselina octová (5%, v/v), Ponceau S (0,1%, m/v) v dd H₂O

Stripovací pufr: SDS (12%, m/v)

Roztok pro rýhový test

Barvicí roztok: krystalová violet (0,5%, m/v), methanol (20%, v/v)

Roztok pro experimenty s lidským sérem

Kultivační médium: DMEM, FBS (10%, v/v) nebo LS (10 %), penicilin (100 U·ml⁻¹), streptomycin (100 mg·l⁻¹) a L-glutamin (2 mmol/l)

Roztok pro stanovení toxicity LS

PI pufr: citrát trisodný (3,4 mmol/l), NaCl (9,65 mmol/l), propidium iodid (20 µg/ml), Tergitol® typ NP-40 (0,03 %, v/v)

Roztoky pro stanovení buněčného cyklu

PBS/T: TWEEN® 20 (0,5%, v/v) v PBS

Boraxový pufr: borax (0,1 mol/l)

Roztoky pro stanovení senescence

Zásobní roztok kyseliny citrónové (0,2 M) ve fosforečnanu sodném: 4,2 g monohydrátu kyseliny citrónové, 2,76 g monohydrátu fosforečnanu sodného, upraveno pH na 6,0 a doplněno do 100 ml dd H₂O

Barvicí roztok: kyselina citrónová (40 mmol/l) ve fosforečnanu sodném, K₄[Fe(CN)₆] (5 mol/l), K₃[Fe(CN)₆] (5 mmol/l), NaCl (150 mmol/l), MgCl₂ (2 mmol/l), X-gal (1 mg/ml)

Roztoky pro detekci mykoplazmat

Fixační roztok: methanol:CH₃COOH (poměr 3:1)

Barvicí roztok: bisbenzamidin H (50 µg/ml), pro experimenty ředěn 100x v PBS

Roztok pro stanovení proteinů dle Bradfordové

Pracovní roztok: Coomassie Brilliantová modř G-250 (0,01%, m/v) v 50 ml 95% ethanolu a 100 ml 85% H₃PO₄ doplněno do 1000 ml vodou

Speciální reakční kity

Human IL-6 Mini ELISA Development kit 900-M16 (PeproTech, USA)

4.2.4 PŘÍSTROJE

Automatická promývačka HydroFlex™ (Tecan, Švýcarsko)

Bürkerova a Neubaerova komůrka (Marienfeld, Německo)

C-DiGit™ Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA)

Centrifuga Labofuge 400 (Heraeus, Německo)

Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf, Německo)

Inkubátor Forma™ Direct Heat (Thermo Scientific, USA)

Denzilometr (LaChema, Česká Republika)

Fluorescenční mikroskop Axiovert 40 CFL (Zeiss, Německo)

Fotometr pro měření absorpance v 96-jamkových deskách Infinite® M200 Pro (Tecan, Švýcarsko)

Hlubokomrazicí box VX 570 (Jouan, Francie)

Chlazená centrifuga BR4i (Jouan, Francie)

Chlazená centrifuga Mikro 22 (Hettich Zentrifugen, Německo)

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Chlazená centrifuga Rotina 38R (Hettrich Zentrifugen, Německo)
Inverzní mikroskop CK2 (Olympus, Japonsko)
Inverzní mikroskop Nikon Eclipse TS100 s DS-QiMc kamerou (Nikon Instruments Inc., USA)
Laboratorní váhy ACB 6000H (Schoeller instruments, ČR)
Laboratorní váhy AND GX 600 (A&D instrument, Velká Británie)
Laboratorní váhy AX105 Delta Range® (Mettler Toledo, Švýcarsko)
Laminární box MSC 9 (Jouan, Francie)
Magnetická míchačka IKA® RH digital (IKA, Německo)
Odsávačka Aspiration Station (Gilson, USA)
Parní sterilizátor VARIOKLAV® (Thermo Scientific, USA)
Průtokový cytometr FACSCalibur (Becton & Dickinson Pharmingen, USA)
SNAP i.d.® 2.0 (Merck Millipore, Německo)
Stolní pH-metr pH50 (Chromservis, ČR) s elektrodou P11 Sentek (Sentek, Velká Británie)
Systém pro elektroforézu Mini-Protean™ se zdrojem Power Pac Universal, Power Pac 200, Power Pac 3000 (Bio-Rad Laboratories, USA)
Termomixer Comfort + nástavce (Eppendorf, Německo)
Tkáňový procesor Histos Pro (Milestone, Dánsko)
Trans-Blot® Trubo™ Blotting System (Bio-Rad Laboratories, USA)
Transmisní elektronový mikroskop (TEM ; JEOL 2010, JEOL Ltd., Japonsko)
Třepačka Duomax 1030 (Heidolph, Německo)
Třepačka Reax TOP (Heidolph, Německo)
Třepačka ShakerRocker MR-12 (BioSan, Lotyšsko)
Třepačka Vortex Mixer (Labnet International, USA)
Ultrazvuková sonda UP 200S (Dr. Hielscher, GmbH, Německo)
Ultrazvuková termostatová vodní lázeň PS 01000A (Notus-Powersonic, Slovensko)
UV-VIS spektrofotometr (Helios Alpha, Thermo Electron Corporation, Velká Británie)
Vakuová pumpa (Merck Millipore, Německo)
Vodní lázeň Memmert (Memmert, Německo)
Zařízení pro přípravu deionizované vody Ultrapur (Watrex, ČR)
Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Worcestershire, Velká Británie)

4.2.5 OSTATNÍ MATERIÁL

Automatické pipety a špičky (Eppendorf, Německo)

Blotovací podložky Blotting Pad 707, 7 x 10/10 x 14 cm (VWR International, USA)

Fuji Medical X-RAY film Super RX-N (FUJIFILM, Japonsko)

KODAK BioMax light film (Sigma-Aldrich, USA)

Kultivační láhve Nunclon™, 4, 6, 24 a 96-jamkové kultivační desky, filtry a centrifugační zkumavky (Nunc, Dánsko)

Kultivační láhve, kultivační desky a centrifugační zkumavky (TPP, Švýcarsko)

Plastové injekční stříkačky (B. Braun, Německo)

Plastové mikrozukavky (Eppendorf, Německo)

Podložní sklo Superfrost Plus (Thermo Scientific, USA)

PVDF membrána Immun-Blot™ (0,2 μm; Bio-Rad Laboratories, USA).

SNAP i.d.® 2.0 Mini Blot Holders (Merck Millipore, Německo)

Software pro denzitometrickou analýzu ElfoMan 2.6 (Semecký, Česká Republika)

Software pro denzitometrickou analýzu ImageJ 1.42q (National Institutes of Health, USA)

Sterilizační filtry 0,22 μm Express™ Plus (Merck Millipore, Německo)

Sterilní zkumavky (GAMA GROUP, ČR)

Trans-Blot® Turbo™ Minisize Transfer Stacks 7.1 x 8.5 cm (Bio-Rad Laboratories, USA)

4.3 *Metody*

4.3.1 IZOLACE PRIMÁRNÍCH KULTUR LIDSKÝCH KOŽNÍCH FIBROBLASTŮ

Tkáň byla vyjmuta z transportního roztoku, promyta sterilním PBS a po odstranění tukové tkáně byla rozřezána na kousky o ploše 1 cm² a přenesena na Petriho misku (10 cm), která byla zdrsňena poškrábáním pinzetou. Po několika minutách byla tkáň převrstvena médiem pro izolaci (2–4 ml) a inkubována (37 °C, 5 % CO₂). Médium bylo měněno každých 48–72 hodin. Přibližně za 2–4 týdny byla plocha Petriho misky pokryta lidskými kožními fibroblasty (HDF). Po dosažení monovrstvy byla tkáň přenesena do nové Petriho misky pro další izolaci. HDF byly opláchnuty sterilním PBS (5 ml), uvolněny inkubací s 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (1 ml, 2–3 min, 37 °C) a bylo přidáno 5 ml kultivačního média. Buňky byly přeneseny do centrifugační zkumavky a centrifugovány (10 min, 1300 RPM, pokojová teplota). Pelet byl

resuspendován v kultivačním médiu, přenesen do 75 cm² kultivační láhve a inkubován (37 °C, 5 % CO₂). Po dosažení monovrstvy byly buňky opláchnuty PBS, uvolněny inkubací s 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (1 ml, 2–3 min, 37 °C) a přidáno kultivační médium (5 ml). Poté byly přeneseny do centrifugační zkumavky a po centrifugaci (10 min, 1300 RPM, pokojová teplota) a resuspendování byly použity pro experimenty.

4.3.2 HISTOLOGICKÉ OVĚŘENÍ IZOLOVANÉ KULTURY HDF

HDF byly naředěny kultivačním médiem na koncentraci 2×10^5 buněk/ml, vysety na sterilní podložní sklíčko (500-750 μ l/sklíčko) umístěné do Petriho misky (10 cm) a inkubovány (24 hod, 37 °C, 5 % CO₂). Po inkubaci bylo sklíčko opláchnuto PBS (2x5 ml), převrstveno vychlazeným fixačním roztokem (10 min) a po usušení uloženo v -20 °C.

Před barvením byly buňky zafixované na podložním sklíčku rehydratovány ponořením do vody a inkubovány v H₂O₂ (0,3%, 15 min) k zablokování aktivace endogenní peroxidázy. Následně byla sklíčka inkubována za zvýšeného tlaku v lázni citrátového pufru (15 min, 120°C, pH 6, Histos Pro, Milestone) a po ochlazení a promytí vodou inkubována v lázni TBS (5 min). Poté byla sklíčka blokována v roztoku Protein Block (30 min, pokojová teplota) a inkubována s primárními protilátkami [Cytokeratin 14 (ředění 1:100 Dako REAL™ Antibody Diluent) a Vimentin (bez ředění)]. Po inkubaci (1 hod, pokojová teplota) byla sklíčka promyta (3x5 min TBS) a inkubována s detekčním systémem (1 hod, EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse). Po promytí (3x5 min TBS) byla sklíčka inkubována v chromogenu DAB (5 min), promyta tekoucí vodou a jádra buněk byla dobarvena pomocí kamencového hematoxylinu (3 min). Po promytí (5 min, tekoucí voda) byla sklíčka postupně odvodněna v lázních 96% etanolu (5 min, pokojová teplota) a acetonu (5 min, pokojová teplota), projasněna ve dvou lázních xylenů (5 min) a zamontována do montovacího média Entellan®. Pozitivita / negativita pro příslušnou protilátku byla hodnocena mikroskopicky.

4.3.3 STUDIUM ZAPOJENÍ AGNPs A AG-I DO PROCESU HOJENÍ RAN

4.3.3.1 Stanovení nežádoucích účinků AgNPs a Ag-I na HDF

4.3.3.1.1 Stanovení toxicity AgNPs a Ag-I

MTT test

Původně žlutá tetrazoliová sůl MTT je redukována mitochondriálními dehydrogenázami metabolicky aktivních buněk na fialové, ve vodě nerozpustné formazanové barvivo, jehož koncentrace je po rozpuštění v organickém rozpouštědle stanovena spektrofotometricky při 540 nm [124].

Příprava buněk pro experimenty

Koncentrace buněk byla stanovena na základě barvení trypanovou modří. HDF (1×10^5 buněk/ml) byly vysety v kultivačním médiu na 96-jamkovou desku (200 μ l buněčné suspenze/jamku) a inkubovány (37 °C, 5 % CO₂, 24 hod). Následně byly buňky opláchnuty sterilním PBS, bylo aplikováno 100 μ l média pro experimenty obsahujícího testované látky v koncentračním rozmezí AgNPs (0,05–25 μ g/ml) a Ag-I (0,05–25 μ g/ml). Kontrolní buňky byly připraveny inkubací v médiu pro experimenty bez testovaných látek.

Po 24 hod inkubaci byly buňky opláchnuty sterilním PBS a na jamku bylo aplikováno 100 μ l MTT (0,5 mg/ml média pro experimenty). Po inkubaci (3 hod, 37 °C, 5 % CO₂) byl roztok nad buňkami odstraněn a vytvořené formazanové barvivo v jamce bylo rozpuštěno ve 200 μ l roztoku DMSO s 1 % amoniaku. Po rozpuštění bylo 100 μ l roztoku přepipetováno na novou 96-jamkovou desku (zabránění interference nanočástic) a byla změřena absorbance vzniklého modrofialového roztoku při vlnových délkách 540 nm (testovací) /690 nm (referenční).

Toxicita látek (%) byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$\text{Toxicita (\%)} = 100 \cdot \left(\frac{(A_v - A_p)}{(A_k - A_p)} \right)$$

A_p absorbance pozadí (jamka bez buněk s AgNPs/Ag-I v médiu pro experimenty)

A_v absorbance vzorku (buňky inkubované v médiu pro experimenty s AgNPs/Ag-I)

A_k absorbance kontroly (buňky inkubované v médiu pro experimenty bez AgNPs/Ag-I)

4.3.3.1.2 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na produkci ROS

Generace ROS byla stanovena s využitím sondy dihydrofluorescein diacetátu [125].

Příprava buněk pro experimenty

Koncentrace buněk byla stanovena na základě barvení trypanovou modří. HDF ($3,13 \times 10^5$ buněk/ml) byly vysety v kultivačním médiu na Petriho misky (3,5 cm; 1,5 ml suspenze buněk/misku) a inkubovány (37 °C, 5 % CO₂, 24 hod). Následně byly buňky opláchnuty sterilním PBS, bylo aplikováno 1,5 ml média pro experimenty obsahujícího testované látky v koncentračním rozmezí AgNPs (0,25; 2,5 a 25 µg/ml) a Ag-I (0,025; 0,1 a 0,25 µg/ml). Kontrolní buňky byly připraveny inkubací v médiu pro experimenty bez testovaných látek.

Po inkubaci (8 a 24 hod) byl aplikován pracovní roztok sondy (15 µl/jamku; 30 min). Následně bylo médium odsáto, buňky opláchnuty roztokem PBS (2x2 ml), seškrabány do vychlazeného PBS (0,5 ml) a sonikovány na ledu (20 cyklů, intenzita 0,5). Po sonikaci bylo 200 µl suspenze přepipetováno na 96-jamkovou desku a byla změřena fluorescence při vlnových délkách 500 nm (testovací) / 525 nm (referenční). Pro odstranění interference nanočástic byla měřena fluorescence nanočástic v médiu bez buněk. Koncentrace proteinů v suspenzi byla stanovena dle Bradfordové (viz kapitola 4.3.6.1).

Generace ROS (%) byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$\text{ROS (\%)} = \left[\left(\frac{F_v/C_v}{F_k/C_k} \right) \div \left(\frac{F_p}{F_m} \right) \right] \times 100$$

F_v/C_v fluorescence vzorku (buňky inkubované v médiu pro experimenty s AgNPs/Ag-I) / koncentrace proteinů ve vzorku

F_k/C_k fluorescence kontroly (buňky inkubované v médiu pro experimenty bez AgNPs/Ag-I) / koncentrace proteinů v kontrole

F_p fluorescence pozadí (jamka bez buněk s médiem pro experimenty s AgNPs/Ag-I)

F_m fluorescence média (jamka bez buněk s médiem pro experimenty bez AgNPs/Ag-I)

4.3.3.1.3 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na hladinu IL-6

Koncentrace IL-6 v médiu byla stanovena metodou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) s využitím komerčního kitu pro stanovení IL-6 (Human IL-6 Mini ELISA Development Kit) podle protokolu uvedeného výrobcem.

Příprava buněk pro experimenty

Buňky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.3.1.2 (dle ROS). Jako pozitivní kontrola byl k buňkám přidán LPS z *E. coli* (finální koncentrace 10 µg/ml). Po inkubaci (8 a 24 hod) bylo médium odebráno a před vlastním stanovením uchováváno při -80 °C.

Médium bylo naředěno (1:2) a aplikováno na 96-jamkovou kultivační desku pokrytou specifickou monoklonální protilátkou. Po inkubaci (2 hod, pokojová teplota) bylo médium odstraněno a jamky opláchnuty promývacím pufrem (3x). Následně byl aplikován roztok enzymaticky značené sekundární protilátky (2 hod, pokojová teplota). Poté byl roztok odstraněn, jamky opláchnuty promývacím pufrem (3x250 µl) a byl přidán roztok substrátu. Po inkubaci (30 min, pokojová teplota, tma) byla reakce ukončena zastavovacím roztokem a změřena absorbance vzniklého produktu při 450 nm (Infinite® M200 Pro, Tecan, Švýcarsko).

Koncentrace IL-6 ve vzorcích byla vypočtena z kalibračního grafu závislosti absorbance na koncentraci standardu.

4.3.3.2 Experimentální model rány

Pro simulaci rány byla použita modifikována standardní metoda používaná pro studium hojení ran [37].

4.3.3.2.1 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na morfologii buněk

Morfometrická analýza

Tato analýza hodnotí tvar buněk a umožňuje porovnáním s kontrolními buňkami odhalit změny celkového tvaru i konkrétních struktur, zejména jádra. Získaná data lze hodnotit formou indexů, např. délko-šířkový index (poměr délky buňky k šířce buňky) nebo nukleoplazmatický index (poměr plochy jádra k celkové ploše buňky) [126].

Příprava buněk pro experimenty

Koncentrace buněk byla stanovena na základě barvení trypanovou modří. HDF (1×10^5 buněk/ml) byly vysety v kultivačním médiu na sterilní mikroskopické sklíčko umístěné v 6-jamkové desce (400 μ l suspenze buněk/jamku) a inkubovány (37 °C, 5 % CO₂, 24 hod). Po inkubaci byly buňky na sklíčku poškrábány sterilní 200 μ l pipetovací špičkou, médium nahrazeno čerstvým médiem pro experimenty a buňky inkubovány (1 hod, 42 °C). Poté bylo médium odsáto, buňky opláchnuty sterilním PBS a aplikováno médium pro experimenty obsahující testované látky v koncentraci AgNPs (0,25; 2,5 a 25 μ g/ml) a Ag-I (0,025; 0,1 a 0,25 μ g/ml). Kontrolní buňky K1 (nepoškrábané a nezahřáté) a K2 (poškrábané a zahřáté) byly připraveny inkubací v médiu pro experimenty bez testovaných látek.

Po 24 hod inkubaci byly buňky opláchnuty ledovým PBS (2x2 ml) a fixovány ledovou směsí methanol:aceton (poměr 1:1, 15 min). Před barvením byly buňky zafixované na sklíčku rehydratovány ponořením do vody (5 min), jádra buněk obarvena pomocí hematoxylinu (3 min) a po promytí (5 min, tekoucí voda) cytoplazma obarvena eosinem (1 min). Po promytí (5 min, tekoucí voda) byla sklíčka postupně odvodněna v lázních 96% etanolu (5 min, pokojová teplota) a acetonu (5 min, pokojová teplota), projasněna ve dvou lázních xylenu (5 min) a zamontována do montovacího média Entellan®. Délka, šířka, celková plocha a plocha jádra byla vyhodnocena mikroskopicky pomocí programu ImageJ. Hodnocení bylo provedeno na 25 buňkách/sklíčko. Byl vypočítán D/Š index (poměr délky buňky k šířce buňky) a J/C – nukleoplazmatický index (poměr plochy jádra k celkové ploše cytoplasmy).

4.3.3.2.2 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na hladinu ROS

Generace ROS byla stanovena s využitím sondy dihydrofluorescein diacetátu [125].

Příprava buněk pro experimenty

Koncentrace buněk byla stanovena na základě barvení trypanovou modří. HDF ($3,13 \times 10^5$ buněk/ml) byly vysety v kultivačním médiu na Petriho misku (3,5 cm; 1,5 ml suspenze buněk/misku) a inkubovány (37 °C, 5 % CO₂, 24 hod). Po inkubaci byly buňky sterilně poškrábány 3 x 200 μ l pipetovací špičkou, médium vyměněno za médium pro experimenty a buňky inkubovány (1 hod, 42 °C). Následně byly buňky

opláchnuty sterilním PBS a aplikováno 1,5 ml média pro experimenty obsahujícího testované látky v koncentračním rozmezí AgNPs (0,25; 2,5 a 25 µg/ml) a Ag-I (0,025; 0,1 a 0,25 µg/ml). Kontrolní buňky byly připraveny inkubací v médiu pro experimenty bez testovaných látek.

Po inkubaci (8 a 24 hod, 37°C, 5% CO₂) byla stanovena koncentrace ROS (dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.3.1.2).

4.3.3.2.3 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na expresi obranných stresových markerů

Působení AgNPs a Ag-I na Nrf2, HO-1, HSP27 a HSP90 bylo sledováno na úrovni exprese proteinu.

Příprava buněk pro experimenty

Buňky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.3.2.2.

Izolace buněčných extraktů

Po inkubaci (8 a 24 hod, 37°C, 5% CO₂) byly buňky opláchnuty ledovým PBS. Pro získání celkového buněčného extraktu byl na Petriho misku (3,5 cm) aplikován lyzační pufr (50 µl, 15 min, led). Buňky byly seškrábány do mikrozkušavky, vortexovány a inkubovány (15 min, 4 °C). Poté byly centrifugovány (10 min, 4 °C, 10 000 RPM) a supernatant obsahující celkový buněčný lyzátní roztok byl přenesen do nové mikrozkušavky.

Pro izolaci cytosolického a jaderného extraktu byly buňky opláchnuty a seškrábány do ledového PBS (1 ml), přeneseny do mikrozkušavky a centrifugovány (5 min, 4 °C, 4700 RPM). Po odstranění supernatantu byl pelet buněk resuspendován v ledovém pufru A (50 µl), inkubován (10 min, led) a centrifugován (10 min, 4 °C, 12 000 RPM). Supernatant obsahující cytosolický extrakt byl přenesen do nové mikrozkušavky. Pelet buněk obsahující jaderný extrakt byl resuspendován v pufru B (50 µl) a inkubován (30 min, led, 2x v průběhu inkubace vortexován). Jaderný extrakt byl získán centrifugací (20 min, 4 °C, 12 000 RPM).

V připravených extraktech byla metodou BCA (viz kapitola 4.3.6.2) stanovena koncentrace proteinů. Extrakty byly smíchány v poměru 4 : 1 se vzorkovým pufrům, denaturovány (5 min, 95 °C) a skladovány (-80 °C) pro pozdější stanovení Nrf2, HO-1, HSP27, HSP90.

Elektroforetické rozdělení a Western blot

Proteiny v buněčných extraktech byly rozděleny pomocí vertikální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). V aparatuře pro elektroforézu byl připraven 10% migrační a 4% zaostřovací polyakrylamidový gel o tloušťce 1 mm. Do jamek zaostřovacího gelu byly aplikovány vzorky s obsahem 25–50 µg proteinu/jamku. Elektroforéza byla provedena v migračním pufru při proudu 20 mA. Po dosažení migračního gelu byla hodnota proudu zvýšena na 40 mA.

Po elektroforetickém rozdělení byly proteiny přeneseny metodou Western blot na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu. Western blot byl proveden buď v tankovém uspořádání v přenosovém pufru (120 min, 400 mA, 4 °C) nebo metodou semi-dry blotting v Trans-Blot® Turbo™ Transfer buffer (14 min, 2 A, pokojová teplota). Kontrola přenesení proteinů byla provedena vizualizací v barvicím roztoku. Po oplachu (3x5 min, TBS) byla membrána ponořena do barvicího roztoku (1 min) a po kontrole přenosu proteinů byla odbarvena (2x5 min, methanol) a promyta (3x5 min, TBS).

Chemiluminiscenční detekce a hodnocení získaných dat

Po kontrole přenosu a promytí byla membrána blokována (2 hod, TBS/T/mléko) a inkubována s primární protilátkou (ředění viz Tabulka 1, 4°C, přes noc). Po inkubaci byla membrána promyta (3x5 min, TBS/T) a inkubována se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou (IgG-HRP, ředění viz Tabulka 1, pokojová teplota, 2 hod). Po promytí (3x5 min, TBS/T) následovala detekce. Pro detekci byly použity dva systémy: 1) chemiluminiscenční systém Western Blotting Luminol Reagent a vzniklá chemiluminiscence byla zaznamenána na fotografický papír nebo 2) WesternSure™ PREMIUM Chemiluminescent Substrate, kdy byla chemiluminiscence zaznamenána scannerem (C-DiGit™ Blot Scanner) a výstupem byl obrázek v počítači.

Pro opakované použití membrány, v případě detekce proteinů podobné molekulové hmotnosti, byla membrána zbavena navázaných protilátek aplikací stripovacího pufru (60 min, pokojová teplota) a postupně promyta 1000 ml dd H₂O.

Pro kontrolu množství naneseného vzorku byl detekován aktin, který zároveň sloužil k normalizaci množství studovaných proteinů. Hodnocení bylo provedeno denzitometricky pomocí volně dostupných programů ElfoMan 2.6 a ImageJ 1.42q.

Tabulka 1: Ředění primárních a sekundárních protilátek

Primární protilátka	Ředící roztok	Poměr
<i>Nrf2</i>	projasňovací roztok	1:500
<i>HO-1</i>	TBS/T/BSA	1:500
<i>HSP27</i>	projasňovací roztok	1:500
<i>HSP90</i>	TBS/T/BSA	1:500
<i>COX-2</i>	projasňovací roztok	1:500
<i>NF-κB</i>	TBS/T/BSA	1:500
<i>MMP-1</i>	TBS/T/BSA	1:500
<i>MMP-2</i>	TBS/T/BSA	1:500
<i>MMP-3</i>	TBS/T/BSA	1:500
<i>Aktin</i>	TBS/T/BSA	1:500
<i>p53</i>	TBS/T/BSA	1:500
<i>p16</i>	TBS/T/BSA	1:750
<i>p21</i>	TBS/T/BSA	1:300
<i>Lamin B</i>	TBS/T/BSA	1:500
<i>Vimentin</i>	TBS/T/BSA	1:750
Sekundární protilátka	Ředící roztok	Poměr
<i>goat anti-rabbit IgG-HRP</i>	TBS/T/mléko nebo projasňovací roztok (dle primární protilátky)	1:10000
<i>rabbit anti-goat IgG-HRP</i>	TBS/T/mléko nebo projasňovací roztok (dle primární protilátky)	1:10000
<i>goat anti-mouse IgG-HRP</i>	TBS/T/mléko nebo projasňovací roztok (dle primární protilátky)	1:10000

4.3.3.2.4 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na markery zánětu

Ovlivnění zánětlivé reakce AgNPs a Ag-I bylo sledováno na úrovni koncentrace IL-6 v médiu a exprese proteinů COX-2 a NF-κB.

Příprava buněk pro experimenty

Buňky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.3.2.2. Po inkubaci (8 a 24 hod, 37°C, 5% CO₂) bylo médium odebráno a zamraženo (-80°C) pro stanovení IL-6 metodou ELISA (postup uvedený v kapitole 4.3.3.1.3). Z buněk byly připraveny

celkové, cytosolické nebo jaderné extrakty, ve kterých byla exprese COX-2 a NF- κ B stanovena SDS-PAGE elektroforézou, Western blot analýzou a chemiluminiscenční detekcí (postup uvedený v kapitole 4.3.3.2.3).

4.3.3.2.5 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na zarůstání rány a migraci buněk

Ovlivnění zarůstání rány a migrace buněk AgNPs a Ag-I bylo sledováno rýhovým testem a expresí proteinu MMP-2.

Rýhový test

Rýhový test je standardní metoda používaná pro studium buněčné migrace, která je pro hojení ran nezbytná [37]. U delších časových intervalů je rovněž možné sledovat zarůstání rýhy.

Příprava buněk pro experimenty

Koncentrace buněk byla stanovena na základě barvení trypanovou modří. HDF ($1,9 \times 10^5$ buněk/ml) byly vysety v kultivačním médiu na 24-jamkové desky (0,5 ml suspenze buněk/jamku) a inkubovány (37 °C, 5 % CO₂, 24 hod). Po inkubaci byly buňky sterilně poškrábány 1x 200 μ l pipetovací špičkou, médium vyměněno za médium pro experimenty a buňky inkubovány (1 hod, 42 °C).

Po inkubaci byly buňky opláchnuty sterilním PBS a aplikováno 0,5 ml média pro experimenty obsahujícího testované látky v koncentračním rozmezí AgNPs (0,25; 2,5 a 25 μ g/ml) a Ag-I (0,025; 0,1 a 0,25 μ g/ml). Kontrolní buňky byly připraveny inkubací v médiu pro experimenty bez testovaných látek bez FBS (negativní kontrola) nebo inkubací v kultivačním médiu bez testovaných látek s FBS (pozitivní kontrola). Po 24 nebo 48 hod inkubaci (37°C, 5% CO₂) bylo médium odsáto, buňky opláchnuty roztokem PBS (2x0,5 ml) a aplikován barvicí roztok (0,5 ml, 10 min). Poté byly buňky důkladně opláchnuty dd H₂O a vysušeny. Po vysušení byly rýhy nafoceny a jejich plocha byla hodnocena pomocí programu Centerline. Vliv AgNPs a Ag-I na zarůstání rýhy byl vyhodnocen porovnáním s negativní kontrolou.

Stanovení exprese MMP-2

Buňky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.3.2.2.

Po inkubaci (8 a 24 hod, 37°C, 5% CO₂) bylo médium odstraněno a z buněk byly připraveny celkové extrakty, ve kterých byla exprese MMP-2 stanovena SDS-PAGE

elektroforézou, Western blot analýzou a chemiluminiscenční detekcí (postup uvedený v kapitole 4.3.3.2.3).

4.3.4 STUDIUM MOŽNÉHO VYUŽITÍ SENPS K HOJENÍ RAN

4.3.4.1 Stanovení antimikrobiálního účinku SeNPs

Příprava bakterií a kvasinek pro experimenty

Bakteriální/kvasinkové kmeny byly vyočkovány z Petriho misek (10 cm²) na krevní nebo Sabouraudův agar (TRIOS) a inkubovány (24 hod, 35°C). Po inkubaci byly odebrány 2-3 kolonie, resuspendovány ve fyziologickém roztoku (2 ml) a stanovena hustota pomocí denzilometru (LaChema).

Na 96-jamkovou kultivační desku bylo nejprve aplikováno 100 µl mozko-srdcového bujónu obsahující SeNPs (autoklávované/neautoklávované) v koncentračním rozmezí (0,39–100 µg/ml). Následně byla pomocí inokulačního ježka naočkována do jednotlivých jamek mikrobiální suspenze (1 µl/jamku) o koncentraci 1×10^6 (bakterií/kvasinek)/ml CFU (colony forming units). Po inkubaci (24 hod bakterie; 48 hod kvasinky; 35°C) bylo provedeno vizuální hodnocení (vytvoření zákalu). Jamka s nejnižší koncentrací testované látky, ve které se nevytvořil zákal, byla vyhodnocena jako jamka s minimální inhibiční koncentrací (MIC). Poté byl pomocí očkovačního ježka obsah jamek bez zákalu (5 µl) přeočkován na krevní (bakterie) nebo Sabouraudův (kvasinky) agar. Po inkubaci (24 hod bakterie; 48 hod kvasinky; 35°C) bylo provedeno vizuální hodnocení minimální bakteriostatické (MBS) a baktericidní (MBC) koncentrace. Kontrolní bakterie/kvasinky byly kultivovány v mozko-srdcovém bujónu bez SeNPs. Testy byly provedeny v dubletech.

4.3.4.2 Stanovení nežádoucích účinků SeNPs

Poškození HDF účinkem SeNPs bylo sledováno jako aktivita mitochondriálních dehydrogenáz (MTT test), generace ROS a zvýšení hladiny IL-6 v médiu.

Příprava buněk pro experimenty

Buňky byly připraveny dle postupů uvedených v kapitolách 4.3.3.1.1–4.3.3.1.3. SeNPs byly připraveny v médiu pro experimenty v koncentračním rozmezí

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

0,2–50 µg/ml (MTT test) a 6,25; 12,5 a 25 µg/ml (ROS a IL-6). Kontrolní buňky byly připraveny inkubací v médiu pro experimenty bez SeNPs.

Stanovení a vyhodnocení MTT testu, generace ROS a koncentrace IL-6 bylo provedeno dle postupů uvedených v kapitolách 4.3.3.1.1–4.3.3.1.3.

4.3.4.3 Experimentální model rány

Pro simulaci rány byla použita modifikovaná standardní metoda pro studium hojení ran [37].

4.3.4.3.1 Stanovení vlivu SeNPs na expresi obranných stresových markerů, markerů zánětu a markerů zapojených do procesu hojení ran

Ovlivnění obranné odpovědi, zánětlivé reakce a zarůstání ran SeNPs bylo sledováno na úrovni exprese proteinů.

Příprava buněk pro experimenty

Buňky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.3.2.2.

SeNPs byly připraveny v médiu pro experimenty v koncentracích 6,25; 12,5 a 25 µg/ml. Kontrolní buňky byly připraveny inkubací v médiu pro experimenty bez SeNPs.

Po inkubaci (8 a 24 hod, 37°C, 5% CO₂) bylo médium odebráno a zamraženo (-80°C) pro stanovení IL-6 metodou ELISA (postup uvedený v kapitole 4.3.3.1.3). Z buněk byly připraveny celkové, cytosolické nebo jaderné extrakty (postup uvedený v kapitole 4.3.3.2.3). Exprese obranných stresových markerů (HO-1, HPS27 a HSP90), markeru zánětu (COX-2) a markerů zapojených do procesu hojení ran (MMP-1, MMP-2 a MMP3) byla stanovena SDS-PAGE elektroforézou, Western blot analýzou a chemiluminiscenční detekcí (postup uvedený v kapitole 4.3.3.2.3).

4.3.5 STUDIUM VYUŽITÍ LIDSKÉHO SÉRA PRO REGENERATIVNÍ MEDICÍNU

Studované vzorky lidského séra (LS) byly rozděleny do pěti skupin podle věku a fyzického stavu dárců viz Tabulka 2. Vzorky LS byly připraveny jako směs od 3 dárců.

Tabulka 2: Vzorky lidského séra

Skupina dárců	Označení vzorků	Průměrný věk dárců
<i>30letí</i>	LS30	34,14 ± 1,05
<i>70letí</i>	LS70	71,33 ± 1,69
<i>90letí</i>	LS90	91,67 ± 1,37
<i>100letí v dobrém fyzickém stavu</i>	LS100z	101,67 ± 1,69
<i>100letí ve špatném fyzickém stavu</i>	LS100n	102,00 ± 1,41

4.3.5.1 Stanovení optimální koncentrace HDF pro experimenty s LS

Příprava buněk pro experimenty

Koncentrace buněk byla stanovena na základě barvení trypanovou modří. HDF (1×10^3 , 2×10^3 a 4×10^3 buněk/cm²) byly připraveny v kultivačním médiu LS (dárce 36 let), vysety na 6-jamkové desky (1,5 ml suspenze/jamku) a inkubovány (37 °C, 5 % CO₂). V průběhu kultivace byl pravidelně kontrolován růst a vzhled buněk. Po 8 denní kultivaci byly buňky spočítány a vybrána optimální koncentrace pro následující analýzy. Kontrolní buňky byly připraveny v kultivačním médiu s FBS.

4.3.5.2 Stanovení vlivu LS na morfologii a proliferaci HDF

Ovlivnění morfologie buněk LS bylo stanoveno mikroskopicky. Vliv LS na proliferaci byl stanoven mikroskopicky (počet buněk/cm² a výpočet zdvojnásobení počtu buněk) a Western blot analýzou (exprese transkripčního faktoru p53).

Příprava buněk pro experimenty

Koncentrace buněk byla stanovena na základě barvení trypanovou modří. HDF (4×10^3 buněk/cm²) byly připraveny v kultivačním médiu LS (různí dárce: LS30, LS70, LS90, LS100z, LS100n), vysety na 6-jamkové desky (1,5 ml suspenze/jamku) a inkubovány (37 °C, 5 % CO₂). Každý 3. nebo 4. den bylo kultivační médium vyměněno za čerstvé obsahující příslušné sérum. Během kultivace byl pravidelně kontrolován a focen růst a vzhled buněk.

Po dosažení konfluence (7. den) byly buňky opláchnuty PBS (2x1 ml) a uvolněny inkubací s 0,25% roztokem trypsinu s EDTA (400 μ l, 37°C). Po uvolnění buněk byl trypsin inaktivován inhibítoem trypsinu ze sóje (1 mg/ml PBS), buňky spočítány, centrifugovány (8 min, 1200 RPM, pokojová teplota) a po odstranění supernatantu zamraženy (-80°C). Kontrolní buňky byly připraveny v kultivačním médiu s FBS.

Morfologie buněk byla hodnocena mikroskopicky s použitím mikroskopu Nikon eclipse TS 100 (Nikon Instruments Inc., USA).

Počet zdvojení (proliferace) byl vypočten podle následujícího vztahu [108]:

$$\text{Log} \frac{\text{počet buněk na konci kultivace}}{\text{počet buněk na začátku kultivace}} \times \frac{1}{\text{Log}2}$$

Pro srovnání dat pro jednotlivá LS byly hodnoty normalizovány vzhledem ke kontrolním buňkám kultivovaným v médiu s FBS:

$$\frac{\text{počet zdvojení buněk inkubovaných v médiu s LS}}{\text{počet zdvojení buněk inkubovaných v médiu s FBS}}$$

Expres transkripčního faktoru p53

Po dosažení konfluence byly z buněk připraveny celkové lyzáty, ve kterých byla exprese transkripčního faktoru p53 stanovena SDS-PAGE elektroforézou, Western blot analýzou a chemiluminiscenční detekcí (postup uvedený v kapitole 4.3.3.2.3.). Ředění protilátek viz Tabulka 1.

4.3.5.3 Stanovení vlivu LS na životnost HDF

Vliv LS na životnost HDF byla stanovena jako množství propidium jodid (PI) pozitivních buněk průtokovou cytometrií.

Příprava buněk pro experimenty

Buňky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5.2. Ke stanovení vlivu LS na životnost byly použity vzorky LS30 a LS90.

Stanovení PI pozitivních buněk

Propidium jodid (PI) je barvivo, které neprochází membránou živých buněk. Dojde-li však k jejímu porušení, PI vstupuje do buňky a váže se do dvoušroubovice

DNA. PI je možno excitovat při vlnové délce 488 nm a stanovit tak poškozené buňky [127].

Po dosažení konfluence (7. den) bylo odebráno médium, které bylo před vlastní analýzou přidáno zpět k buňkám, aby se do analýzy dostaly i mrtvé (plovoucí) buňky. Buňky byly opláchnuty PBS (2x1 ml) a uvolněny inkubací s trypsinem. Po centrifugaci byl pelet resuspendován v PBS tak, aby výsledná koncentrace buněk ve vzorcích byla 1×10^5 buněk / 0,5 ml PBS. Následně byl přidán PI pufr (15 μ l) a vzorky byly inkubovány (20 min, 4°C, tma). Kontrolní buňky byly připraveny bez přídavku PI pufru. Po inkubaci byla měřena fluorescence pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton & Dickinson Pharmingen, USA) s argonovým iontovým laserem při 488 nm. Získaná data byla vyhodnocena v Cell Quest softwaru.

4.3.5.4 Stanovení vlivu LS na buněčný cyklus HDF

Ovlivnění buněčného cyklu LS bylo stanoveno průtokovou cytometrií.

Příprava buněk pro experimenty

Buňky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5.2. Pro stanovení vlivu LS na buněčný cyklus byly použity vzorky LS30 a LS90.

Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Biparametrická analýza DNA pomocí průtokové cytometrie umožňuje rozdělit buňky do jednotlivých fází buněčného cyklu na základě obsahu DNA, na kterou se po permeabilizaci buněčné stěny tenzidem váže PI. Buňky v G2/M fázi se vyznačují zdvojnásobenou DNA ve srovnání s buňkami v G0/G1 fázi. Buňky v S-fázi jsou pak detekovány pomocí inkorporace chemicky upraveného uridinu – BrdU do nově vznikající DNA díky specifickým imunofluorescenčně značeným protilátkám [127].

Po dosažení konfluence (7. den) byla do kultivačního média v jamkách přidána BrdU-myší monoklonální protilátka (finální koncentrace 10 μ mol/l). Po inkubaci (30 min, 37°C) byly buňky opláchnuty PBS (2x1 ml), uvolněny inkubací s trypsinem, spočítány a přeneseny do zkumavky pro průtokový cytometr (každý vzorek obsahoval přibližně 1×10^6 buněk). Následně byl přidán ledový PBS/T (2 ml) a po promíchání byly vzorky centrifugovány (2 min, 2000 RPM, 4°C). Supernatant byl odstraněn a pelet nejprve resuspendován v malém množství ledového PBS/T (200 μ l), následně

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

byl přidán další díl PBS/T (1,8 ml) a po promíchání centrifugován (2 min, 2000 RPM; 4 °C). Získaný pelet byl resuspendován v ledovém PBS/T (0,5 ml) a přidán roztok HCl (0,5 ml, 4 mol/l). Směs byla důkladně zvortexována a inkubována (30 min, pokojová teplota).

Po inkubaci byla směs centrifugována (2 min, 2000 RPM; 4 °C), supernatant odstraněn a zbytková HCl neutralizována přidávkem roztoku boraxu (1 ml, 0,1 mol/l). Po centrifugaci (2 min, 2000 RPM; 4 °C) byl pelet resuspendován v ledovém PBS/T (200 µl) a inkubován s Anti-BrdU myší monoklonální protilátkou (finální koncentrace 5 µg/ml, 1 hod, 4°C)

Po inkubaci byl pelet promyt ledovým PBS/T (3x2 ml), centrifugován (2 min, 2000 RPM; 4 °C) a inkubován se sekundární protilátkou značenou FITC (goat-anti mouse, ředění 1:500, 30 min, 4°C, tma). Po promytí ledovým PBS/T (3x2 ml) a centrifugaci (2 min, 2000 RPM; 4 °C) byl získaný pelet resuspendován v ledovém PBS/T (150 µl) a pro kontrastní nabarvení buněk inkubován s PI pufrem (150 µl, 15 min, 4°C).

Následně byla provedena biparametrická analýza DNA pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton & Dickinson Pharmingen, USA) a Cell Quest softwaru, jejímž výstupem bylo procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

4.3.5.5 Stanovení vlivu LS na senescenci HDF

Vliv LS na stárnutí HDF byl sledován jako množství inhibitorů cyklín dependentních kináz p16 a p21 a laminu B (SDS-PAGE elektroforézou, Western blot analýzou a chemiluminiscenční detekcí) a jako exprese enzymu β -galaktosidázy (mikroskopicky).

4.3.5.5.1 *Exprese inhibitorů cyklín dependentních kináz p16 a p21 a laminu B*

Příprava buněk pro experimenty

Buňky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5.2. a z takto získaných buněk byly připraveny celkové lyzáty, ve kterých bylo množství inhibitorů p16 a p21 a laminu B stanoveno SDS-PAGE elektroforézou, Western blot analýzou a chemiluminiscenční detekcí (postup uvedený v kapitole 4.3.3.2.3). Ředění protilátek viz Tabulka 1.

4.3.5.5.2 *β-gal barvení*

β -galaktosidáza katalyzuje hydrolyzu terminálních neredukujících zbytků β -D-galaktózy v β -D-galaktosidech, což se u 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktosidu (X-gal) projevuje vznikem modrého zbarvení, které lze pozorovat mikroskopicky [128, 129].

Příprava buněk pro experimenty

Koncentrace buněk byla stanovena na základě barvení trypanovou modří. HDF (4×10^3 buněk/cm²) byly připraveny v kultivačním médiu LS (různí dárce: LS30, LS70, LS90, LS100z, LS100n), vysety na 4-jamkové desky (1,39 cm²) a inkubovány (37 °C, 5 % CO₂). Každý 3. nebo 4. den bylo kultivační médium vyměněno za čerstvé obsahující příslušné sérum.

Po dosažení subkonfluency (6. den) bylo médium odsáto, buňky promyty PBS (2x500 μ l, 30 sekund) a zafixovány roztokem formaldehydu (0,5 ml, 3% v PBS). Po inkubaci (5 min) byly buňky opláchnuty PBS (2x500 μ l, 30 sekund) a po vysušení byl aplikován barvicí roztok (500 μ l, 37 °C, 16 hod). Po inkubaci byl barvicí roztok odstraněn, buňky promyty PBS (2x500 μ l, 30 sekund) a aplikován methanol (250 μ l, 30 sekund). Po odsátí methanolu a usušení byly senescetní (β -gal pozitivní buňky) detekovány mikroskopicky s použitím mikroskopu Nikon eclipse TS 100 (Nikon Instruments Inc., USA).

4.3.5.6 Stanovení vlivu LS na adhezi HDF

Vliv LS na adhezi HDF byl sledován jako množství vimentinu (SDS-PAGE elektroforézou, Western blot analýzou a chemiluminiscenční detekcí).

Příprava buněk pro experimenty

Buňky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5.2. Z buněk byly připraveny celkové lyzáty, ve kterých bylo množství vimentinu stanoveno SDS-PAGE elektroforézou, Western blot analýzou a chemiluminiscenční detekcí (postup uvedený v kapitole 4.3.3.2.3). Ředění protilátky viz Tabulka 1.

4.3.5.7 Stanovení mykoplazmat

Ověření nepřítomnosti mykoplazmat v buněčné kultuře HDF bylo provedeno fluorescenčním barvením.

Příprava buněk pro experimenty

Koncentrace buněk byla stanovena na základě barvení trypanovou modří. HDF ($2,6 \times 10^4$ buněk/cm²) byly připraveny v kultivačním médiu LS (různí dárci: LS30 a LS90), vysety na mikroskopické sklíčko umístěné na dně 4-jamkové desky (1,39 cm²) a inkubovány (24 hod, 37 °C, 5 % CO₂).

Detekce mykoplazmat

Mykoplazmata v buněčné kultuře lze detekovat fluorescenčním barvivem např. bisbenzamidinem H (Hoechst), které se váže na DNA mykoplazmat. Navázání barviva na DNA mykoplazmat u kontaminované buňky se projeví malými zářivými body v cytoplazmě kolem velkého a výrazného buněčného jádra. U negativních buněk je viditelné pouze jádro [130].

Po inkubaci byl do média na mikroskopickém sklíčku aplikován fixační roztok (500 µl; 2 min). Následně byl roztok odstraněn a nahrazen čerstvým fixačním roztokem (500 µl, 5 min) a postup byl opakován 2krát. Poté bylo sklíčko opláchnuto PBS (500 µl, 5 min) a aplikován barvicí roztok (500 µl). Po inkubaci (10 min, tma) bylo sklíčko promyto dd H₂O (3x3 min, 500 µl) a namontováno na podložní sklíčko. Vyhodnocení bylo provedeno na fluorescenčním mikroskopu Nikon Ni-E s kamerou Nikon DS-QiMc.

4.3.6 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

4.3.6.1 Metoda dle Bradfordové

Množství proteinů ve vzorcích pro detekci generace ROS bylo stanoveno dle metody Bradfordové [131]. Metoda je založena na tvorbě komplexu mezi barvivem Coomassie brilantovou modří G-250 a proteiny ve vzorku. Coomassie brilantová modř G-250 se vyskytuje ve třech formách: kation (470 nm; červený), neutrální molekula (650 nm; zelená) a anion (595 nm; modrý). Vazbou proteinu se stabilizuje aniontová forma, což vede ke změně zbarvení, které je změřeno fotometricky při 595 nm.

K 20 µl standardu / vzorku smíchaného v poměru 1:1 s PBS bylo přidáno 200 µl pracovního roztoku a po promíchání byla do 5 minut měřena absorbance. Množství proteinů bylo vypočteno z kalibračního grafu závislosti absorbance na koncentraci standardu.

4.3.6.2 Metoda BCA

Množství proteinů ve vzorcích pro stanovení exprese proteinů Western blot analýzou bylo stanoveno metodou využívající sodnou sůl kyseliny bicinchoninové (BCA) [132]. Metoda je založena na alkalické redukci měďnatých iontů proteinem na ionty měďné a následné chelataci měďných iontů kyselinou bicinchoninovou. Vzniklý barevný produkt je změřen fotometricky při 562 nm.

K 20 μ l standardu / vzorku smíchaného v poměru 1:1 s PBS bylo přidáno 200 μ l pracovního roztoku (BCATM protein assay kit) a po promíchání, inkubaci (30 min, 37°C) a ochlazení na pokojovou teplotu byla měřena absorbance. Množství proteinů bylo vypočteno z kalibračního grafu závislosti absorbance na koncentraci standardu.

4.3.7 STATISTICKÁ ANALÝZA

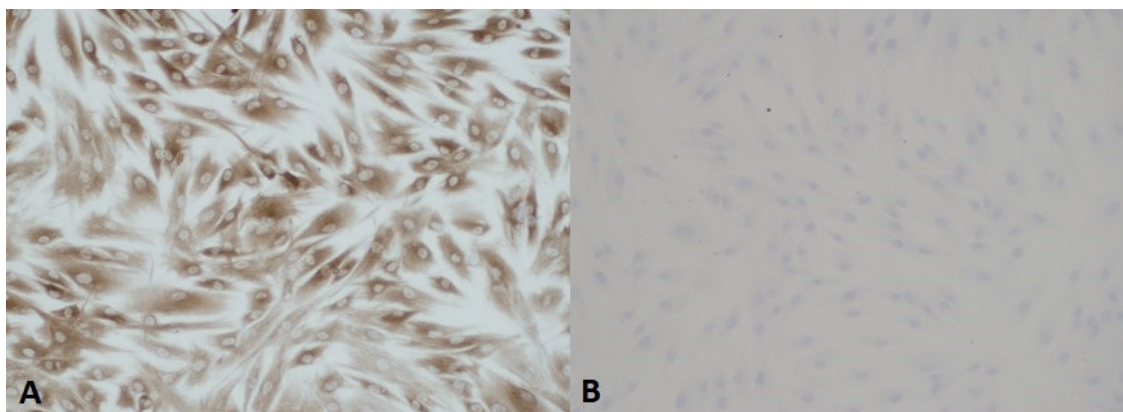
Všechny experimenty byly provedeny v tripletech ve třech nezávislých opakováních, pokud není uvedeno jinak. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD.

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu MS Excel 2010 (Microsoft, USA) F-testem a Studentovým t-testem na hladinách významnosti $p < 0,05$; 0,01 a 0,001. K porovnání rozdílů v růstu buněk inkubovaných s různými typy lidského séra bylo použito Kruskal-Wallisovo neparametrické vícečetné srovnání pro testování středového rozpětí skupin a pro zhodnocení zdvojení buněk ANOVA parametrické vícečetné testování s Bonferroni post-hoc korekcí v programu Statistica 8.1 (StatSoft, Inc., USA).

5 Výsledky

5.1 Mikroskopická charakterizace HDF

Při izolaci lidských kožních fibroblastů (HDF) ze vzorků kůže může výjimečně dojít ke kontaminaci lidskými kožními keratinocyty. Pro ověření, zda izolované buňky byly pouze fibroblasty, bylo provedeno imunohistochemické barvení vimentinu (vyskytuje se v HDF a v keratinocytech) a cytokeratinu 14 (specifický pro keratinocyty) a morfologické hodnocení. Získané výsledky prokázaly, že více jak 90 % buněk bylo pozitivní na vimentin (Obr. 12 A) a negativní na cytokeratin 14 (Obr. 12 B). Rovněž morfologie buněk, vřetenovité buňky s výrazným jádrem, odpovídala typickému vzhledu fibroblastů. Na základě těchto výsledků byla vyloučena kontaminace keratinocyty.



Obrázek 12. Imunohistochemické barvení buněk. HDF pozitivní na vimentin (A) a negativní na cytokeratin (B). Zvětšeno 200x.

5.2 Studium zapojení AgNPs a Ag-I do procesu hojení ran

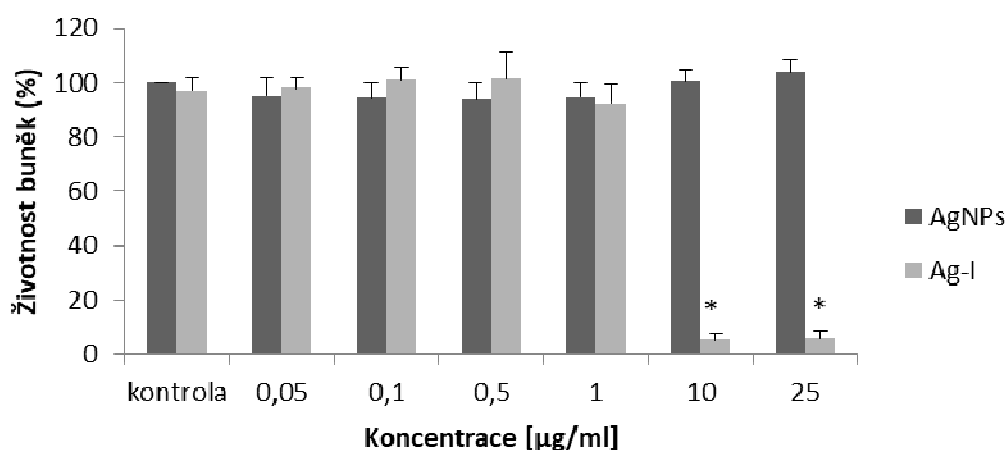
5.2.1 STANOVENÍ NEŽÁDOUCÍCH ÚČINKŮ AGNPS A AG-I NA HDF

5.2.1.1 Stanovení toxicity AgNPs a Ag-I

Toxicita AgNPs ($10,43 \pm 4,74$ nm) a Ag-I (roztok AgNO_3) byla stanovena MTT testem na buněčném modelu HDF. Vzorky AgNPs a Ag-I byly připraveny v médiu pro experimenty v koncentračním rozmezí 0,05–25 $\mu\text{g/ml}$. Kontrolní buňky byly připraveny v médiu pro experimenty bez AgNPs a Ag-I.

VÝSLEDKY

U HDF kultivovaných v médiu s obsahem AgNPs nebyl pozorován pokles životnosti buněk v celém koncentračním rozmezí (Obr. 13), zatímco u buněk inkubovaných s Ag-I byl pozorován statisticky významný pokles životnosti v koncentracích 10 a 25 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 13). Ze získaných výsledků byla u Ag-I stanovena hodnota IC_{50} $3,1 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$. Koncentrace AgNPs (0,25; 2,5; 25 $\mu\text{g/ml}$) a Ag-I (0,025; 0,1; 0,25 $\mu\text{g/ml}$), které způsobily snížení životnosti buněk do 10%, byly považovány za netoxické a byly použity pro následující experimenty.

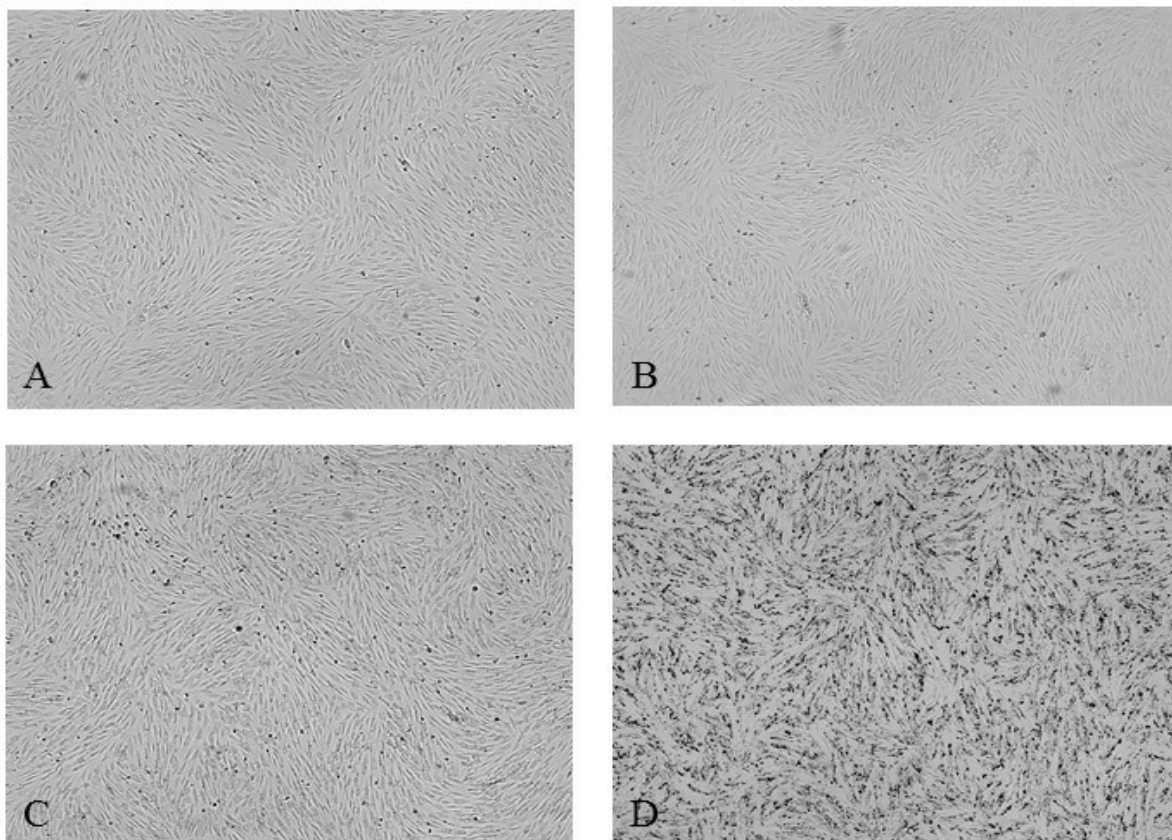


Obrázek 13. Toxicita AgNPs a Ag-I stanovená MTT testem u HDF po 24 hod kultivaci. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze čtyř měření. Hodnoty $*P \leq 0,05$ jsou statisticky odlišné od kontroly.

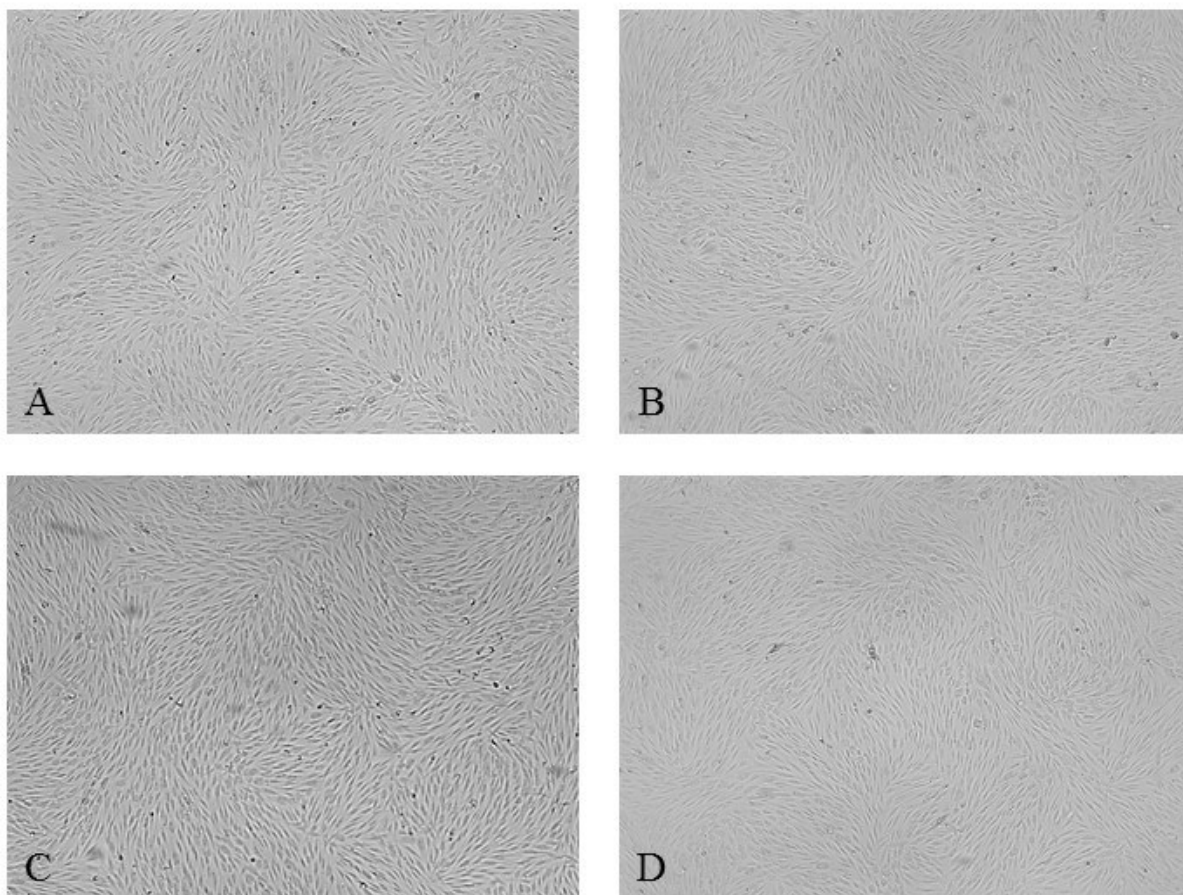
Poškození buněk vlivem AgNPs a Ag-I bylo hodnoceno rovněž mikroskopicky. Z obr. 14 (B-D) je patrné, že AgNPs (0,25; 2,5; 25 $\mu\text{g/ml}$, 24 hod) nevyvolaly žádné změny buněčné morfologie ve srovnání s kontrolou, kterou představovaly HDF inkubované v médiu pro experimenty bez AgNPs (Obr. 14 A). U vyšších koncentrací AgNPs (2,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$) byly na buňkách pozorovány shluky nanočástic (Obr. 14 C a D).

V případě Ag-I (0,025; 0,1; 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 24 hod) nebyly rovněž pozorovány žádné změny buněčné morfologie (Obr. 15 B-D) ve srovnání s kontrolou (Obr. 15 A).

VÝSLEDKY



Obrázek 14. Vliv AgNPs na buněčnou morfologii. HDF byly inkubovány (24 hod) v médiu pro experimenty bez AgNPs (A) kontrola; a s obsahem AgNPs (B) 0,25 µg/ml, (C) 2,5 µg/ml a (D) 25 µg/ml. Zvětšeno 50x.

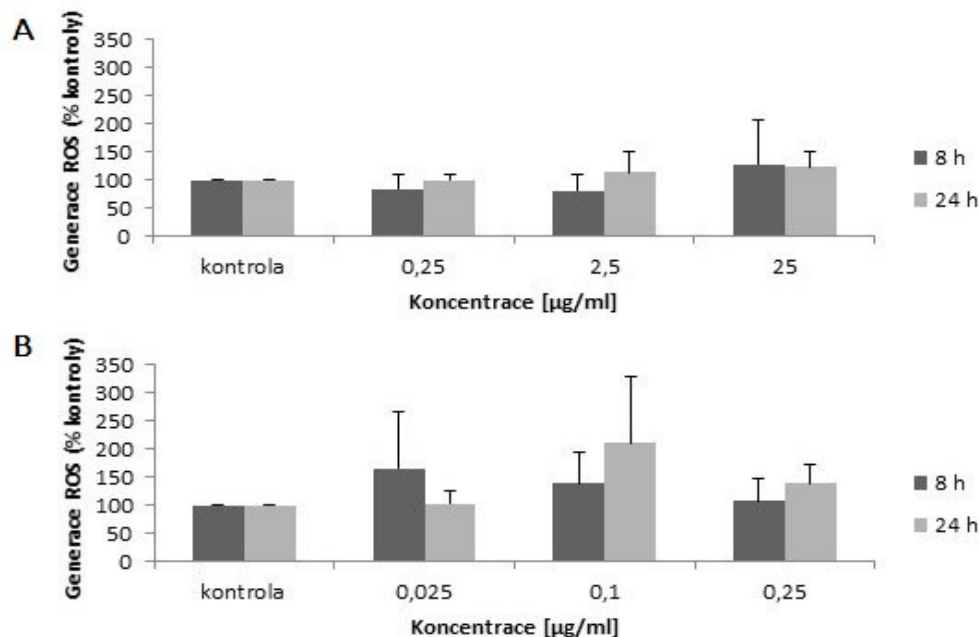


Obrázek 15. Vliv Ag-I na buněčnou morfologii. HDF byly inkubovány (24 hod) v médiu pro experimenty bez Ag-I (A) kontrola; a s obsahem Ag-I (B) 0,025 µg/ml, (C) 0,1 µg/ml a (D) 0,25 µg/ml. Zvětšeno 50x.

5.2.1.2 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na produkci ROS

U koncentrací AgNPs (0,25, 2,5 a 25 µg/ml) a Ag-I (0,025, 0,1 a 0,25 µg/ml), které byly v MTT testu hodnoceny jako netoxické, bylo ověřeno, zda u HDF nevyvolávají oxidační stres. Generace ROS byla stanovena využitím sondy dihydrofluorescein diacetátu po 8 a 24 hod inkubaci HDF s AgNPs a Ag-I.

Získané výsledky ukázaly, že AgNPs (Obr. 16 A) a Ag-I (Obr. 16 B) nemají statisticky významný vliv na generaci ROS ve srovnání s kontrolou.



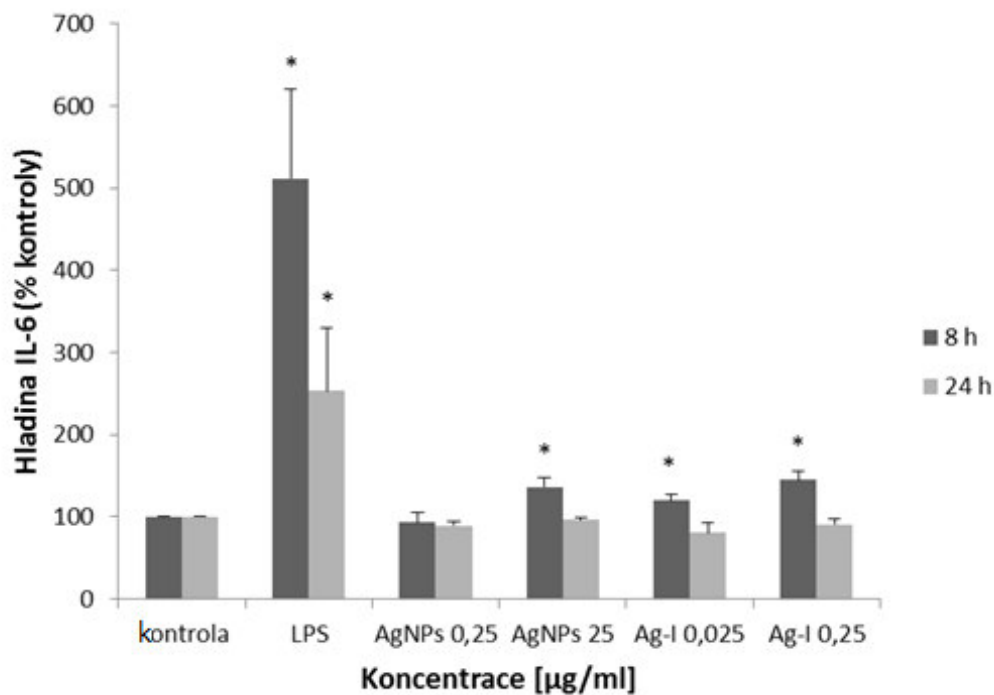
Obrázek 16. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na generaci ROS. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření.

5.2.1.3 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na markery zánětu

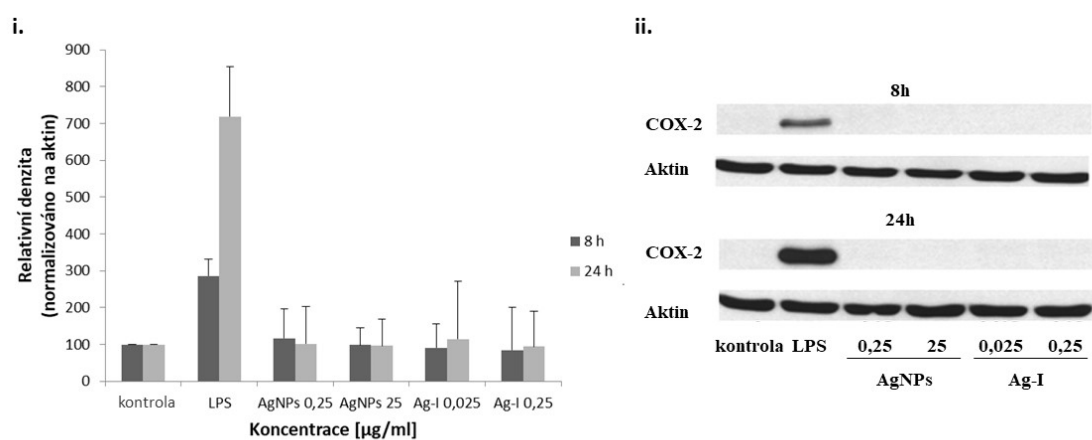
U netoxických koncentrací AgNPs (0,25 a 25 $\mu\text{g/ml}$) a Ag-I (0,025 a 0,25 $\mu\text{g/ml}$) byl po 8 a 24 hod rovněž studován vliv na koncentraci IL-6 v médiu metodou ELISA a na expresi COX-2 metodou Western blot analýzy.

Výsledky na Obr. 17 ukazují, že AgNPs v koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$ a Ag-I v koncentracích 0,025 a 0,25 $\mu\text{g/ml}$ zvyšují hladinu IL-6 po 8 hod. Po 24 hod byla koncentrace tohoto cytokinu zpět na úrovni kontroly. V případě COX-2 nebyl pozorován žádný vliv AgNPs a Ag-I v porovnání s kontrolou (Obr. 18).

VÝSLEDKY



Obrázek 17. Vliv AgNPs a Ag-I na hladinu IL-6. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze čtyř měření. Hodnoty $*P \leq 0,05$ jsou statisticky odlišné od kontroly. LPS – lipopolysacharid.



Obrázek 18. Vliv AgNPs a Ag-I na expresi COX-2. i) Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze tří měření. ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření. LPS – lipopolysacharid.

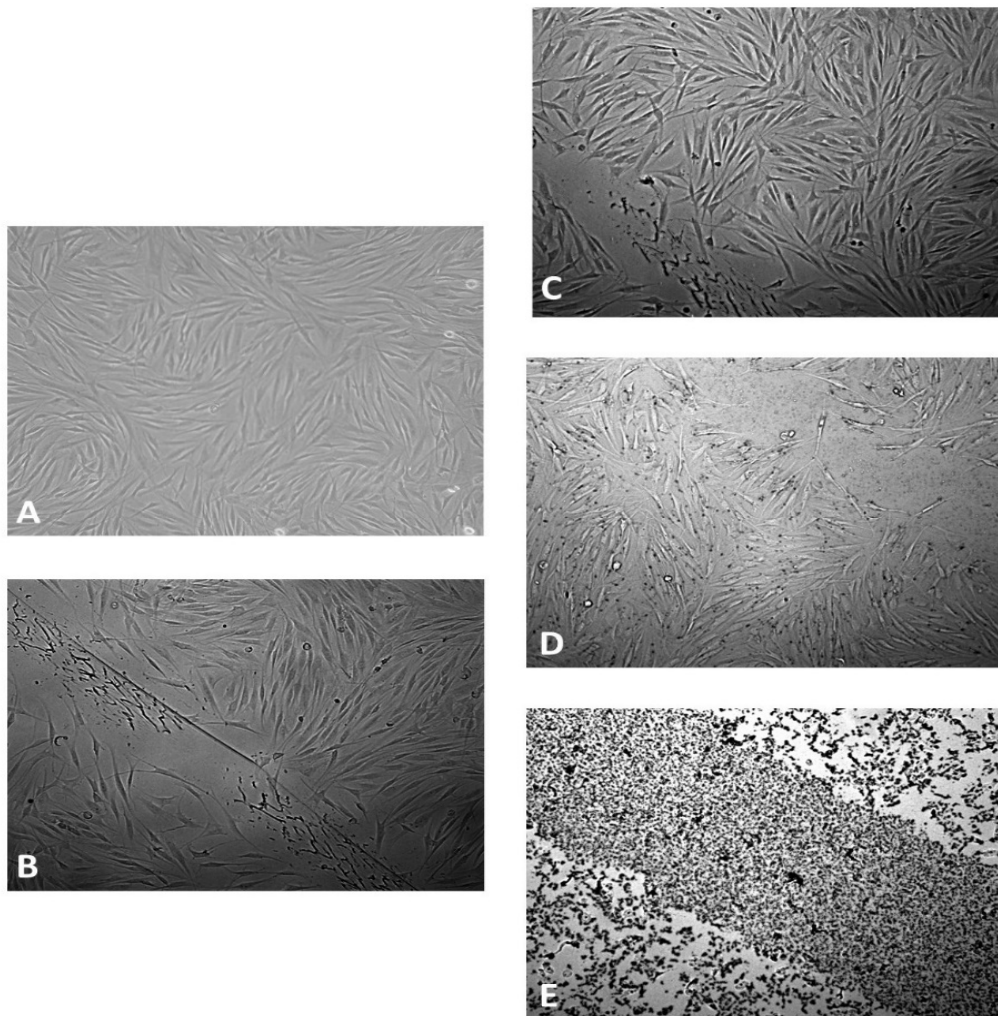
5.2.2 EXPERIMENTÁLNÍ MODEL RÁNY

Pro simulaci rány byla použita modifikovaná standardní metoda pro studium hojení ran [37]. Aby se buněčný model co nejvíce podobal skutečné ráně, byly HDF před aplikací studovaných vzorků mechanicky poškozeny. Nejprve byly buňky poškrábané pipetovací špičkou (200 μ l) a zahřáté (1 hod, 42 °C) a teprve poté byly aplikovány AgNPs (0,25, 2,5 a 25 μ g/ml) a Ag-I (0,025, 0,1 a 0,25 μ g/ml) na dobu 8 a 24 hod. Teplota a doba zahřátí před aplikací studovaných vzorků byly vybrány na základě předchozích pokusů tak, aby nedošlo k toxickému působení na HDF a zároveň, aby byla pozorována změna exprese studovaných proteinů (data nejsou uvedena).

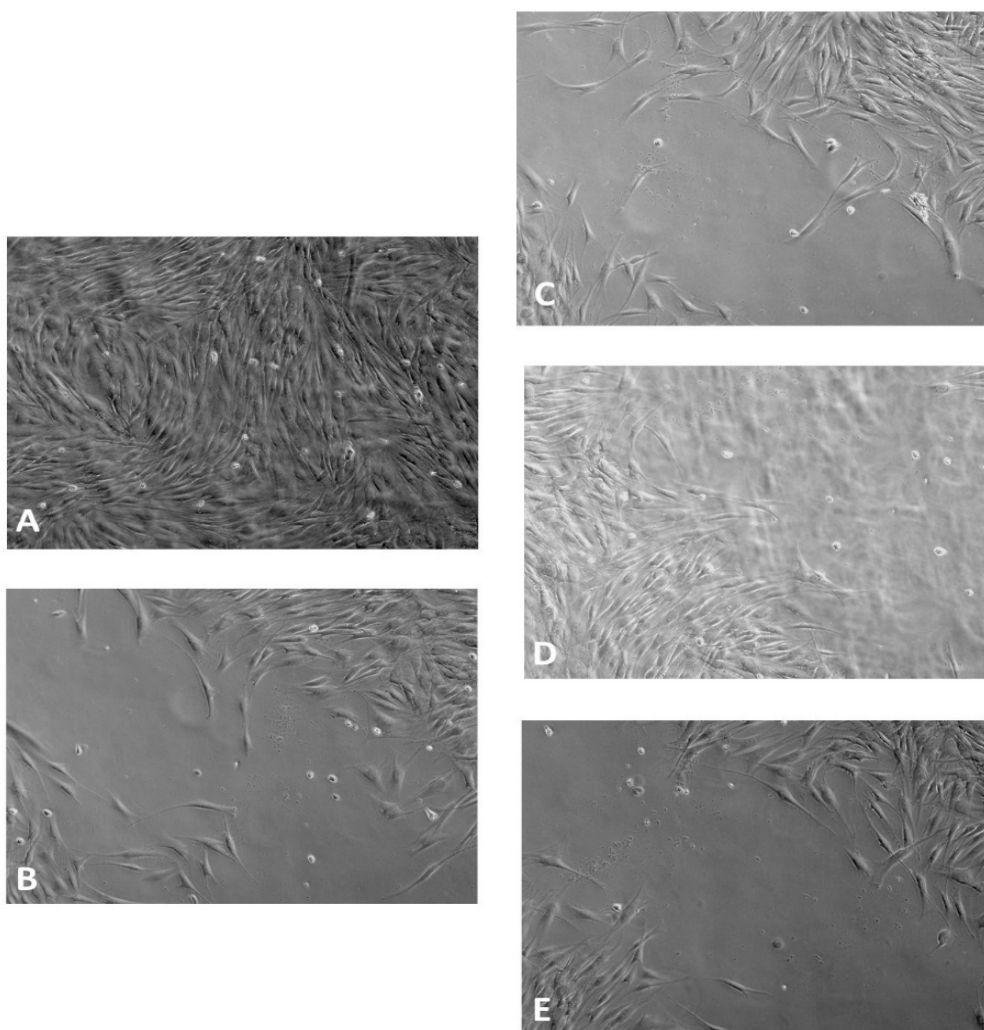
5.2.2.1 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na morfologii buněk

Na experimentálním modelu pro studium hojení ran byl nejprve sledován vliv AgNPs (0,25, 2,5 a 25 μ g/ml) a Ag-I (0,025, 0,1 a 0,25 μ g/ml) na morfologii HDF. Výsledky na Obr. 19 a 20 ukazují, že fibroblasty po 24 hod inkubaci s AgNPs a Ag-I vykazovaly typickou morfologii pro tento typ buněk. Nebyly pozorovány žádné změny morfologie ve srovnání s neškrábnutou a nezahřátou K1 (Obr. 19 A a 20 A) ani škrábnutou a zahřátou K2 kontrolou (Obr. 19 B a 20 B). Výjimkou byly HDF kultivované s AgNPs v koncentraci 25 μ g/ml (Obr. 19 E). Tato koncentrace byla příliš vysoká, nanočástice pokryly buňky a jejich morfologie se hodnotila velmi obtížně.

Jediná změna, která byla mikroskopicky pozorována, bylo zvýšení mobility fibroblastů v mezibuněčné matrix. Vzdálenosti mezi poškrábanými buňkami (Obr. 19 B-D a 20 B-E) byly větší než u nepoškrábaných a nezahřátých kontrol (Obr. 19 A a 20 A). Z tohoto důvodu byla buněčná morfologie hodnocena morfometrickou analýzou. Z výsledků uvedených v Tabulce 3 je patrné, že AgNPs a Ag-I neovlivňují D/Š index. U J/C poměru byl zaznamenán statisticky významný pokles u AgNPs v koncentraci 0,25 μ g/ml a statisticky významný nárůst u Ag-I v koncentraci 0,1 μ g/ml.



Obrázek 19. Vliv AgNPs na morfologii HDF sledovanou na experimentálním modelu pro studium hojení ran. (A) K1 (nepoškrábané a nezahřáté HDF), (B) K2 (poškrábané a zahřáté HDF), HDF inkubované v experimentálním médiu s AgNPs (C) 0,25 $\mu\text{g/ml}$, (D) 2,5 $\mu\text{g/ml}$ a (E) 25 $\mu\text{g/ml}$. Zvětšeno 100x.



Obrázek 20. Vliv Ag-I na morfologii HDF sledovanou na experimentálním modelu pro studium hojení ran. (A) K1 (nepoškrábané a nezahřáté HDF), (B) K2 (poškrábané a zahřáté HDF), HDF inkubované v experimentálním médiu s Ag-I (C) 0,025 µg/ml, (D) 0,1 µg/ml a (E) 0,25 µg/ml. Zvětšeno 100x.

Tabulka 3: Morfometrická analýza HDF stanovená na experimentálním modelu pro studium hojení ran.

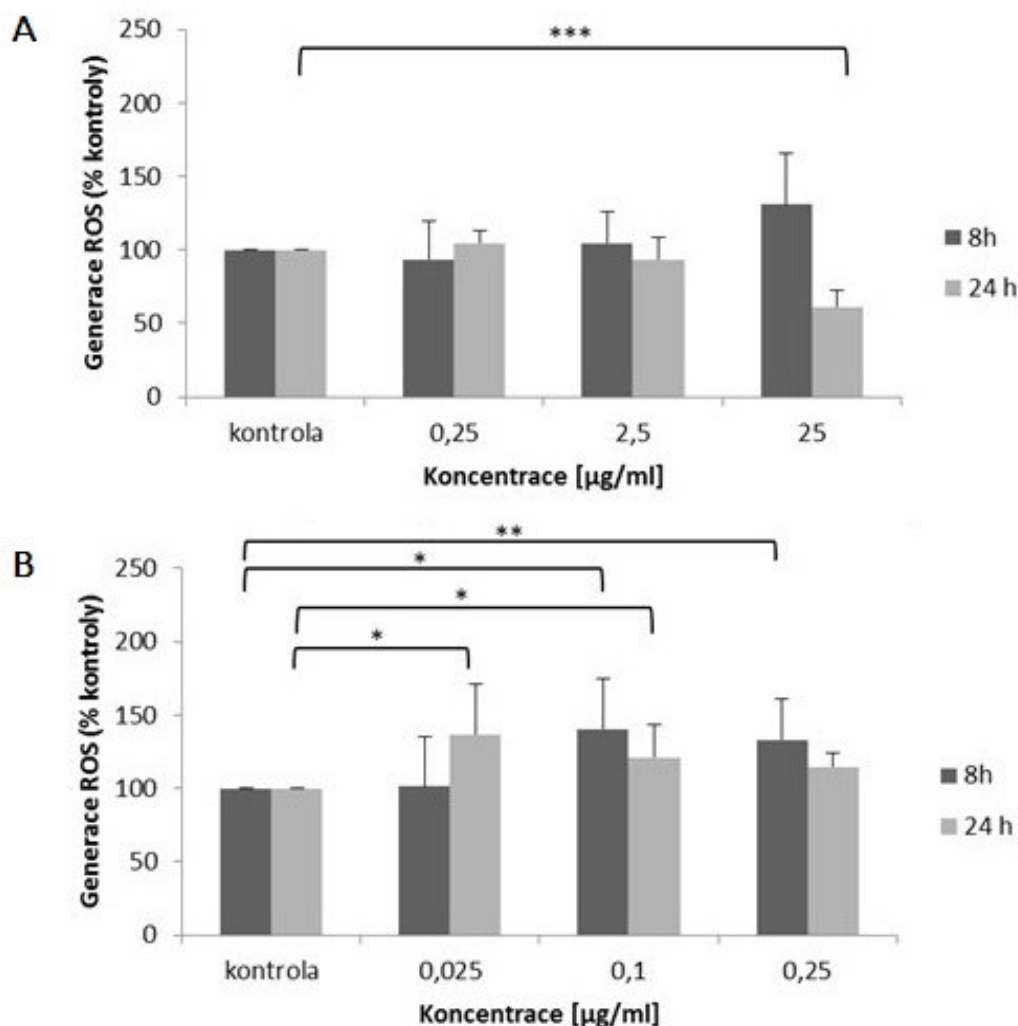
Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Škrábnutí a zahřátí	Délka	Šířka	D/Š index	J/C poměr
		(μm)	(μm)		
<i>K1</i>	Ne	134,56 \pm 30,73	18,03 \pm 4,32	8,00 \pm 2,94	0,17 \pm 0,05
<i>K2</i>	Ano	149,69 \pm 25,27	17,21 \pm 4,77	9,18 \pm 2,53	0,15 \pm 0,08
<i>AgNPs 0,25</i>	Ano	131,51 \pm 21,65	15,17 \pm 2,62	8,87 \pm 1,76	0,14 \pm 0,04*
<i>AgNPs 2,5</i>	Ano	111,63 \pm 20,45	15,02 \pm 4,46	7,98 \pm 2,47	0,15 \pm 0,04
<i>AgNPs 25</i>	Ano	123,68 \pm 19,44	17,41 \pm 5,14	7,73 \pm 2,98	0,15 \pm 0,05
<i>Ag-I 0,025</i>	Ano	121,13 \pm 26,05	14,75 \pm 3,46	8,54 \pm 2,35	0,18 \pm 0,05
<i>Ag-I 0,1</i>	Ano	128,08 \pm 27,87	15,74 \pm 4,18	8,64 \pm 2,78	0,22 \pm 0,06**
<i>Ag-I 0,25</i>	Ano	132,76 \pm 23,84	17,11 \pm 3,09	7,99 \pm 2,09	0,18 \pm 0,04

Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD. Hodnoty *P \leq 0,05; **P \leq 0,01 jsou statisticky odlišné od kontroly K2 (poškrábané a zahřáté HDF). D/Š délko-šířkový index (poměr délky buňky k šířce buňky); J/C nukleoplazmatický index (poměr plochy jádra k celkové ploše cytoplasmy).

5.2.2.2 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na hladinu ROS

Vzhledem k tomu, že v rámci přirozené obranné reakce dochází v ráně k vytvoření ROS, byla jejich hladina měřena i na experimentálním modelu pro studium hojení ran po aplikaci AgNPs (0,25, 2,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$) a Ag-I (0,025, 0,1 a 0,25 $\mu\text{g/ml}$) pomocí sondy dihydrofluorescein diacetátu. Jako kontrola byly použity poškrábané a zahřáté HDF inkubované v experimentálním médiu bez AgNPs a Ag-I.

Z výsledků uvedených na Obr. 21 je patrné, že AgNPs v koncentracích 0,25 a 2,5 $\mu\text{g/ml}$ neovlivňují hladinu ROS v porovnání s kontrolou. U koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ byl po 8 hod pozorován nárůst hladiny a po 24 hod inkubaci statisticky významný pokles hladiny ROS. Naproti tomu aplikace Ag-I v koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$ po 8 a 24 hod, 0,25 $\mu\text{g/ml}$ po 8 hod a 0,025 $\mu\text{g/ml}$ po 24 hod statisticky významně zvýšila tvorbu ROS v porovnání s kontrolou.



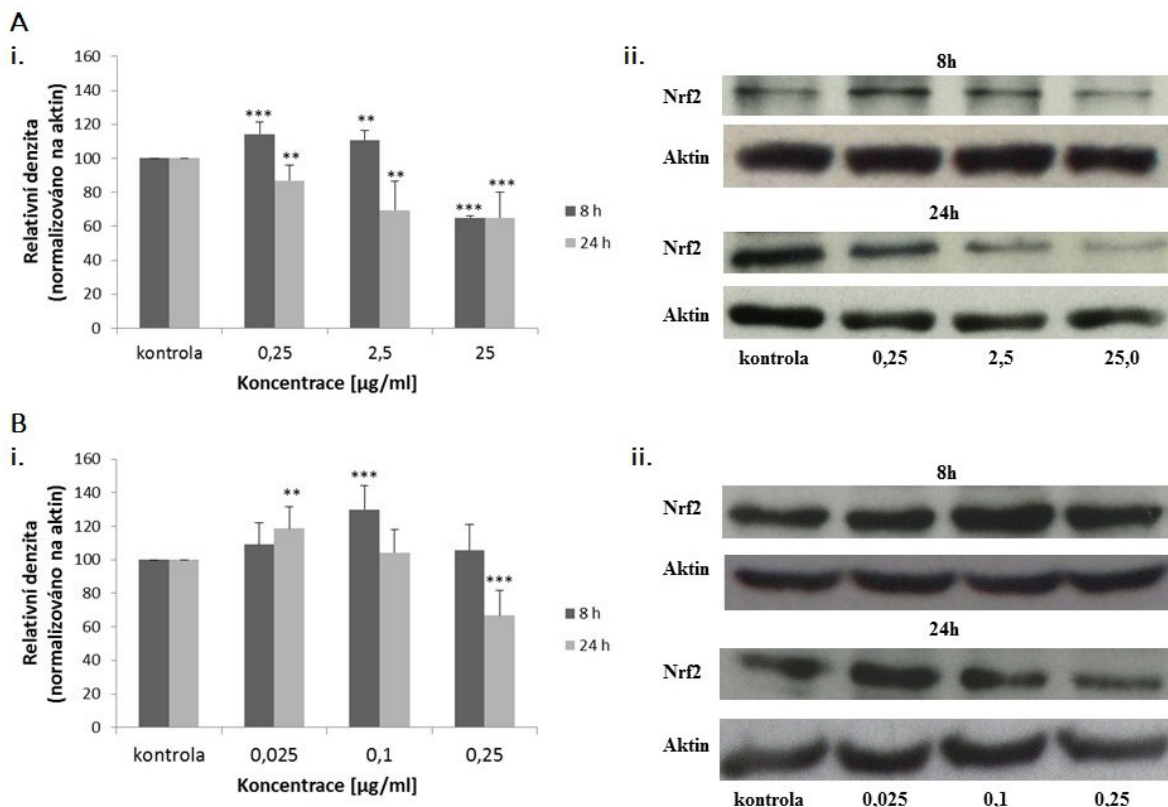
Obrázek 21. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na hladinu ROS stanovenou u experimentálního modelu pro studium hojení ran. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty $*P \leq 0,05$; $**P \leq 0,01$; $***P \leq 0,001$ jsou statisticky odlišné kontroly (poškrábané a zahřáté HDF).

5.2.2.3 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na expresi obranných stresových markerů

Při poranění jsou buňky vystaveny různým druhům stresu, zejména oxidačnímu a teplotnímu. Z tohoto důvodu byly na experimentálním modelu pro studium hojení ran sledovány markery reagující na tyto stimuly. Po 8 a 24 hod inkubaci HDF s AgNPs (0,25; 2,5 a 25 µg/ml) a Ag-I (0,025; 0,1 a 0,25 µg/ml) byl metodou Western blot pozorován vliv na expresi proteinů Nrf2, HO-1, HSP27 a HSP 90. Jako kontrola byly použity poškrábané a zahřáté HDF inkubované v experimentálním médiu bez AgNPs a Ag-I.

VÝSLEDKY

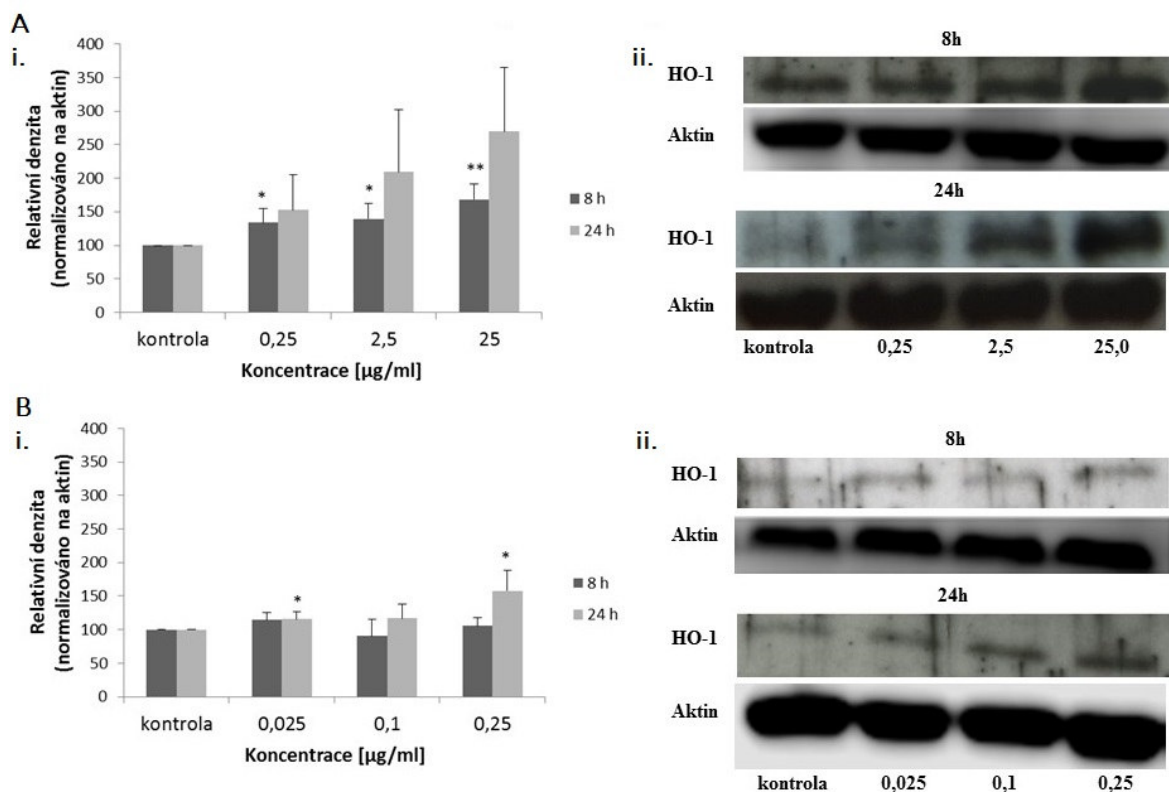
Z výsledků na Obr. 22 A je patrné, že AgNPs (0,25 a 2,5 $\mu\text{g/ml}$) po 8 hod zvyšují a po 24 hod snižují expresi jaderné frakce Nrf2 ve srovnání s kontrolou. U nejvyšší koncentrace AgNPs (25 $\mu\text{g/ml}$) bylo zaznamenáno snížení exprese v obou časových intervalech. Vliv Ag-I na expresi Nrf2 v jádře ukazuje Obr. 22 B. Zvýšení exprese bylo zaznamenáno u koncentrací 0,1 $\mu\text{g/ml}$ po 8 hod a 0,025 $\mu\text{g/ml}$ po 24 hod ve srovnání s kontrolou. U nejvyšší koncentrace Ag-I (0,25 $\mu\text{g/ml}$) došlo ke snížení exprese Nrf2 po 24 hod inkubaci.



Obrázek 22. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na expresi jaderné frakce Nrf2 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ jsou statisticky odlišné od kontroly (poškrábané a zahřáté HDF). ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

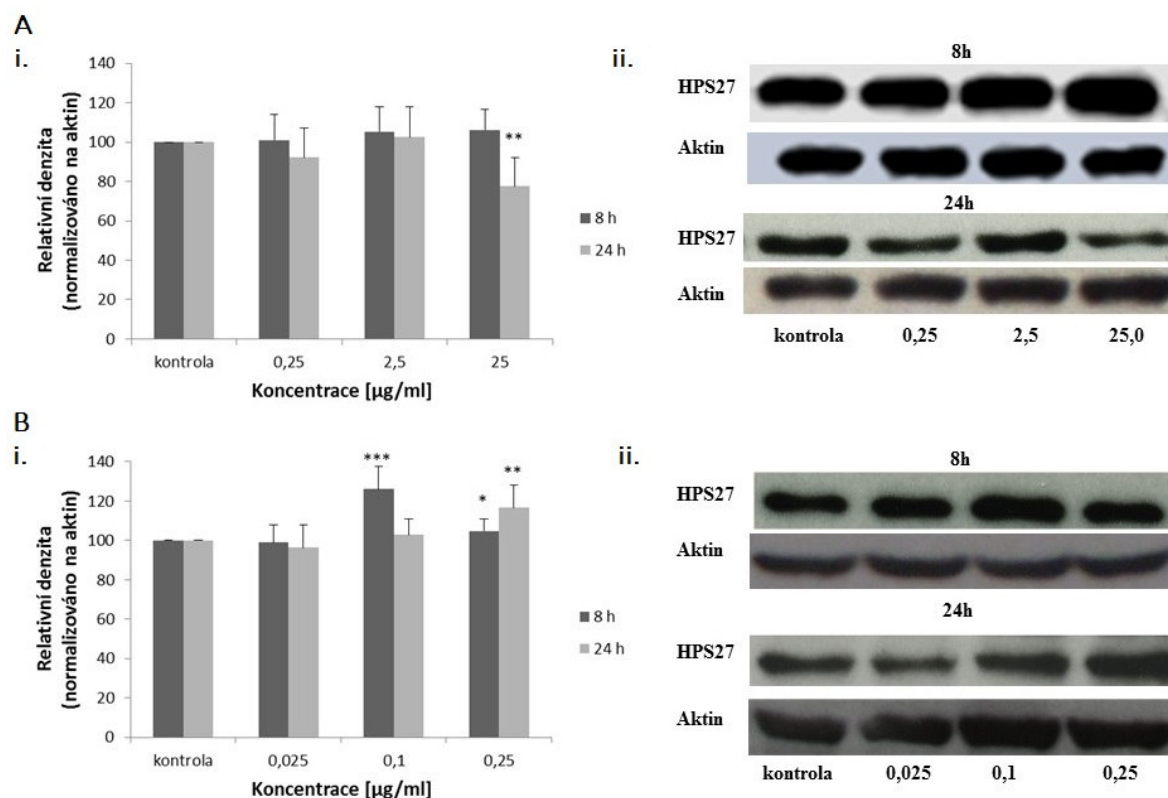
Při stanovení vlivu AgNPs (Obr. 23 A) a Ag-I (Obr. 23 B) na expresi HO-1 bylo zaznamenáno zvýšení exprese tohoto proteinu. U AgNPs bylo zvýšení časově i koncentračně závislé ve srovnání s kontrolou, i když statisticky významný rozdíl byl pozorován pouze po 8 hod inkubaci. Vliv Ag-I na expresi HO-1 byl nižší ve srovnání

s AgNPs. U Ag-I bylo pozorováno zvýšení exprese v závislosti na koncentraci pouze po 24 hod, zatímco po 8 hod inkubaci nebyly zaznamenány výraznější změny.



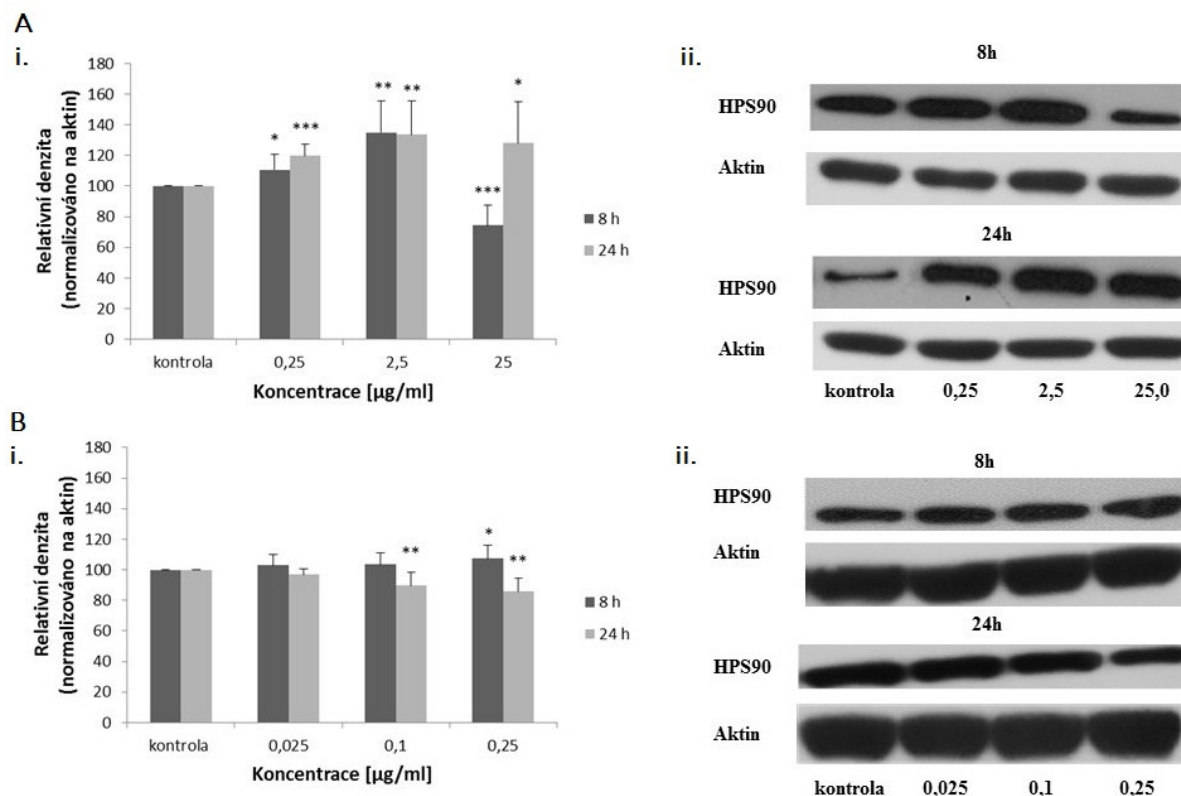
Obrázek 23. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na expresi HO-1 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ jsou statisticky odlišné od kontroly (poškrábané a zahřáté HDF). ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

Následně byl sledován vliv AgNPs a Ag-I na expresi HSP27. Statisticky významné snížení exprese bylo zaznamenáno u AgNPs v koncentraci 25 µg/ml po 24 hod inkubaci ve srovnání s kontrolou. U nižších koncentrací (0,25 a 2,5 µg/ml) nebyl pozorován významnější vliv na expresi tohoto proteinu (Obr. 24 A). Naproti tomu Ag-I v nejvyšší koncentraci 2,5 µg/ml zvyšovalo expresi HSP27 v obou časových intervalech (Obr. 24 B). U nižších koncentrací bylo pozorováno pouze zvýšení exprese u koncentrace 0,1 µg/ml po 8 hod.



Obrázek 24. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na expresi HSP27 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ jsou statisticky odlišné od kontroly (poškrábané a zahřáté HDF). ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých.

Při testování účinku AgNPs a Ag-I na HSP90 bylo pozorováno, že nižší koncentrace AgNPs (0,25 a 2,5 µg/ml) zvyšovaly expresi proteinu v závislosti na čase a koncentraci, zatímco nejvyšší koncentrace (25 µg/ml) po 8 hod snižovala a po 24 hod zvyšovala expresi HSP90 v porovnání s kontrolou (Obr. 25 A). U Ag-I bylo po 8 hod inkubaci zaznamenáno koncentračně závislé zvýšení exprese HSP90, které bylo u koncentrace 0,25 µg/ml statisticky významné. Zatímco po 24 hod bylo zaznamenáno koncentračně závislé snížení exprese tohoto proteinu, které bylo u koncentrací 0,1 µg/ml a 0,25 µg/ml statisticky významné (Obr. 25 B).

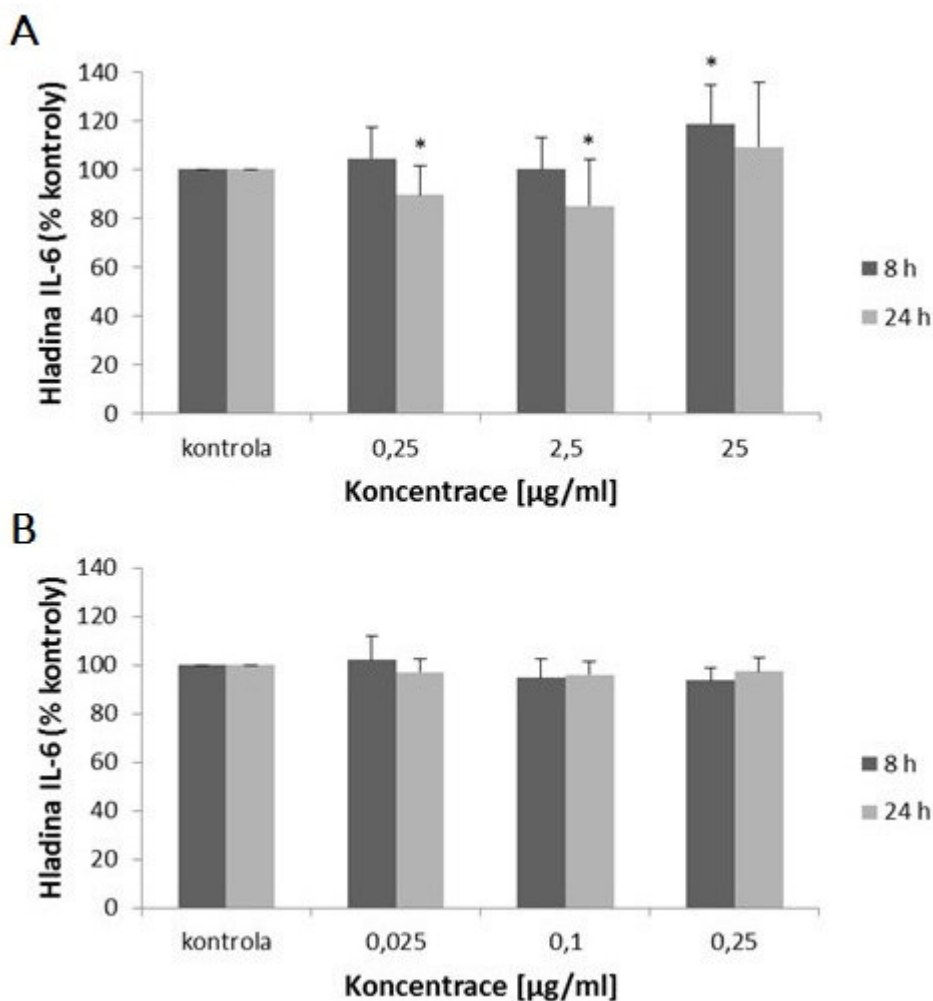


Obrázek 25. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na expresi HSP90 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ jsou statisticky odlišné od kontroly (poškrábané a zahřáté HDF). ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

5.2.2.4 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na markery zánětu

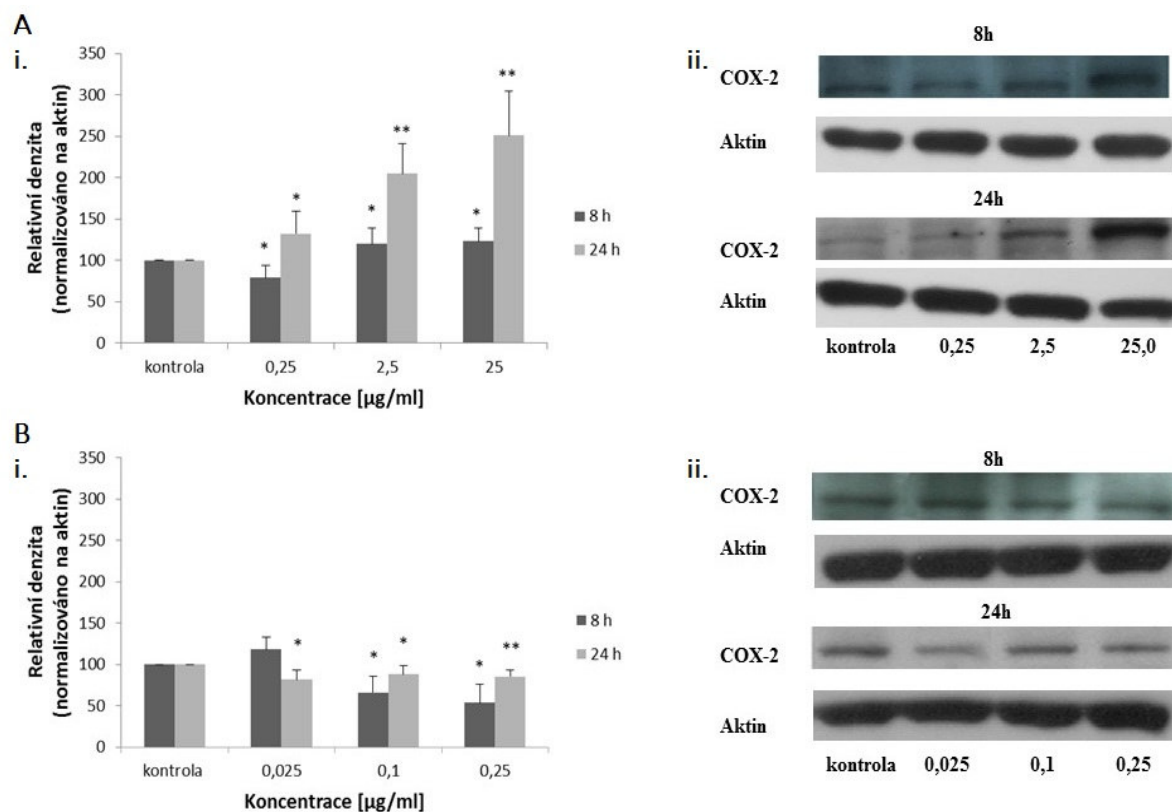
Zánětlivá fáze hojení ran je velmi důležitá pro nastartování správných reparačních procesů, proto byly na experimentálním modelu pro studium hojení ran studovány některé významné markery zánětu. Po 8 a 24 hod inkubaci HDF s AgNPs (0,25; 2,5 a 25 µg/ml) a Ag-I (0,025; 0,1 a 0,25 µg/ml) bylo získané médium využito pro stanovení koncentrace IL-6 metodou ELISA. V buňkách byla Western blot analýzou stanovena exprese COX-2 a NF- κ B. Jako kontrola byly použity poškrábané a zahřáté HDF inkubované v experimentálním médiu bez AgNPs a Ag-I.

Výsledky na Obr. 26 A ukazují, že AgNPs v koncentraci 25 µg/ml zvyšuje koncentraci IL-6 po 8 hod, zatímco nižší koncentrace 0,25 a 2,5 µg/ml snižují IL-6 po 24 hod ve srovnání s kontrolou. U Ag-I (Obr. 26 B) nebyl pozorován žádný vliv na koncentraci tohoto cytokinu.



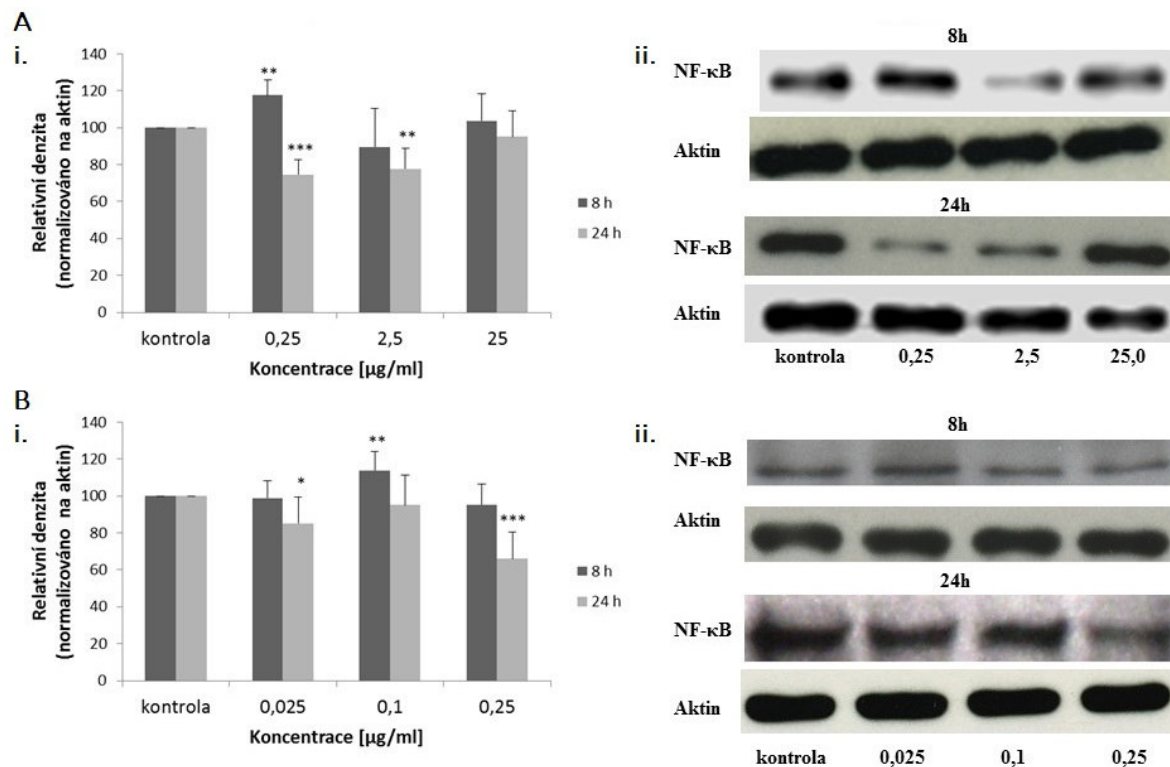
Obrázek 26. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na hladinu IL-6 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze tří měření. Hodnoty * $P \leq 0,05$ jsou statisticky odlišné od kontroly (poškrábané a zahřáté HDF).

Při stanovení vlivu AgNPs na expresi COX-2 (Obr. 27 A) bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení exprese v závislosti na čase a koncentraci až na nejnižší koncentraci 0,25 µg/ml, kdy po 8 hod bylo pozorováno statisticky významné snížení exprese tohoto proteinu ve srovnání s kontrolou. U Ag-I byl trend přesně opačný (Obr. 27 B). Nejnižší koncentrace 0,025 µg/ml po 8 hod mírně zvýšila expresi COX-2, zatímco u ostatních koncentrací bylo pozorováno statisticky významné snížení exprese ve srovnání s kontrolou.



Obrázek 27. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na expresi COX-2 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze tří měření. Hodnoty *P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01 jsou statisticky odlišné od kontroly (poškrábané a zahřáté HDF). ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

Jaderná frakce NF-κB (Obr. 28 A) byla statisticky významně zvýšená po 8 hod inkubaci HDF s AgNPs v koncentraci 0,25 µg/ml. Expres tohoto proteinu statisticky významně klesla po 24 hod u koncentrací 0,25 a 2,5 µg/ml ve srovnání s kontrolou. Nejvyšší koncentrace AgNPs (25 µg/ml) nevykazovala žádný vliv na expresi tohoto proteinu v obou časových intervalech. Výsledky na Obr. 28 B ukazují, že Ag-I v koncentraci 0,1 µg/ml signifikantně zvýšilo expresi jaderné frakce NF-κB po 8 hod, zatímco koncentrace 0,025 a 0,25 µg/ml po 24 hod ji statisticky významně snížily ve srovnání s kontrolou.



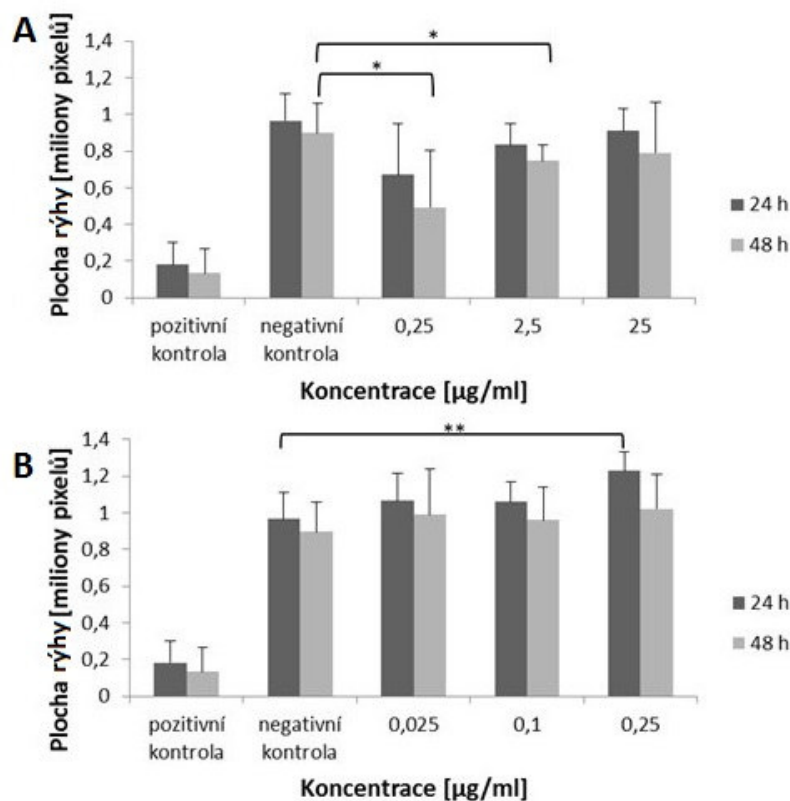
Obrázek 28. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na expresi NF-κB stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze tří měření. Hodnoty * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ jsou statisticky odlišné od kontroly (poškrábané a zahřáté HDF). ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

5.2.2.5 Stanovení vlivu AgNPs a Ag-I na zarůstání rány a migraci buněk

Pro zacelení rány je nezbytné, aby dermální buňky migrovaly do místa poškození a zde se dále dělily, čímž dochází k obnově celistvosti kožní bariery. Ke stanovení vlivu AgNPs (0,25; 2,5 a 25 µg/ml) a Ag-I (0,025; 0,1 a 0,25 µg/ml) na tento proces byl proveden rýhový test. Po poškrábání (200 µl pipetovací špičkou), zahřátí (1 hod, 42°C) a 24 a 48 hod inkubaci HDF se studovanými vzorky byla vypočtena plocha rýhy, která byla následně srovnána s pozitivní a negativní kontrolou. Jako pozitivní kontrola byly použity poškrábané a zahřáté HDF inkubované v médiu s obsahem FBS bez AgNPs a Ag-I. Jako negativní kontrola byly použity poškrábané a zahřáté HDF inkubované v experimentálním médiu bez AgNPs a Ag-I.

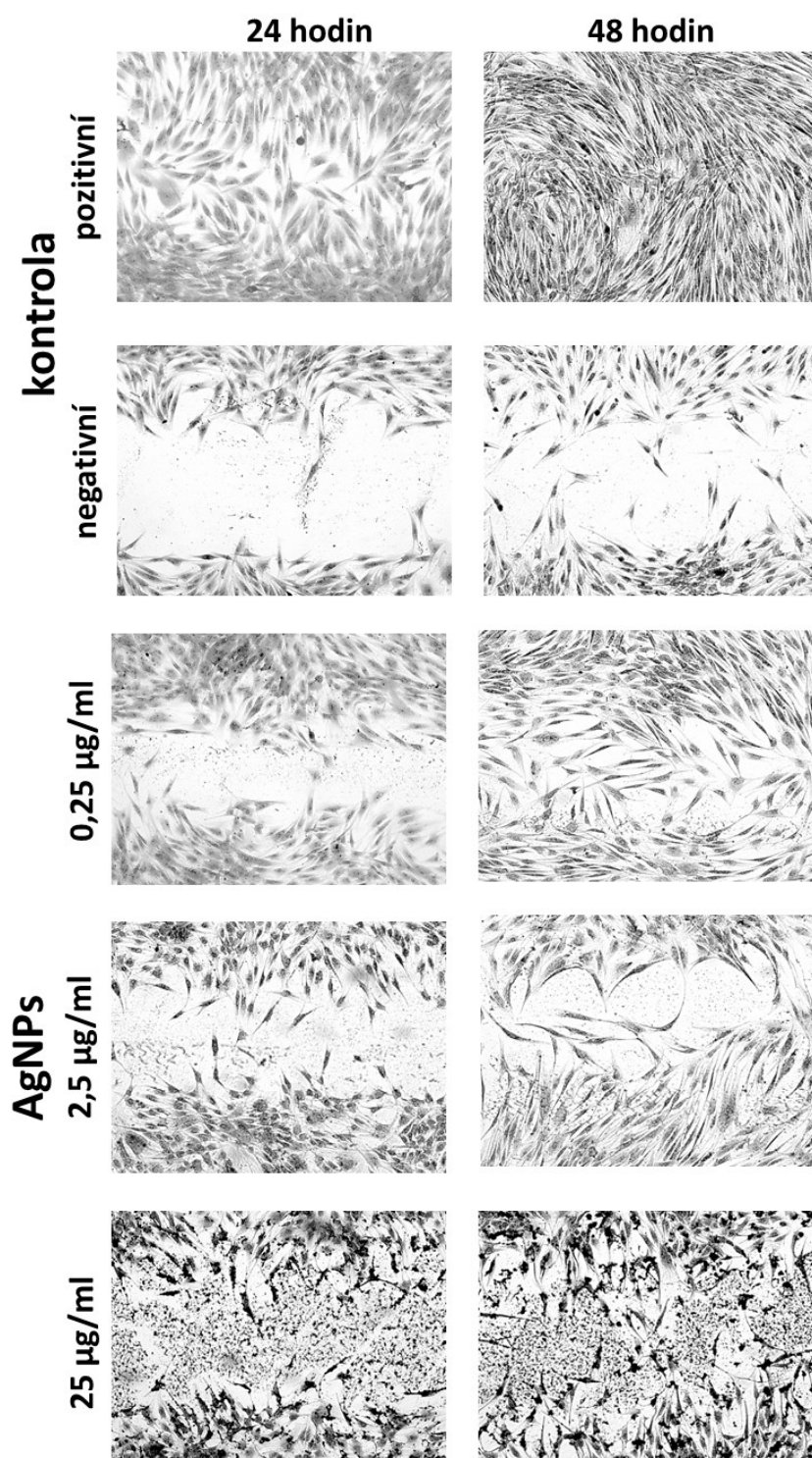
VÝSLEDKY

Z výsledků na Obr. 29 A je patrné, že AgNPs mají na zarůstání rýhy pozitivní vliv. U všech studovaných koncentrací bylo v obou časových intervalech pozorováno zmenšení plochy rýhy ve srovnání s negativní kontrolou. U koncentrací 0,25 a 2,5 $\mu\text{g/ml}$ po 48 hod bylo toto zmenšení statisticky významné. Dále bylo zřejmé, že čím nižší koncentrace AgNPs, tím menší byla plocha rýhy a tím lepší byl vliv na zarůstání rýhy. Vliv Ag-I byl opačný (Obr. 29 B). U všech studovaných koncentrací byla plocha rýhy větší v obou časových intervalech ve srovnání s negativní kontrolou, byť statisticky významný výsledek byl zjištěn pouze u koncentrace 0,25 $\mu\text{g/ml}$ po 48 hod inkubaci. Obrázky 30 a 31 ukazují mikroskopické fotografie rýh.



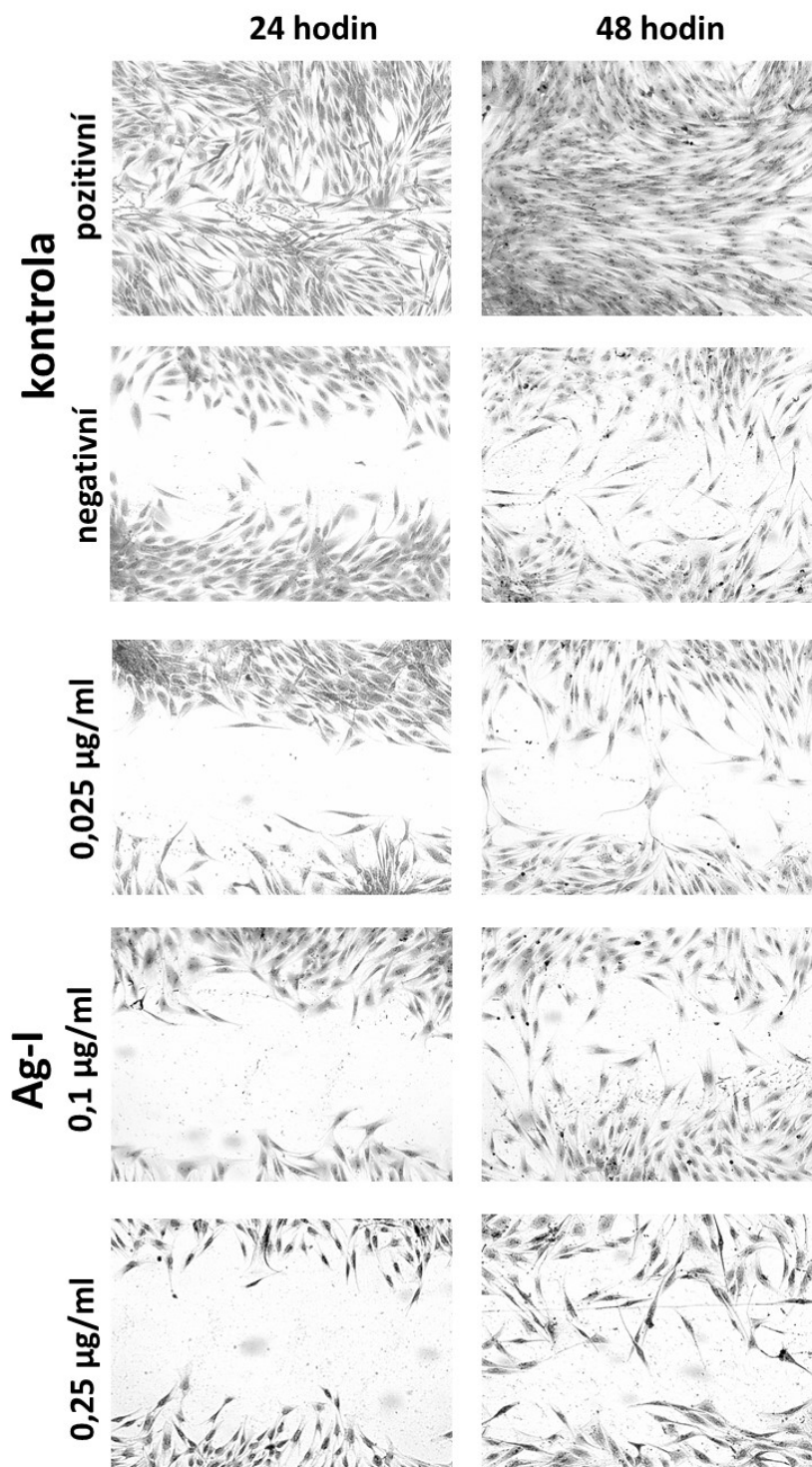
Obrázek 29. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na zarůstání rýhy stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty $*P \leq 0,05$; $**P \leq 0,01$ jsou statisticky odlišné od negativní kontroly.

Pozitivní kontrola (poškrábané a zahřáté HDF inkubované v médiu s obsahem FBS bez AgNPs/Ag-I). Negativní kontrola (poškrábané a zahřáté HDF inkubované v experimentálním médiu bez AgNPs/Ag-I).



Obrázek 30. Vybrané fotografie rýh po inkubaci HDF s AgNPs. Buňky byly škrábnuty (200 µl pipetovací špičkou), zahřáty (1 hod, 42°C) a inkubovány s AgNPs (0,25; 2,5 a 25 µg/ml). Zvětšeno 100x.

Pozitivní kontrola (poškrábané a zahřáté HDF inkubované v médiu s obsahem FBS bez AgNPs/Ag-I). Negativní kontrola (poškrábané a zahřáté HDF inkubované v experimentálním médiu bez AgNPs/Ag-I).



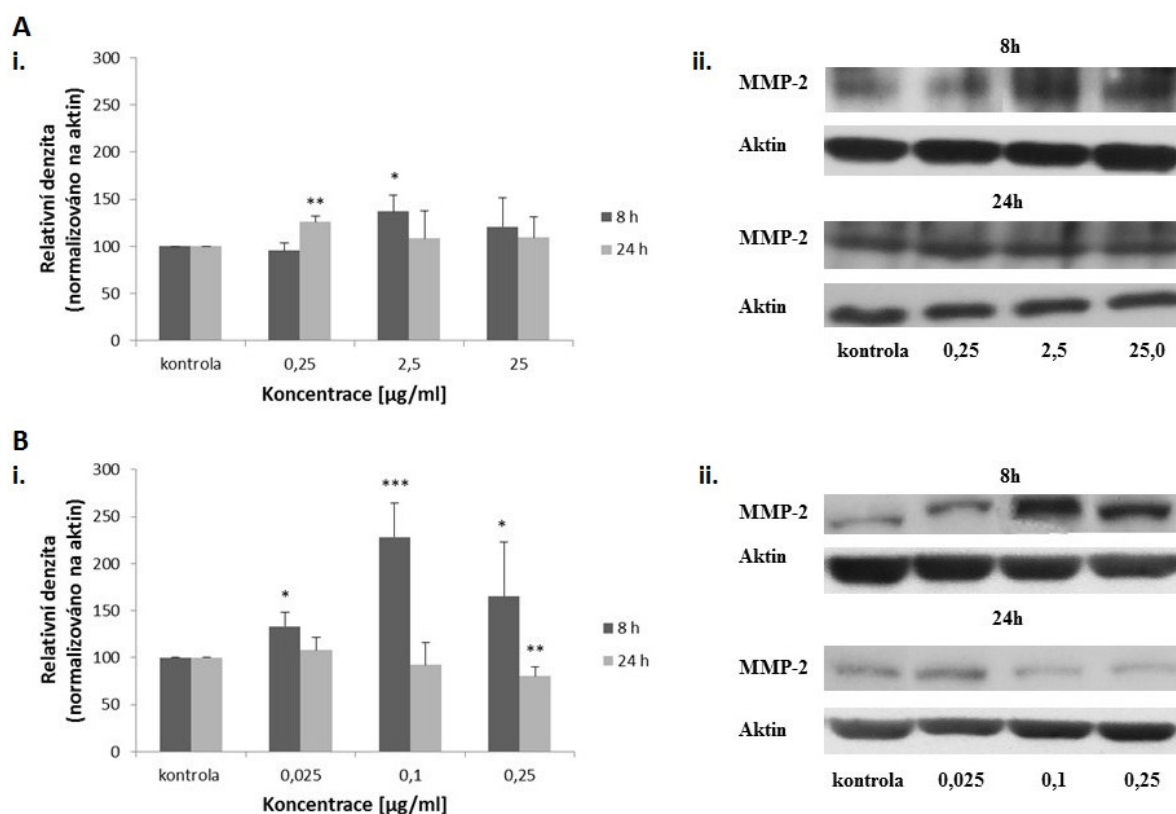
Obrázek 31. Vybrané fotografie rýh po inkubaci HDF s Ag-I. Buňky byly škrábnuty (200 µl pipetovací špičkou), zahřáty (1 hod, 42°C) a inkubovány s Ag-I (0,025; 0,1 a 0,25 µg/ml). Zvětšeno 100x.

Pozitivní kontrola (poškrábané a zahřáté HDF inkubované v médiu s obsahem FBS bez AgNPs/Ag-I). Negativní kontrola (poškrábané a zahřáté HDF inkubované v experimentálním médiu bez AgNPs/Ag-I).

VÝSLEDKY

Pro správnou migraci buněk umožňující uzavření rány je důležitá MMP-2, která však zároveň může inhibovat proliferaci buněk. Její hladina byla na experimentálním modelu pro studium hojení ran stanovena metodou Western blot.

Po 24 hod inkubaci HDF s AgNPs (Obr. 32 A) nebyl, s výjimkou statisticky významného zvýšení v koncentraci 0,25 $\mu\text{g/ml}$, pozorován žádný vliv na expresi MMP-2 ve srovnání s kontrolou. Působení Ag-I na MMP-2 (Obr. 32 B) bylo ve studovaných časových intervalech protichůdné. Zatímco po 8 hod bylo pozorováno u všech koncentrací statisticky významné zvýšení exprese tohoto proteinu ve srovnání s kontrolou, po 24 hod bylo zaznamenáno koncentračně závislé snížení exprese MMP-2.



Obrázek 32. Vliv AgNPs (A) a Ag-I (B) na expresi MMP-2 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty $*P \leq 0,05$; $**P \leq 0,01$; $***P \leq 0,001$ jsou statisticky odlišné od kontroly (poškrábané a zahřáté HDF). ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

5.3 Studium možného využití SeNPs k hojení ran

5.3.1 STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍHO ÚČINKU SENPS

Před vlastními experimenty na buňkách byly SeNPs podrobeny mikrobiologickým zkouškám. Nanočástice byly dodány nesterilní, a proto byly před použitím sterilizovány v autoklávu (20 min, 100°C, bez přetlaku). Pro stanovení antimikrobiálního účinku byly testovány sterilní (autoklávované) a nesterilní (neautoklávované) SeNPs, aby byl zjištěn jejich účinek a případné poškození nanočástic způsobené sterilizací.

Z výsledků uvedených v Tabulce 4 vyplývá, že SeNPs působily baktericidně na 2 kvasinkové a 2 bakteriální kmeny a bakteriostaticky na 1 bakteriální kmen. Sterilizace snížila účinnost SeNPs přibližně o polovinu, nicméně i tak zůstala zachována pro stejné mikroorganismy s výjimkou *Enterococcus faecalis*, který byl citlivý pouze na neautoklávované SeNPs. Neautoklávované nanočástice se v některých jamkách při vyšší koncentraci vysrážely a pravděpodobně díky tomu nebyly tak účinné jako v nižších ředěních (bakteriostatický účinek místo baktericidního).

5.3.2 STANOVENÍ NEŽÁDOUCÍCH ÚČINKŮ SENPS

5.3.2.1 Stanovení toxicity SeNPs

Toxicita SeNPs ($54,55 \pm 7,42$ nm) byla sledována na HDF po 24 hod inkubaci jako životnost buněk (MTT test). Vzorky nanočástic byly připraveny v médiu pro experimenty v koncentračním rozmezí 0,2 – 50 $\mu\text{g/ml}$. Kontrolní buňky byly inkubovány v médiu pro experimenty bez SeNPs.

Z Obr. 33 je zřejmé, že SeNPs snižují životnost buněk v závislosti na koncentraci. Ze získaných dat byla vypočtena hodnota IC_{50} $13,7 \pm 0,9$ $\mu\text{g/ml}$. Na základě těchto výsledků byly pro další experimenty vybrány tři koncentrace: netoxická (6,25 $\mu\text{g/ml}$), blízká IC_{50} (12,5 $\mu\text{g/ml}$) a 2x vyšší než IC_{50} (25 $\mu\text{g/ml}$).

U zvolených koncentrací SeNPs (6,25; 12,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$) byl nejprve sledován vliv na morfologii buněk pomocí mikroskopu Zeiss Axiom Axiovert 40 CFL. U HDF kultivovaných v médiu s SeNPs v koncentraci 6,25 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 34 B) po dobu 24 hod nebyly pozorovány žádné změny morfologie ve srovnání s kontrolou (Obr. 34 A). Po 24 hod aplikaci vyšších koncentrací 12,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$ buňky ztratily svůj typický vřetenovitý tvar a zejména u koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ byly pozorovány fibroblasty

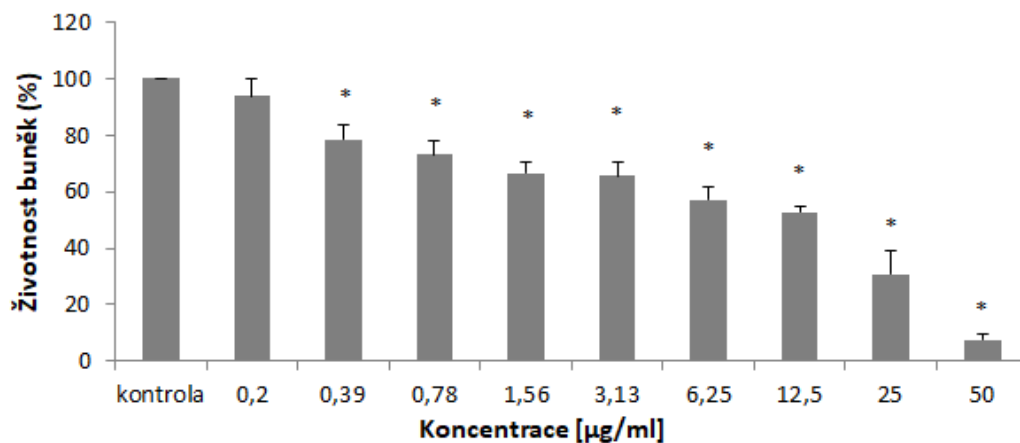
VÝSLEDKY

s velkými kulovitými těly a dlouhými tenkými výběžky. U těchto koncentrací byl také pozorován vznik krystalů selenu (Obr. 34 C-D).

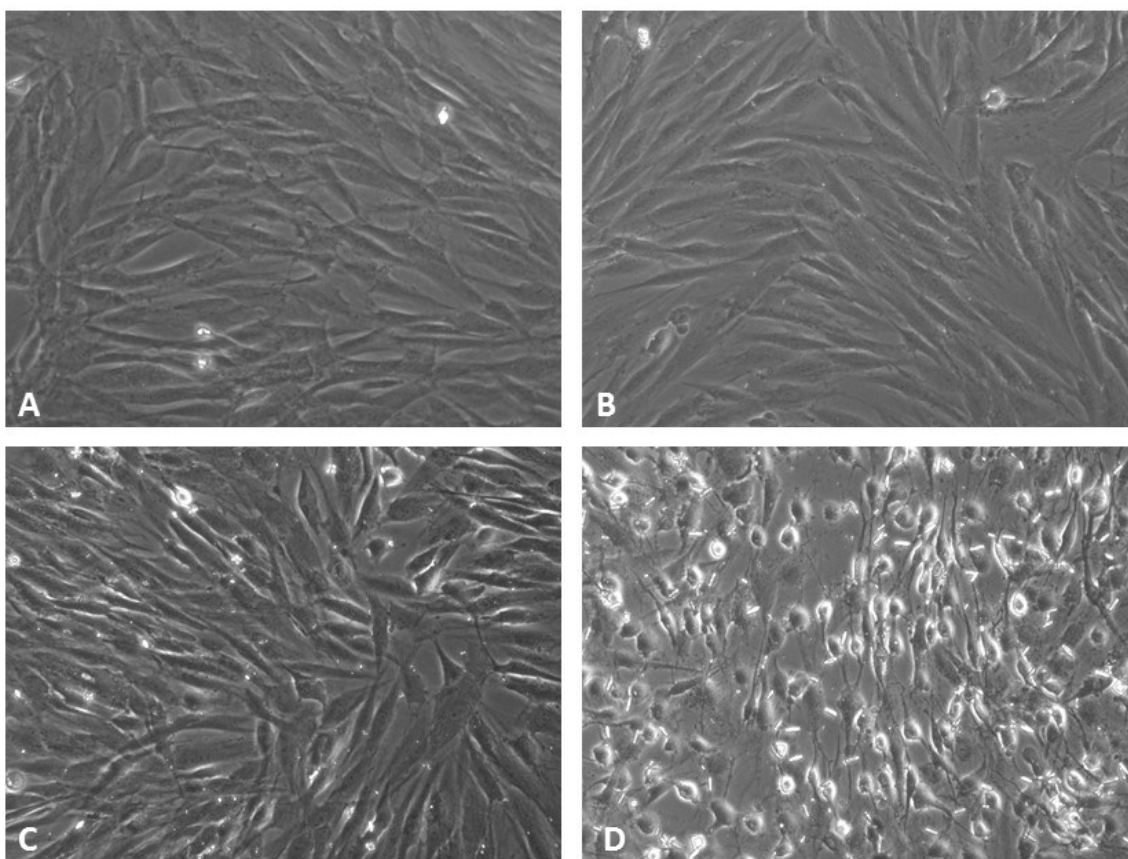
Tabulka 4: Stanovení antimikrobiálního účinku SeNPs.

Bakteriální / Kvasinkový kmen	SeNPs (µg/ml) neautoklávované	SeNPs (µg/ml) autoklávované
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	50 MIC/MBS	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	25-50 MIC/MBS 0,78 MIC/MBC	1,56 MIC/MBC
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>MRSA</i>) 4591	50 MIC/MBS 1,56 MIC/MBC	1,56 MIC/MBC
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> A/16568	50 MIC/MBS	50 MIC/MBS
<i>Escherichia coli</i> 16702	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 16575	-	-
<i>Candida albicans</i> 1	-	-
<i>Candida krusei</i> 3	0,39 MIC/MBC	0,78 MIC/MBC
<i>Candida tropicalis</i> 5	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> 6	0,78 MIC/MBC	1,56 MIC/MBC

MIC - minimální inhibiční koncentrace; *MBS* - minimální bakteriostatická koncentrace; *MBC* - minimální baktericidní koncentrace; *MIC/MBC* – *MIC* je rovna *MBC*; *MIC/MBS* – *MIC* je rovna *MBS*; - normální růst mikroba bez zjevného působení látky.



Obrázek 33. Toxicita SeNPs stanovovaná MTT testem u HDF po 24 hod kultivaci. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze čtyř měření. Hodnoty $*P \leq 0,05$ jsou statisticky odlišné od kontroly.

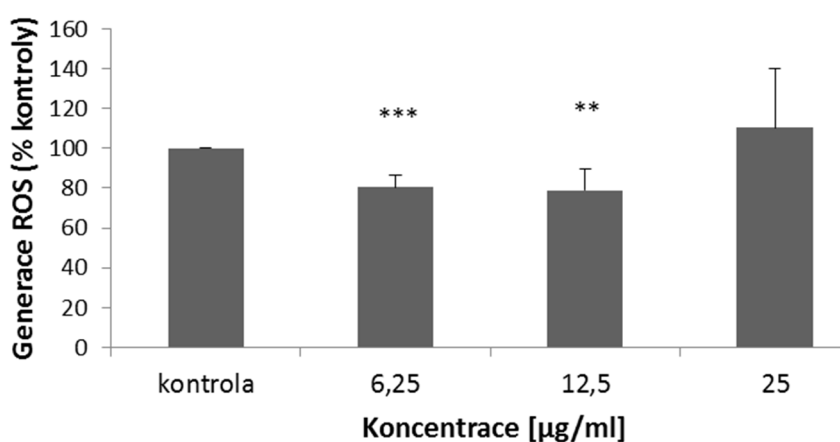


Obrázek 34. Vliv SeNPs na buněčnou morfoloii. HDF byly inkubovány (24 hod) v médiu pro experimenty bez SeNPs (A) kontrola; a s obsahem SeNPs (B) 6,25 µg/ml, (C) 12,5 µg/ml a (D) 25 µg/ml. Zvětšeno 100x.

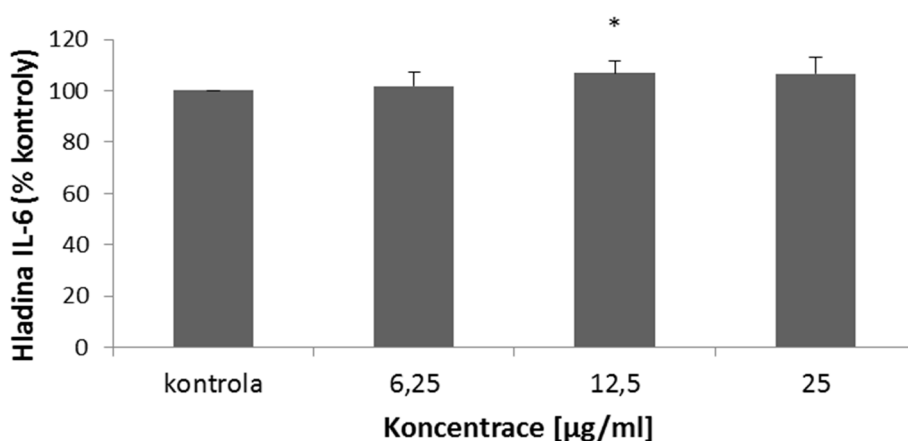
5.3.2.2 Stanovení vlivu SeNPs na produkci ROS a markery zánětu

V další sérii experimentů bylo ověřeno, zda vybrané koncentrace SeNPs mají vliv na produkci ROS a IL-6. Generace ROS byla po 24 hod inkubaci HDF s SeNPs (6,25; 12,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$) stanovena využitím sondy dihydrofluorescein diacetátu a koncentrace IL-6 v médiu byla změřena metodou ELISA.

Výsledky na Obr. 35 ukazují, že SeNPs v koncentracích 6,25 a 12,5 $\mu\text{g/ml}$ statisticky významně snižují koncentraci ROS v HDF. Po aplikaci 25 $\mu\text{g/ml}$ byla pozorována zvýšená tvorba ROS v HDF, avšak toto zvýšení nebylo statisticky významné. Hladina IL-6 byla zvýšená pouze v koncentraci 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 36).



Obrázek 35. Vliv SeNPs na generaci ROS. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty $**P \leq 0,01$; $***P \leq 0,001$ jsou statisticky odlišné od kontroly.



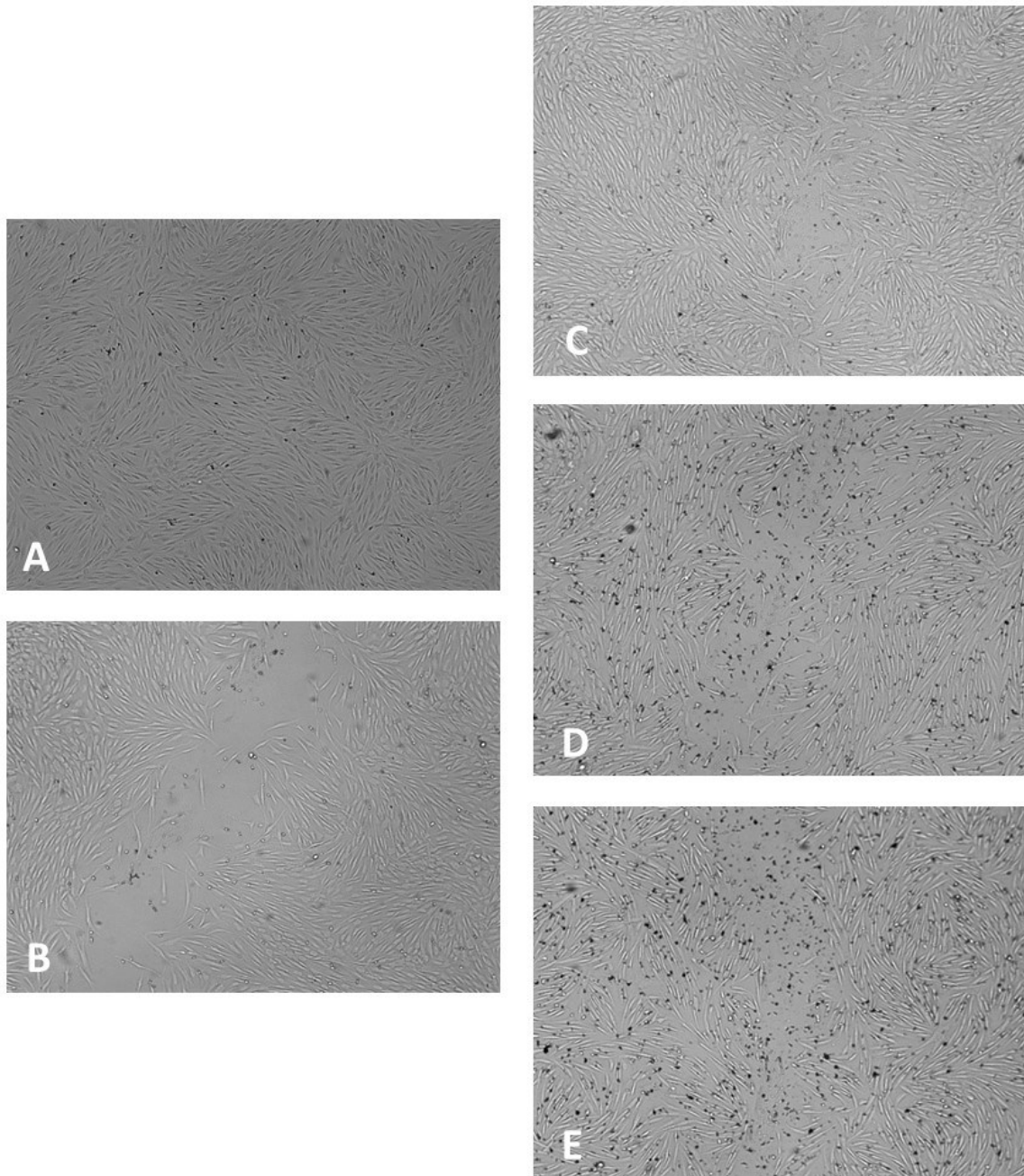
Obrázek 36. Vliv SeNPs na koncentraci IL-6. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnota $*P \leq 0,05$ je statisticky odlišná od kontroly.

5.3.3 EXPERIMENTÁLNÍ MODEL RÁNY

Dalším cílem disertační práce bylo zjistit, zda by SeNPs mohly být využity, podobně jako AgNPs a Ag-I, na podporu hojení ran. Proto byl použit stejný experimentální model pro studium hojení ran jako v případě AgNPs a Ag-I. Jak již bylo uvedeno výše, HDF byly před aplikací nanočástic nejprve mechanicky poškozeny, poškrábaním (200 μ l pipetovací špičkou) a zahřátím (1 hod, 42 °C) a teprve poté byly aplikovány SeNPs (6,25; 12,5 a 25 μ g/ml) na dobu 8 a 24 hod.

Nejprve byla na experimentálním modelu pro studium hojení ran hodnocena morfologie buněk po 24 hod aplikaci SeNPs (6,25; 12,5 a 25 μ g/ml). Kontroly K1 (nepoškrábané a nezahřáté HDF) a K2 (poškrábané a zahřáté HDF) byly připraveny v médiu pro experimenty bez SeNPs.

Buňky vystaveny účinkům SeNPs (Obr. 37 C-D) nevykazovaly žádné mikroskopicky pozorovatelné změny buněčné morfologie ve srovnání s K1 (Obr. 37 A) a K2 (Obr. 37 B). Byla pozorována pouze nižší hustota buněk vystavených působení SeNPs v koncentracích 12,5 a 25 μ g/ml (Obr. 37 D a E). Všechny buňky měly vřetenovitý tvar charakteristický pro fibroblasty.

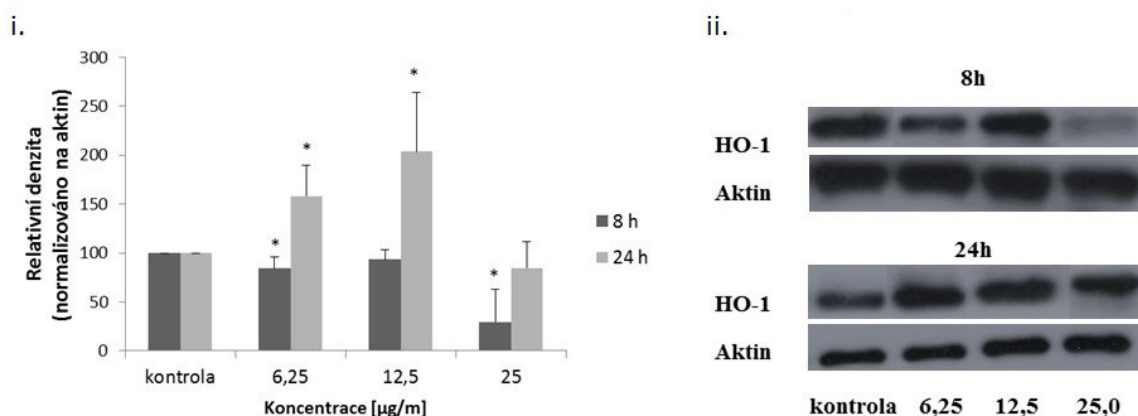


Obrázek 37. Vliv SeNPs na morfologii HDF sledovanou na experimentálním modelu pro studium hojení ran. (A) K1 (nepoškrábané a nezahřáté HDF), (B) K2 (poškrábané a zahřáté HDF), HDF inkubované v experimentálním médiu s SeNPs (C) 6,25 µg/ml, (D) 12,5 µg/ml a (E) 25 µg/ml. Zvětšeno 50x.

5.3.3.1 Stanovení obranných stresových markerů

Vzhledem k tomu, že byla na experimentálním modelu pro studium hojení ran pozorována po aplikaci SeNPs zvýšená hladina ROS, byla dále sledována exprese proteinu HO-1, který je zapojen do antioxidační odpovědi buňky.

Na základě Western blot analýzy bylo zjištěno, že SeNPs po 8 hod inkubaci snižovaly expresi HO-1, ale statisticky významné snížení ve srovnání s kontrolou bylo pozorováno pouze u koncentrací 6,25 a 25 $\mu\text{g/ml}$. Po 24 hod bylo pozorováno zvýšení exprese HO-1, které bylo u koncentrací 6,25 a 12,5 $\mu\text{g/ml}$ statisticky významné. U nejvyšší koncentrace (25 $\mu\text{g/ml}$) bylo po 24 hod rovněž pozorováno zvýšení exprese v porovnání s 8 hod intervalem, ale toto zvýšení nedosáhlo úrovně kontroly (Obr. 38).



Obrázek 38. Vliv SeNPs na expresi HO-1 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty $*P \leq 0,05$ jsou statisticky odlišné od poškrábané a zahřáté kontroly. ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

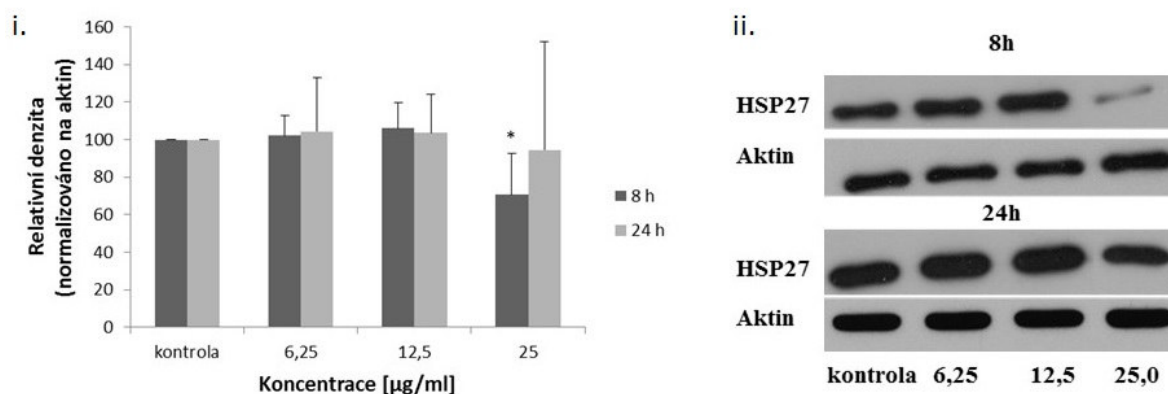
Jak již bylo uvedeno výše, kromě oxidačního stresu jsou buňky při poranění vystaveny i teplotnímu šoku. Z tohoto důvodu byl na experimentálním modelu pro studium hojení ran sledován vliv SeNPs (6,25; 12,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$; 8 a 24 hod) na proteiny teplotního šoku HSP27 a HSP90.

Z výsledků Western blot analýzy je patrné, že nižší koncentrace SeNPs (6,25 a 12,5 $\mu\text{g/ml}$) nevykazovaly po 8 a 24 hod žádný vliv na expresi HSP27 (Obr. 39). Nejvyšší koncentrace (25 $\mu\text{g/ml}$) snížila expresi tohoto proteinu, ale statisticky významné snížení v porovnání s kontrolou bylo zaznamenáno pouze po 8 hod inkubaci.

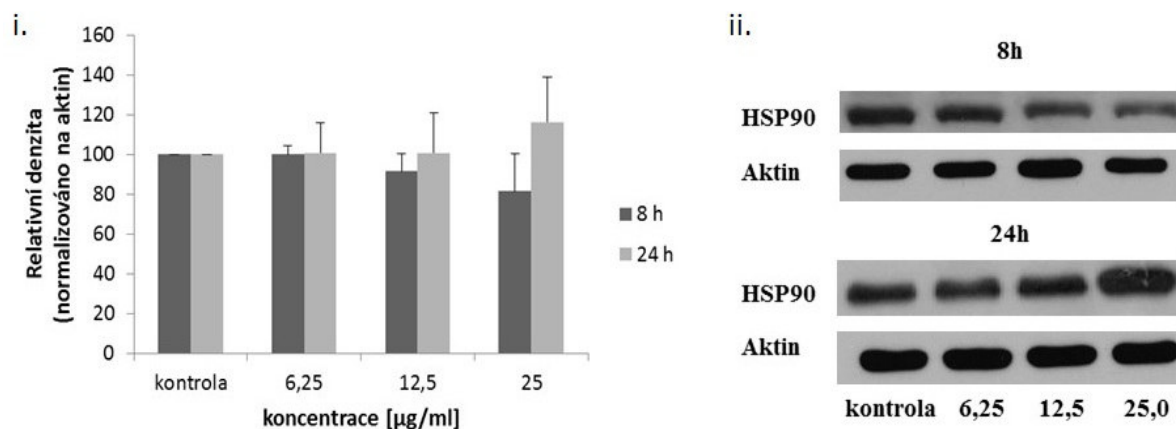
V případě HSP90 (Obr. 40) bylo po 8 hod pozorováno snížení exprese v závislosti na koncentraci, avšak snížení nebylo u žádné z testovaných koncentrací statisticky

VÝSLEDKY

významné. Po 24 hod bylo naopak zaznamenáno zvýšení exprese HSP90 v závislosti na koncentraci, ale ani v tomto případě nebylo ve srovnání s kontrolou zvýšení u žádné z testovaných koncentrací statisticky významné



Obrázek 39. Vliv SeNPs na expresi HSP27 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty $*P \leq 0,05$ jsou statisticky odlišné od poškrábané a zahřáté kontroly. ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

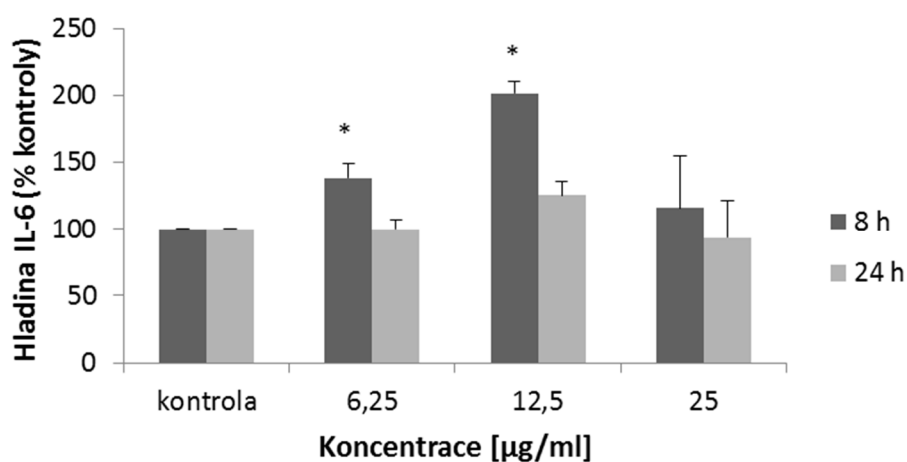


Obrázek 40. Vliv SeNPs na expresi HSP90 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

5.3.3.2 Stanovení markerů zánětu

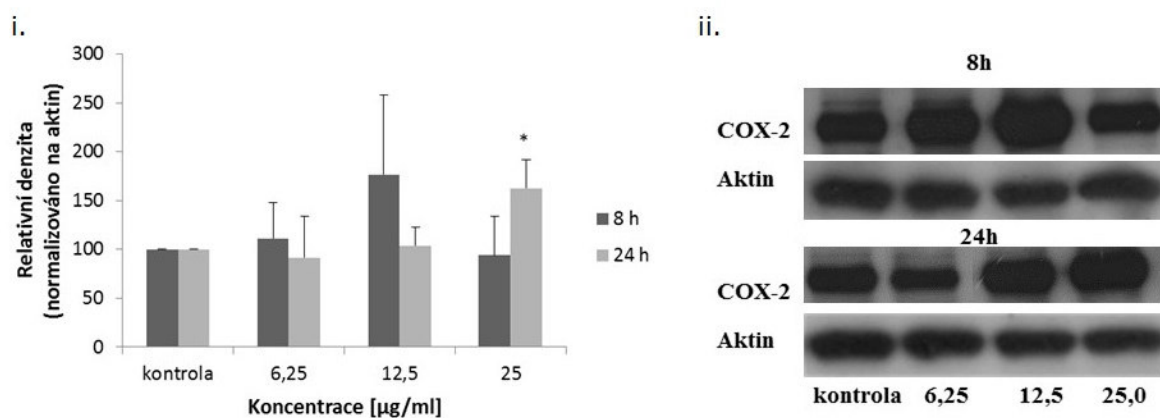
Jak již bylo uvedeno výše, pro nastartování správných reparačních procesů v průběhu hojení ran je velmi důležitá zánětlivá fáze. Z tohoto důvodu byl na experimentálním modelu pro studium hojení ran sledován vliv SeNPs (6,25; 12,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$; 8 a 24 hod) na markery zánětu.

Výsledky stanovení IL-6 metodou ELISA ukazují (Obr. 41), že statisticky významné zvýšení koncentrace tohoto cytokinu bylo zaznamenáno pouze po 8 hod inkubaci HDF s SeNPs v koncentracích 6,25 a 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Po 24 hod nedošlo k ovlivnění koncentrace IL-6 žádnou z testovaných koncentrací SeNPs.



Obrázek 41. Vliv SeNPs na hladinu IL-6 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty $*P \leq 0,05$ jsou statisticky odlišné od poškrábané a zahřáté kontroly.

Dále bylo sledováno ovlivnění exprese COX-2 metodou Western blot (Obr. 42). Bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace SeNPs (25 $\mu\text{g/ml}$) zvyšuje statisticky významně expresi tohoto proteinu po 24 hod inkubaci. U nižších koncentrací (6,25 a 12,5 $\mu\text{g/ml}$) nebyl pozorován žádný vliv na expresi COX-2 v obou časových intervalech.



Obrázek 42. Vliv SeNPs na expresi COX-2 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty $*P \leq 0,05$ jsou statisticky odlišné od poškrábané a zahřáté kontroly. ii) Repräsentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

5.3.3.3 Stanovení markerů zapojených do procesu hojení ran

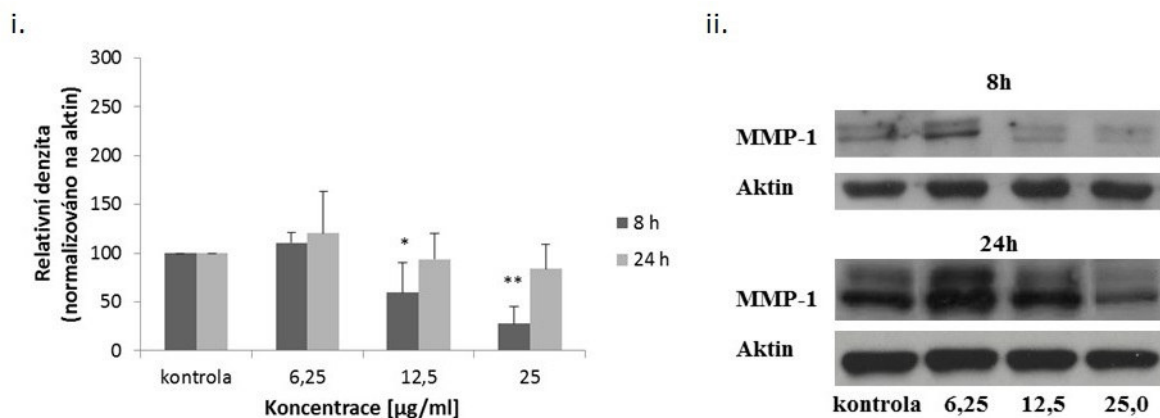
Pro přesnější zjištění možného vlivu SeNPs na hojení ran bylo na experimentálním modelu pro studium hojení ran sledováno ovlivnění metaloproteináz, které jsou do tohoto procesu zapojeny. Metodou Western blot byla studována exprese MMP-1, MMP-2 a MMP3.

Z výsledků na obr. 43 je patrné, že SeNPs snižují expresi MMP-1 v závislosti na koncentraci v obou časových intervalech. Statisticky významné snížení exprese ve srovnání s kontrolou bylo zaznamenáno pouze u koncentrací 12,5 a 25 µg/ml po 8 hod inkubaci.

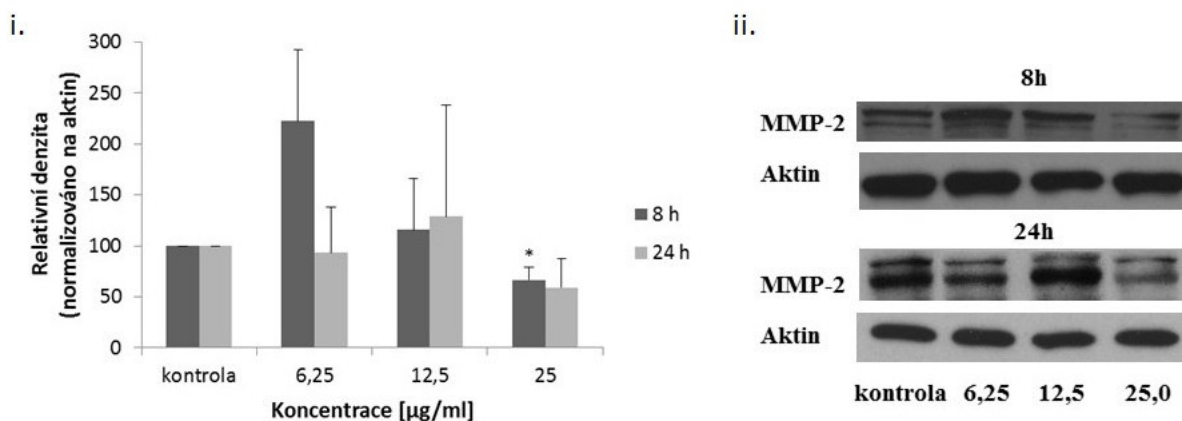
Ovlivnění exprese MMP-2 ukazuje Obr. 44. Nejnižší koncentrace SeNPs (6,25 µg/ml) mírně zvýšila expresi tohoto proteinu, zatímco nejvyšší koncentrace (25 µg/ml) statisticky významně snížila expresi MMP-2 po 8 hod inkubaci. Po 24 hod nebyl zaznamenán žádný vliv SeNPs na expresi tohoto proteinu.

V případě MMP-3 (Obr. 45) došlo ke statisticky významnému ovlivnění exprese pouze nejvyšší koncentrací SeNPs (25 µg/ml) a to v obou časových intervalech. Zatímco po 8 hod bylo zaznamenáno snížení, po 24 hod naopak zvýšení exprese MMP-3.

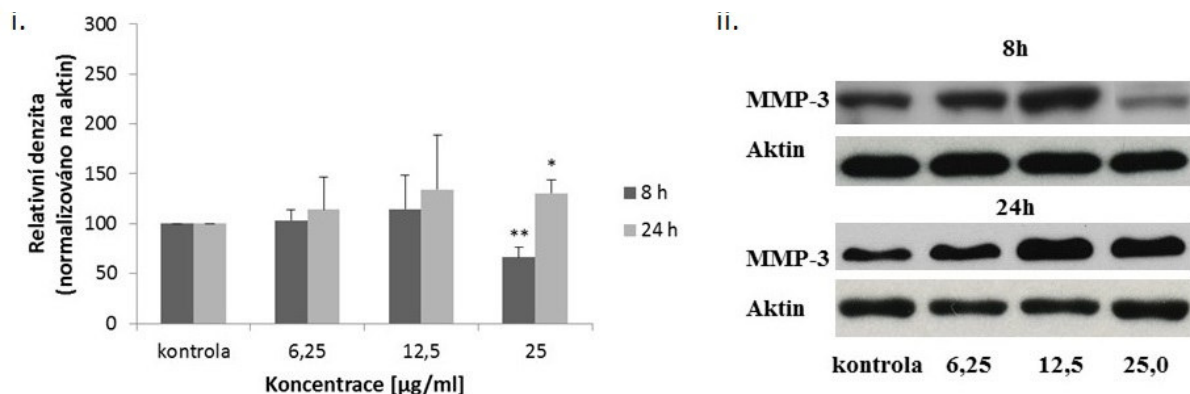
VÝSLEDKY



Obrázek 43. Vliv SeNPs na expresi MMP-1 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze tří měření. Hodnoty * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ jsou statisticky odlišné od poškrábané a zahřáté kontroly. ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.



Obrázek 44. Vliv SeNPs na expresi MMP-2 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze tří měření. Hodnoty * $P \leq 0,05$ jsou statisticky odlišné od poškrábané a zahřáté kontroly. ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.



Obrázek 45. Vliv SeNPs na expresi MMP-3 stanovené na experimentálním modelu pro studium hojení ran. i) Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze tří měření. Hodnoty * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ jsou statisticky odlišné od poškrábané a zahřáté kontroly. ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření.

5.4 *Studium využití lidského séra pro regenerativní medicínu*

5.4.1 STANOVENÍ OPTIMÁLNÍ KONCENTRACE HDF PRO EXPERIMENTY S LS

Před samotným zahájením experimentů s LS byla stanovena optimální koncentrace pro vysetí HDF a bylo ověřeno, zda jsou buňky schopné růst v médiu s přidavkem LS, jak bylo publikováno [108, 111]. HDF byly připraveny v kultivačním médiu s LS (dárce 36 let), vysety v koncentracích 1×10^3 , 2×10^3 a 4×10^3 buněk/cm² a po 7 denní inkubaci byly buňky spočítány. Kontrolní buňky byly připraveny v kultivačním médiu s FBS.

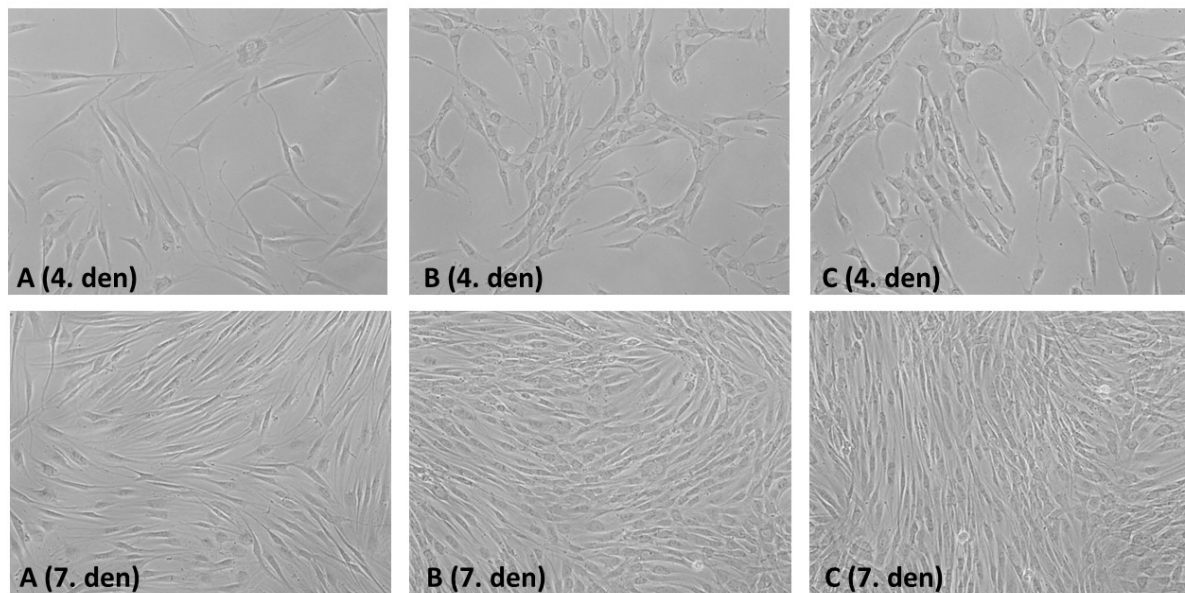
Pro plánované analýzy bylo potřeba více než milion buněk, proto jako nejvhodnější byla vybrána koncentrace 4×10^3 buněk/cm². Při nižších koncentracích kontrolní buňky nedosáhly konfluence. Naopak HDF inkubované v kultivačním médiu s LS dosáhly konfluence ve všech testovaných koncentracích a v případě koncentrací 2×10^3 a 4×10^3 buněk/cm² buňky na konci experimentu již rostly ve dvou vrstvách (data nejsou uvedena).

5.4.2 STANOVENÍ VLIVU LS NA MORFOLOGII A PROLIFERACI HDF

V první sérii experimentů byla hodnocena buněčná morfologie. HDF byly vysety v kultivačním médiu s LS (LS30 a LS90) v koncentraci 4×10^3 buněk/cm² a inkubovány 7 dnů. Kontrolní buňky byly připraveny v experimentálním médiu s FBS. Morfologie buněk byla hodnocena s použitím mikroskopu Nikon eclipse TS 100 (Nikon Instruments Inc., USA).

U HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS Obr. 46 byla 4. den pozorována změna tvaru buněk bez ohledu na věk dárce. Buňky byly ve srovnání s kontrolou kratší a tlustší s výraznějším jádrem. Nebyly pozorovány rozdíly v morfologii mezi buňkami inkubovanými v kultivačním médiu s LS od různě starých dárců. Z Obr. 46 je dále patrné, že HDF inkubované v kultivačním médiu s LS dosáhly rychleji konfluence ve srovnání s kontrolou, která po 7 denní kultivaci zarostla kultivační desku pouze z 80-90 %.

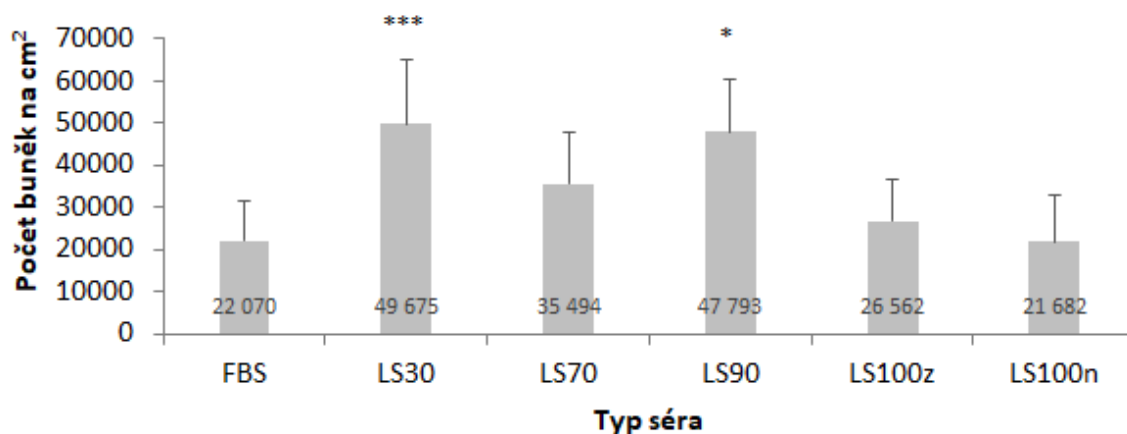
Dále bylo zjištěno, že HDF inkubované v kultivačním médiu s LS se při použití trypsinu rychleji uvolňovaly ode dna kultivační desky. Pro uvolnění kontrolních buněk byl potřeba téměř dvojnásobný čas.



Obrázek 46. Vliv LS na buněčnou morfolonii. Buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s LS30 (B) a LS90 (C). Jako kontrola (A) sloužily buňky inkubované v kultivačním médiu s FBS. Zvětšeno 100x.

V následujících experimentech byl sledován vliv LS na proliferaci HDF. Buňky byly připraveny v kultivačním médiu s LS (LS30, LS70, LS90, LS100z, LS100n) v koncentraci 4×10^3 buněk/cm² a inkubovány 7 dnů. Kontrolní buňky byly připraveny v experimentálním médiu s FBS.

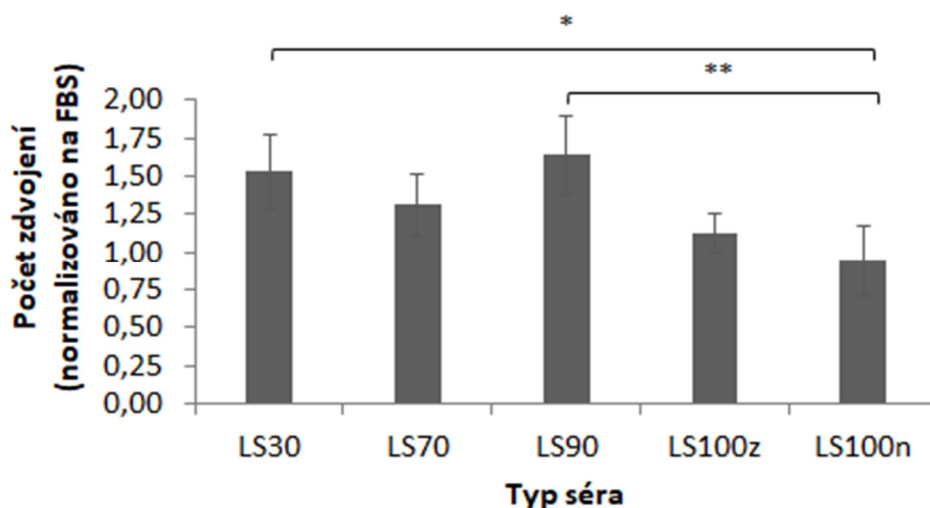
Z výsledků na obr. 47 je patrné, že u buněk inkubovaných v kultivačním médiu s LS30 a LS90 byl po 7 denní kultivaci statisticky významně vyšší počet buněk ve srovnání s kontrolou. Vyšší počet buněk byl zaznamenán i při inkubaci buněk v kultivačním médiu s LS70 a LS100z, avšak tyto rozdíly nebyly v porovnání s kontrolou statisticky významné. U HDF inkubovaných v kultivačním médiu LS100n byl počet buněk srovnatelný s kontrolou.



Obrázek 47. Vliv LS na proliferaci HDF stanovený jako počet buněk/cm² po 7 denní kultivaci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze tří měření. Hodnoty *P ≤ 0,05; ***P ≤ 0,001 jsou statisticky odlišné kontroly (FBS).

LS30/70/90/100 – lidské sérum od 30/70/90/100 letých dárců; z – zdraví; n – nemocní.

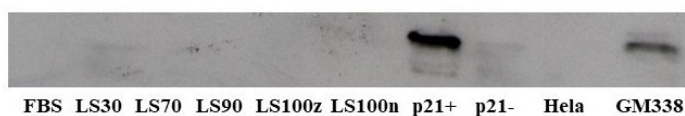
Pro zjištění vlivu LS na proliferaci bylo dále hodnoceno zdvojnásobení počtu buněk. Z výsledků na obr. 48 vyplývá, že HDF rostly lépe v kultivačním médiu s LS30 a LS90 ve srovnání s buňkami inkubovanými v kultivačním médiu s LS100n, které vykazovalo nejhorší vlastnosti pro růst buněk. Tyto výsledky korelují s výsledky získanými u počtu buněk.



Obrázek 48. Vliv LS na proliferaci HDF stanovený jako počet zdvojnásobení buněk po 7 denní kultivaci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD ze tří měření. Hodnoty *P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01 jsou statisticky odlišné LS100n.

LS30/70/90/100 – lidské sérum od 30/70/90/100 letých dárců; z – zdraví; n – nemocní.

Vliv LS na proliferaci HDF byl hodnocen také na úrovni exprese proteinu p53. Tento transkripční faktor bývá snížený u mnoha nádorů, čímž buňky obchází jeho anti-proliferální působení. Zrychlená proliferace bývá pozorována také u keloidů, nadměrně rostoucí jizevnaté tkáně, kde však není exprese p53 snížena, ale naopak zvýšena, což umožňuje odlišení keloidu od klasické jizvy [133]. U HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS (LS30, LS70, LS90, LS100z, LS100n) ani u kontrolních buněk nebyl pomocí Western blot analýzy protein p53 detekován (Obr. 49). Jako pozitivní kontrola byly použity buněčné linie p21+ a GM338, které tento protein stabilně exprimují.



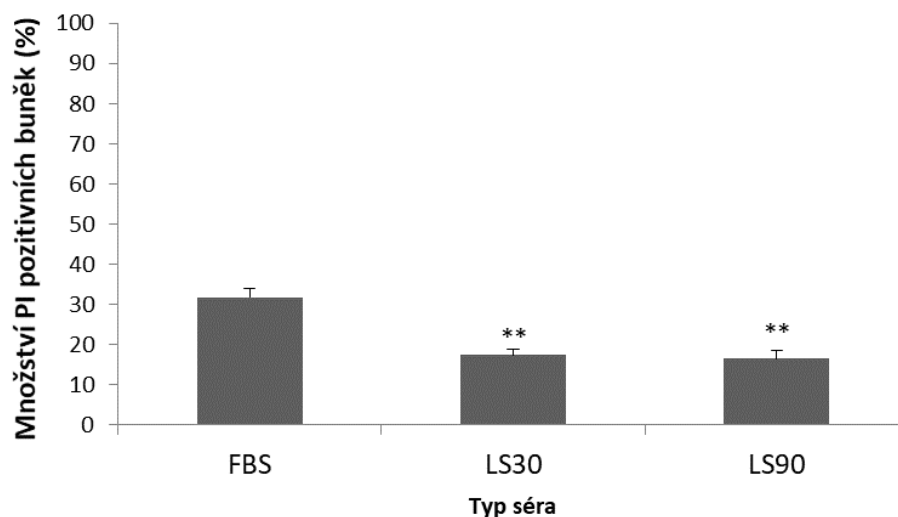
Obrázek 49. Vliv LS na expresi p53 u HDF. Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření. Pozitivní kontrola (buněčná linie p21+ a GM338, které stabilně exprimují p53). *LS30/70/90/100* – lidské sérum od 30/70/90/100 letých dárců; *z* – zdraví; *n* – nemocní.

5.4.3 STANOVENÍ VLIVU LS NA ŽIVOTNOST HDF

Přestože po inkubaci HDF v kultivačním médiu s LS byla pozorována zvýšená proliferace ve srovnání s kontrolními buňkami, byl ověřen možný vliv LS na životnost HDF. Buňky (4×10^3 buněk/cm²) byly vysety v kultivačním médiu s LS (LS30 a LS90) a po 7 denní inkubaci bylo měřeno množství propidium jodid (PI) pozitivních buněk průtokovou cytometrií. Kontrolní buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s FBS.

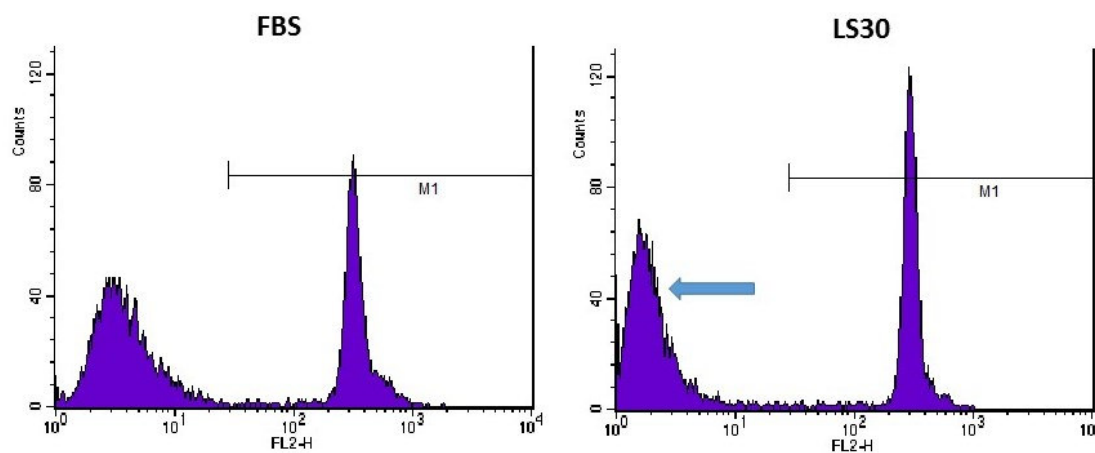
Z výsledků uvedených na Obr. 50 vyplývá, že množství PI pozitivních buněk bylo nižší u HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS30 (17,4 %) a LS90 (16,6 %) ve srovnání s kontrolními buňkami (31,7 %).

Při analýze dat získaných průtokovou cytometrií (Obr. 51) byl pozorován posun v umístění píku PI negativních buněk u HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS30 ve srovnání s kontrolou.



Obrázek 50. Vliv LS na životnost HDF stanovený jako množství PI pozitivních buněk. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty $**P \leq 0,01$ jsou statisticky odlišné kontroly.

LS30/90 – lidské sérum od 30/90 letých dárců; PI – propidium jodid.



Obrázek 51. Posun píku PI pozitivních buněk u HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS30. Kontrolní buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s FBS. *LS30 – lidské sérum od 30 letých dárců; PI – propidium jodid.*

5.4.4 STANOVENÍ VLIVU LS NA BUNĚČNÝ CYKLUS HDF

Vzhledem k tomu, že u HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS byla pozorována zvýšená proliferace buněk, byl následně studován možný vliv LS na buněčný cyklus. HDF (4×10^3 buněk/cm²) byly připraveny v kultivačním médiu s LS (LS30 a LS90) a po 7 denní kultivaci bylo stanoveno zastoupení buněk

VÝSLEDKY

v jednotlivých fázích buněčného cyklu průtokovou cytometrií. Kontrolní buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s FBS.

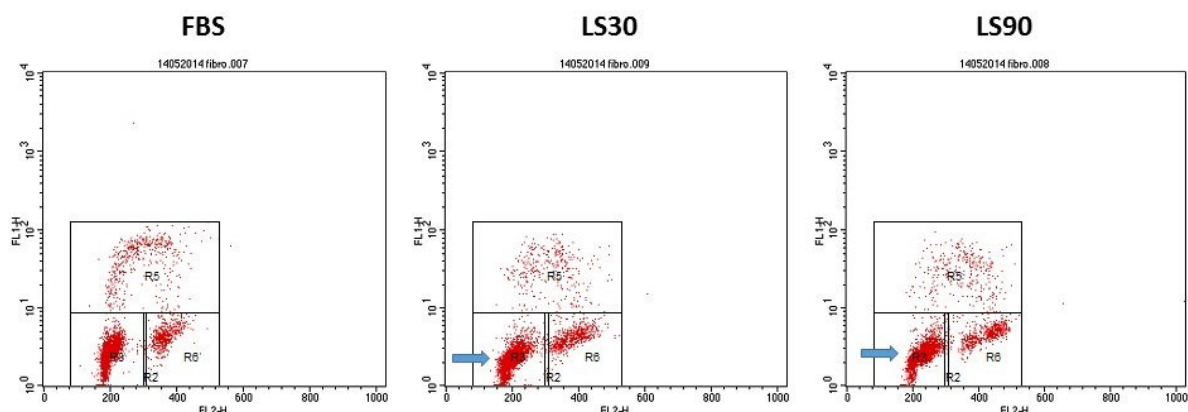
Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu se u HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS a FBS až na S-fázi nijak nelišil (Tabulka 5). V S-fázi bylo pozorováno nižší zastoupení buněk inkubovaných v kultivačním médiu s LS30 (4,88 %) a s LS90 (4,81 %) ve srovnání s kontrolou (8,05 %). Měřením buněčného cyklu bylo dále zjištěno, že HDF byly v normálním diploidním stavu.

Podobně jako při stanovení životnosti buněk, kde byl pozorován posun píku PI pozitivních buněk u HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS30 v porovnání s kontrolou, i zde byly u HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS30 a LS90 pozorovány změny ve tvaru rozptylu, zejména v G₀, G₁ fázi (Obr. 52).

Tabulka 5: Vliv LS na zastoupení HDF v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Fáze buněčného cyklu	FBS [%]	LS30 [%]	LS90 [%]
<i>S</i>	8,05	4,88	4,81
<i>G₂ (M)</i>	10,26	10,89	10,20
<i>G₀, G₁</i>	80,20	82,74	83,89
<i>mimo cyklus</i>	1,25	1,42	1,04

LS30/90 – lidské sérum od 30/90 letých dárců; PI – propidium iodid.



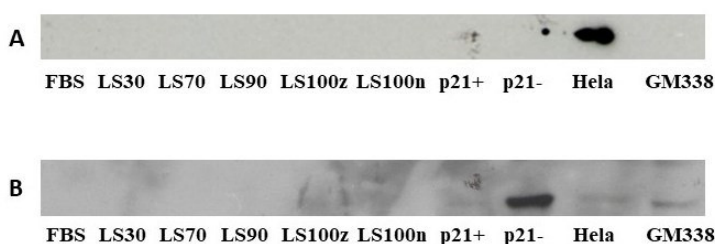
Obrázek 52. Změna tvaru rozptylu v jednotlivých fázích buněčného cyklu u HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS30 a LS90. Nejvýraznější změna v G₀, G₁ fázi označena modrou šipkou. *LS30/90 – lidské sérum od 30/90 letých dárců.*

5.4.5 STANOVENÍ VLIVU LS NA SENESCENCI HDF

Vzhledem k tomu, že předchozí experimenty, zaměřené na studium vlivu LS získaného od dárců různého věku na vlastnosti HDF byly určitou *in vitro* modifikací heterochronní parabiózy, bylo ověřeno, zda při interakci HDF od mladého dárce s LS od starého dárce nedochází k „zestárnutí“ buněk. Přestože zjištěná zvýšená proliferace buněk inkubovaných v kultivačním médiu s LS90, stejně jako morfologie buněk, kdy bylo pozorováno, že buňky jsou kratší a tlustší se zvýrazněným jádrem, zatímco senescentní HDF bývají větší, podlouhlé a zploštělé [134, 135] tomuto jevu nenaskládala.

HDF (dárce 27 let; 4×10^3 buněk/cm²) byly připraveny v kultivačním médiu s LS (LS30, LS70, LS90, LS100z, LS100n) a po 7 denní kultivaci byla stanovena exprese inhibitorů cyklin dependentních kináz p16 a p21, které jsou mimo jiné aktivovány u senescentních buněk a při jejich zvýšené expresi dochází ke zpomalení buněčného cyklu [136]. Kontrolní buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s FBS. Jako pozitivní kontroly byly použity buněčné linie HeLa (exprese p16) a buněčná linie p21+ (exprese p21).

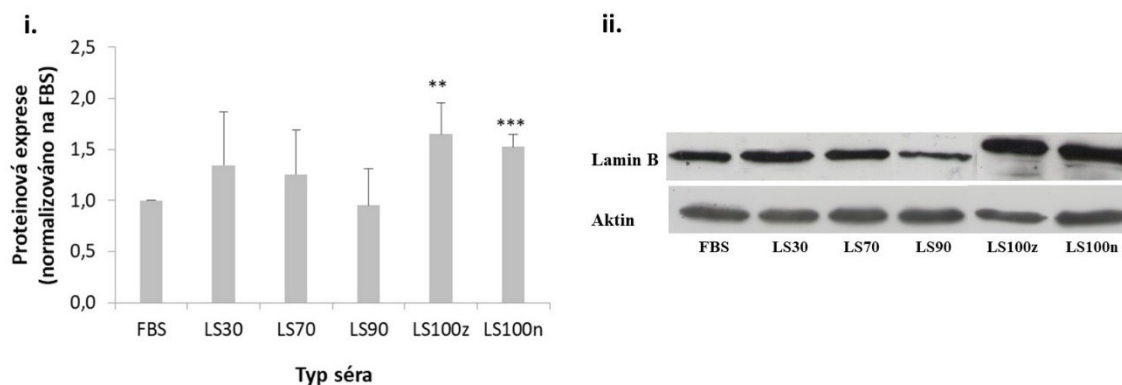
V souladu se zjištěnou zvýšenou proliferací buněk byla exprese inhibitorů p16 (Obr. 53 A) a p21 (Obr. 53 B) ve všech případech negativní. Funkčnost metody prokázala exprese p16 u HeLa buněk a p21 u kontrolních buněk linie p21+. Dále byla sledována exprese nukleárního proteinu laminu B, který je rovněž dáván do souvislosti se stárnutím buněk [137]. Na možné změny jeho exprese poukazovala také zvýrazněná jádra u buněk inkubovaných s LS.



Obrázek 53. Vliv LS na expresi inhibitorů cyklin dependentních kináz p16 (A) a p21 (B) u HDF. Reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých měření. Pozitivní kontroly (exprese p16 – buněčná linie HeLa; exprese p21 – buněčná linie p21+). LS30/70/90/100 – lidské sérum od 30/70/90/100 letých dárců; z – zdraví; n – nemocní.

VÝSLEDKY

V případě laminu B (Obr. 54), bylo pozorováno statisticky významné zvýšení exprese tohoto proteinu u HDF inkubovaných v experimentálním médiu s LS100z a LS100n v porovnání s kontrolou. U buněk inkubovaných v médiu s LS30, LS70 a LS90 nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolou.

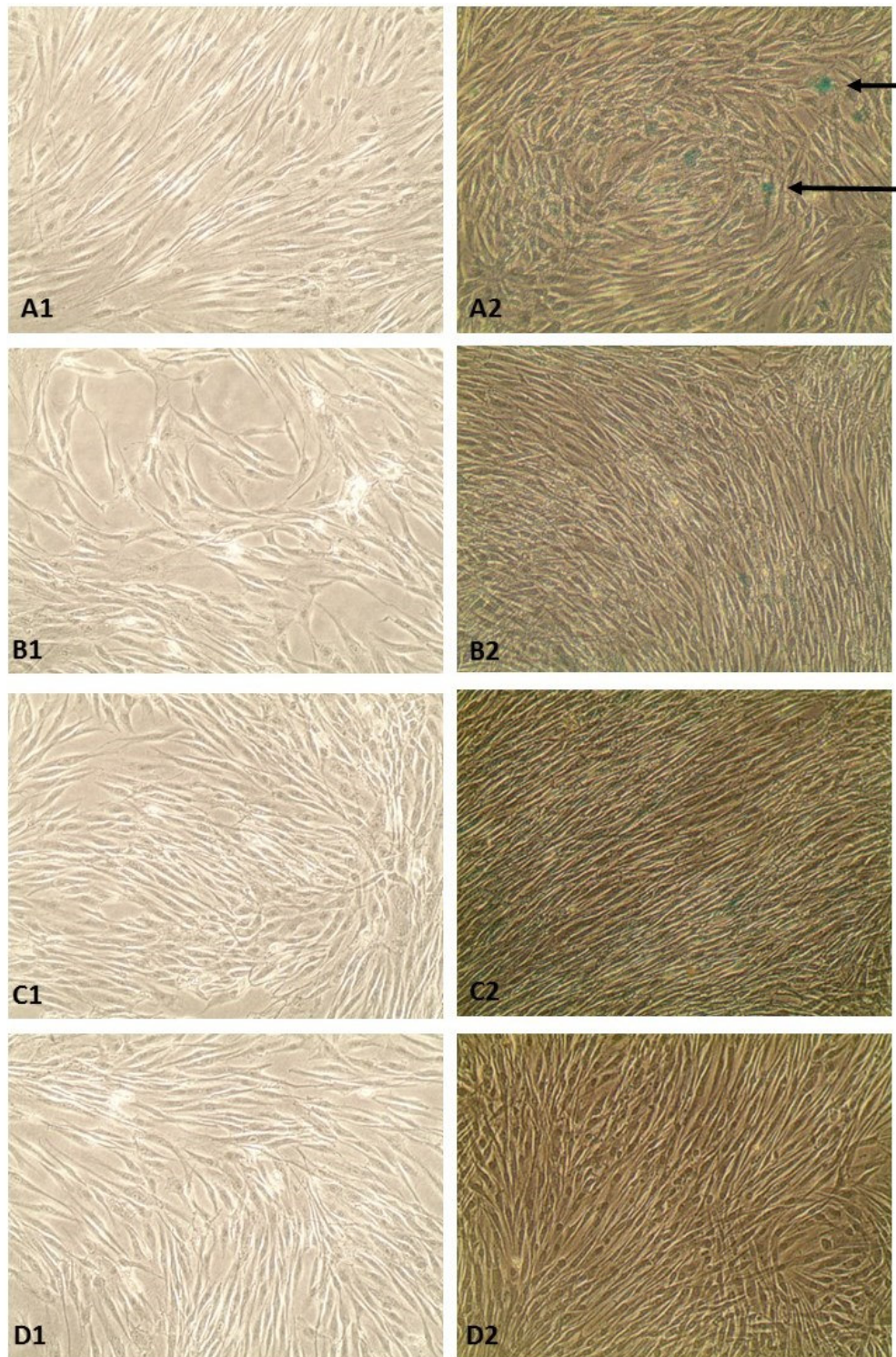


Obrázek 54. Vliv LS na expresi laminu B u HDF. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty $**P \leq 0,01$; $***P \leq 0,001$ jsou statisticky odlišné od kontroly. ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření. LS30/70/90/100 – lidské sérum od 30/70/90/100 letých dárců; z – zdraví; n – nemocní.

Vedle exprese inhibitorů cyklin dependentních kináz a laminu B byla stanovena se senescencí asociovaná β -galaktosidáza (β -gal), která bývá využívána pro odlišení senescentních fibroblastů v kultuře. Tento protein exprimují pouze staré buňky, u kterých dochází k alteraci některých buněčných funkcí.

HDF (dárce 27 a 68 let; 4×10^3 buněk/cm²) byly připraveny v kultivačním médiu s LS (LS30, LS70, LS90) a po 7 denní kultivaci byla stanovena β -gal barvením s mikroskopickou detekcí. Kontrolní buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s FBS.

Z výsledků na Obr. 55 (A1-D1) je patrné, že u HDF (dárce 27 let) inkubovaných v kultivačním médiu s LS (LS30, LS70 a LS90) ani u kontroly nebylo pozorováno modré zbarvení buněk, které by dokazovalo expresi β -gal a tedy senescentních buněk. V případě HDF (dárce 68 let), které byly inkubovány v kultivačním médiu s LS (LS30, LS70 a LS90) a rovněž u kontroly bylo pozorováno modré zbarvení buněk a tedy expresi β -gal, což dokazovalo přítomnost senescentních buněk (Obr. 55 A2 – D2).



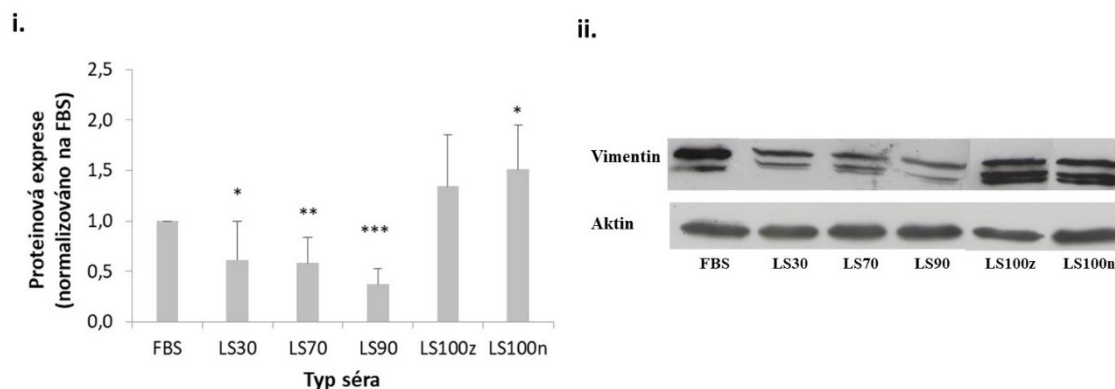
Obrázek 55. Vliv LS na expresi β -gal u HDF. Buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s LS30 (**B**), LS70 (**C**) a LS90 (**D**). Kontrolní buňky byly připraveny v kultivačním médiu s FBS (**A**). Na panelech jsou HDF od (1) 27 letého a (2) 68 letého dárce. Šipky na panelu (**A2**) ukazují modře zbarvené pozitivní β -gal buňky. Zvětšeno 100x.

Ze získaných výsledků exprese inhibitorů cyklin dependentních kináz a β -gal vyplývá, že nedochází k „zestárnutí“ buněk a může být tedy vyloučen vliv negativní heterochronní parabiózy.

5.4.6 STANOVENÍ VLIVU LS NA ADHEZI HDF

Při uvolňování buněk ode dna kultivační nádoby pomocí trypsinu bylo pozorováno, že HDF inkubované v kultivačním médiu s LS se uvolňují rychleji než kontrolní buňky, což by mohlo naznačovat změny v expresi cytoskeletálních proteinů, které zodpovídají za adhezi buněk k povrchu. Z tohoto důvodu byl u HDF (4×10^3 buněk/cm²) inkubovaných v experimentálním médiu s LS (LS30, LS70, LS90, LS100z, LS100n) po 7 denní kultivaci stanoven vimentin, který dominuje u dospělých fibroblastů a má vliv na adhezní proteiny [138]. Kontrolní buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s FBS.

Jak ukazuje Obr. 56 A a C, exprese vimentinu u HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS30, LS70 a LS90 statisticky významně klesala se vzrůstajícím věkem dárců ve srovnání s kontrolou. U HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS100z však došlo ke zvýšení exprese vimentinu a v případě LS100n bylo zvýšení statisticky významné v porovnání s kontrolou.



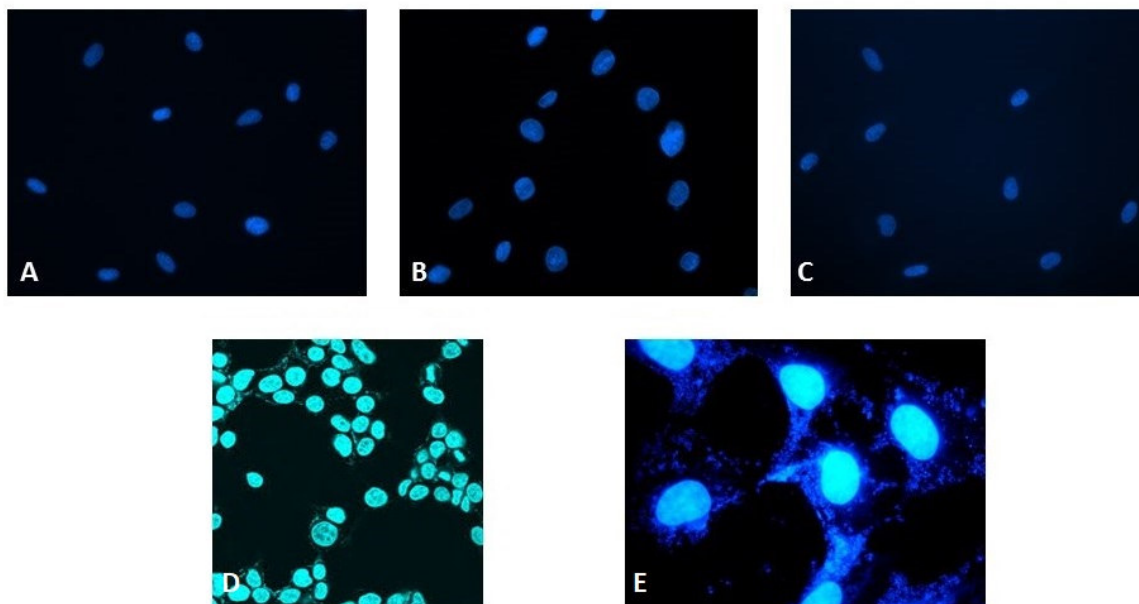
Obrázek 56. Vliv LS na expresi vimentinu u HDF. i) Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD ze tří měření. Hodnoty * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ jsou statisticky odlišné od kontroly. ii) Reprezentativní Western blot ze tří nezávislých měření. LS30/70/90/100 – lidské sérum od 30/70/90/100 letých dárců; z – zdraví; n – nemocní.

5.4.7 VYLOUČENÍ KONTAMINACE MYKOPLAZMATY

Při studiu vlivu LS na HDF sledované vlastnosti buněk vzdáleně připomínaly změny nastávající při kontaminaci mykoplazmaty – zakrnění (zkrácení buněk) a anormální růst [139]. Možnost kontaminace byla ověřena i přesto, že při napadení kultury tímto patogenem obvykle dochází ke zpomalení růstu a buňky nedosáhnou konfluence [140].

HDF ($2,6 \times 10^4$ buněk/cm²) byly připraveny v kultivačním médiu LS (LS30 a LS90) a po 24 hod inkubaci byla po nabarvení (Hoechst) pod fluorescenčním mikroskopem hodnocena přítomnost mykoplazmat. Jako kontrola sloužily buňky inkubované v kultivačním médiu s FBS.

Získané fotografie (Obr. 57 B a C) ukazují, že u HDF inkubovaných v kultivačním médiu s LS30 a LS90 nebyla zaznamenána přítomnost mykoplazmat, stejně jako u kontroly (Obr. 57 A). Byla pozorována pouze nabarvená jádra, zatímco cytoplazma buněk nebyla viditelná. V případě napadení kultury mykoplazmaty by došlo k nabarvení nukleových kyselin těchto patogenů a „svítila“ by celá buňka (Obr. 57 D-E - pozitivní kontroly). Ze získaných výsledků vyplývá, že HDF nebyly kontaminovány mykoplazmaty. Nebyla otestována LS od dárců všech věkových skupin, protože ke změně vzhledu buněk docházelo u všech používaných LS a předpokládala se možná kontaminace kultury HDF, která byla vyloučena.



Weill.cornell.edu (Protocol Mycoplasma Detection Test)

<http://www.cromatida.com/en/Mycoplasma>

Obrázek 57. Detekce mykoplazmat u HDF. Buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s LS30 (B) a LS90 (C). Kontrolní buňky byly připraveny v kultivačním médiu s FBS (A). Zvětšeno 100x. Ilustrační příklady buněk napadených mykoplazmaty (D-E).

6 Diskuse

Předkládaná disertační práce se zabývala studiem látek, které by mohly být přínosné pro hojení ran. V první části práce byl na experimentálním modelu pro studium hojení ran sledován vliv AgNPs, Ag-I a SeNPs na markery zapojené do procesu hojení ran.

Další část disertační práce byla zaměřena na studium využití lidského séra pro regenerativní medicínu. Data byla naměřena během studijní stáže (9 měsíců) na Oddělení experimentální, diagnostické a speciální medicíny Univerzity v Boloni v Itálii.

6.1 Zapojení AgNPs a Ag-I do procesu hojení ran

Vědecké studie udávají, že během života má 1–2 % lidí zkušenost s chronickou ránou [141]. Toto číslo bude rychle narůstat vzhledem ke stárnutí populace [21], protože prevalence nehojících se ran vysoce koreluje s věkem [142]. Z tohoto důvodu je velmi důležité hledat nové a inovovat již známé postupy a látky využívané pro hojení ran. V posledních letech se do popředí zájmu dostaly AgNPs, u kterých bylo prokázáno, že mají potenciál podpořit hojení ran díky protizánětlivým účinkům. Pozitivně zasahují rovněž do procesu reepitelizace, diferenciaci fibroblastů na myofibroblasty a proliferace a migrace keratinocytů, čímž zvyšují rychlost uzavírání rány. Kromě těchto účinků AgNPs zlepšují tahové vlastnosti reparované tkáně do té míry, že se vlastnostmi podobá původní nezraněné kůži [83-85].

Toxicita a vliv AgNPs a Ag-I na buněčnou morfologii a generaci ROS

AgNPs jsou používány v obvazovém materiálu jako antibakteriální krytí na rány, avšak aplikace nanočástic do otevřené rány je jednou z možných cest pro jejich nechtěnou absorpci. Snížení životnosti a změna morfologie bývají jedny z prvních markerů pozorovaných po vystavení buněk AgNPs. Z tohoto důvodu byla nejprve hodnocena toxicita AgNPs a Ag-I a jejich vliv na morfologii buněk.

Výsledky disertační práce ukázaly výrazný rozdíl cytotoxicity mezi AgNPs (0,25; 2,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$; $10,43 \pm 4,74 \text{ nm}$) a Ag-I (roztok AgNO_3 ; 0,025; 0,15 a 0,25 $\mu\text{g/ml}$). Zatímco AgNPs byly v celém testovaném rozmezí netoxické, Ag-I vyvolávaly signifikantní pokles životnosti HDF s IC_{50} 3,1 $\mu\text{g/ml}$. Zjištěné výsledky korelují s publikovanými daty. Sur a kol. popsali, že AgNPs jsou u HDF necytotoxické až do koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ [143], zatímco Hidalgo a kol. zjistili, že Ag-I působí na HDF cytotoxicky při koncentraci nižší než 8,2 $\mu\text{mol/l}$ [144]. Samberg a kol. porovnávali toxicitu nepromytých, promytých a uhlíkem potažených

DISKUSE

AgNPs na lidských kožních keratinocytech. Zjistili, že nepromyté AgNPs (20 a 50 nm) snižují životnost buněk v koncentraci 1,7 $\mu\text{g/ml}$ a AgNPs (80 nm) v koncentraci 0,34 $\mu\text{g/ml}$. Promyté (20, 50 a 80 nm) a uhlíkem potažené (20 a 35 nm) AgNPs naopak životnost lidských kožních keratinocytů neovlivňovaly [145]. Burd a kol. testovali cytotoxicitu pěti komerčně dostupných krytí obsahujících různé množství AgNPs (Acticoat™ (934 $\mu\text{g/cm}^2$), Aquacel® Ag (21 $\mu\text{g/cm}^2$), Contreet® Foam (12 $\mu\text{g/cm}^2$), PolyMem® Ag (139 $\mu\text{g/cm}^2$) a Urgotul®SSD (85 $\mu\text{g/cm}^2$)) na HDF a keratinocytech. Pozorovali, že Acticoat™, Aquacel® Ag a Contreet® Foam, které uvolňovaly 12, 13 a 14 $\mu\text{g/ml}$ Ag do kultivačního média, vykazovaly vyšší toxicitu než PolyMem® uvolňující 4 $\mu\text{g/ml}$ a Urgotul®SSD uvolňující 3 $\mu\text{g/ml}$ [146]. U buněčných linií HepG2 [147] a RAW 264.7 [148] nebyly pozorovány žádné rozdíly v cytotoxicitě AgNPs a Ag-I. Dále bylo zjištěno, že cytotoxicita nanočástic závisí na jejich velikosti. Liu a kol. popsali, že AgNPs o velikosti 5 nm byly toxicitější než Ag-I a AgNPs o velikosti 20 a 50 nm byly naopak méně toxické než Ag-I [149]. Podobně Piao a kol. pozorovali dvojnásobně vyšší toxicitu u AgNPs o velikosti 5–10 nm v porovnání s Ag-I [90]. Naše data ukazují, že AgNPs s průměrnou velikostí 10 nm vykazovaly nižší cytotoxicitu než Ag-I. Rozdíl mezi našimi výsledky a publikovanými daty je způsoben pravděpodobně tím, že v našich experimentech byla použita směs AgNPs o velikosti 0–40 nm.

Kromě cytotoxicity byl sledován také vliv AgNPs a Ag-I na morfologii buněk. U HDF vystavených účinkům AgNPs a Ag-I nebyly pozorovány téměř žádné změny v buněčné morfologii ve srovnání s kontrolními buňkami (Tabulka 3). Kaur a kol. pozorovali zduření buněk a poškození cytoplazmatické membrány u buněčné linie A431 po 24 hod inkubaci s AgNPs (50 a 100 $\mu\text{g/ml}$; 30–50 nm) [89]. Lee a kol. popsali známky buněčné smrti, tedy smrštění buněk, jejich odloučení od inkubační nádoby a pokles proliferace u myších embryonálních fibroblastů vystavených AgNPs (30 $\mu\text{g/ml}$; $26,0 \pm 7,6$ nm) po dobu 24 hod [150]. Méně závažné morfologické změny pozoroval Kang a kol. u ovariální nádorové buněčné linie SK-OV3 po 24 hod expozici AgNPs (10 $\mu\text{g/ml}$; $7,5 \pm 2,5$ nm) [72]. Rozdíly v toxicitě a buněčné morfologii mezi výsledky získanými v rámci disertační práce a daty z výše uvedených studií mohou být způsobeny různým typem buněčných kultur nebo koncentrací a velikostí nanočástic použitých jednotlivými vědeckými skupinami.

Některé studie prokázaly, že AgNPs vedou k produkci ROS, které u biologických systémů způsobují oxidační stres. Carlson a kol. popsali 10-ti násobný nárůst hladiny ROS u alveolárních makrofágů inkubovaných s AgNPs (50 $\mu\text{g/ml}$; 15 nm) [88]. Zvýšená koncentrace ROS byla pozorována také u knock-down HK-2 buněk vystavených AgNPs

DISKUSE

(60 µg/ml; 7,5 nm) [151], u normálních lidských plicních fibroblastů po expozici AgNPs (25 a 50 µg/ml; 6–20 nm) [87] a u myších kožních buněk inkubovaných s AgNPs (100 µg/ml; 100–500 nm) [152]. Rozdílné výsledky pozorovali Kaur a kol. u AgNPs o velikosti 30–50 nm v koncentraci 50 µg/ml. Zatímco u buněčné linie A431 se hladina ROS zvýšila, u buněčné linie RAW nebyla pozorována žádná změna hladiny ROS, a to ani při koncentraci 100 µg/ml. Tento účinek byl vysvětlen tím, že při vysoké koncentraci AgNPs (100 µg/ml) došlo k jejich agregaci. Dále uvedli, že buněčná linie RAW absorbovala AgNPs, a tak mohla odolávat jejich toxickým účinkům, zatímco buněčné linie A431 žádný takový obranný mechanismus nevykazovala [89]. Na druhou stranu Ahlberg a kol. zjistili, že po 3 hod inkubaci lidských keratinocytů s AgNPs (10–50 µg/ml; 70 ± 20 nm) došlo ke snížení hladiny ROS [153]. Výsledky disertační práce ukázaly, že netoxické koncentrace AgNPs (0,25; 2,5 a 25 µg/ml; $10,43 \pm 4,74$ nm) a Ag-I (0,025; 0,1 a 0,25 µg/ml) po 8 a 24 hod inkubaci nezpůsobily zvýšení hladiny ROS u HDF ve srovnání s kontrolou (Obr. 16). Výsledky studií ukazují, že produkce ROS způsobená AgNPs závisí na použitém buněčném modelu, velikosti a koncentraci nanočástic.

Vliv AgNPs a Ag-I na markery zapojené do procesu hojení ran

Při poranění jsou buňky vystaveny různým druhům stresu, zejména oxidačnímu a teplotnímu. Aby se experimentální model pro studium hojení ran přiblížil co nejvíce realitě, byly HDF mechanicky poškozeny (poškrábáním 200 µl pipetovací špičkou) a následně vystaveny zvýšené teplotě (42 °C; 1 hod). Dílčím cílem disertační práce bylo zjistit, zda netoxické koncentrace AgNPs mohou podpořit hojení ran u HDF modulací klíčových transkripčních faktorů, které koordinují buněčnou stresovou odpověď (Nrf2) a zánět (NF-κB), a jaký je jejich vliv na další molekuly zapojené v procesu hojení ran. Vliv AgNPs byl porovnáván s účinky Ag-I.

Aktivované neutrofilní granulocyty a makrofágy produkují v ráně velké množství ROS [154], které vede ke snížené migraci fibroblastů [155]. Pokud dojde ke zvýšení hladiny ROS nad normální hodnoty, Nrf2 aktivuje expresi celé řady antioxidačních genů a proteinů stresové odpovědi (např. HO-1) jejímž výsledkem je ochrana buňky před oxidačním poškozením. Z výsledků vyplývá, že nižší koncentrace AgNPs (0,25 a 2,5 µg/ml) neměly vliv na hladinu ROS, zatímco nejvyšší koncentrace (25 µg/ml) zvýšila hladinu ROS po 8 hod inkubaci (Obr. 21). Dále bylo zjištěno, že nižší koncentrace (0,25 a 2,5 µg/ml) zmenšovaly plochu rány po 24 a 48 hod (Obr. 30). Tyto výsledky korelují se zjištěními pro expresi jaderné frakce Nrf2 a expresi HO-1. Bylo pozorováno, že nižší koncentrace AgNPs (0,25 a 2,5 µg/ml)

DISKUSE

zvýšily expresi jaderné frakce Nrf2 (Obr. 22) a HO-1 (Obr. 23), zatímco nejvyšší koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ způsobila pokles Nrf2 v jádře. Tyto výsledky naznačují, že nízké koncentrace AgNPs (0,25 a 2,5 $\mu\text{g/ml}$) chrání HDF před oxidačním stresem a tak zlepšují hojení ran aktivací dráhy Nrf2. Naopak nejvyšší koncentrace AgNPs (25 $\mu\text{g/ml}$) potlačuje dráhu tohoto transkripčního faktoru a tak zvyšuje citlivost buněk k oxidačnímu stresu, což může vést ke zhoršenému hojení ran. Tyto závěry však ještě musí být potvrzeny na úrovni genu. Výsledky získané po 24 hod inkubaci HDF s 25 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs však odporují této teorii. Pozorovaný pokles hladiny ROS nebyl způsoben aktivací HO-1 přes dráhu Nrf2. Je možné, že vyšší koncentrace AgNPs může aktivovat expresi HO-1 a tak vést k poklesu ROS jinou dráhou stimulující redoxně-senzitivní transkripční faktory, jako je např. aktivační protein AP-1 nebo proteiny teplotního šoku [156]. Publikované studie potvrzují, že AgNPs může zvyšovat expresi proteinu AP-1 [157]. Výsledky naší studie dále ukázaly, že AgNPs po 24 hod inkubaci snižují expresi jaderné frakce Nrf2 a zvyšují expresi HO-1 v závislosti na koncentraci. Tyto výsledky mohou být spojeny se skutečností, že zvýšení Nrf2 a HO-1 kulminuje 8 hod po expozici AgNPs a následně klesá, což je v souladu se studií Aueviriyavita a kol. [158]. Při srovnání účinků AgNPs a Ag-I bylo zjištěno, že Ag-I způsobuje v nižších koncentracích (0,025 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$) výraznější zvýšení exprese jaderné frakce Nrf2 (Obr. 22). U generace ROS (Obr. 21) však nebyl zaznamenán takový pokles jako u AgNPs, což je pravděpodobně způsobeno expresí HO-1 (Obr. 23), která je v případě Ag-I daleko nižší než v případě AgNPs.

Existuje několik studií zaměřených na sledování vlivu AgNPs na signální dráhu Nrf2/HO-1, avšak výsledky těchto studií jsou rozdílné. Kang a kol. prokázali aktivaci této dráhy v odpovědi na 24 hod inkubaci buněk SK-OV3 s AgNPs (10 $\mu\text{g/ml}$) [72]. Podobně Aueviriyavit a kol. popsali aktivaci této dráhy po 6 hod inkubaci buněk Caco-2 s AgNPs v koncentracích 15 a 40 $\mu\text{g/ml}$ [158]. Na druhou stranu Piao a kol. pozorovali pokles exprese Nrf2, jeho translokace do jádra a snížení transkripční aktivity Nrf2 po 6–24 hod inkubaci lidských jaterních buněk Chang s AgNPs (4 $\mu\text{g/ml}$) [159]. Z výsledků výše uvedených studií vyplývá, že koncentrace AgNPs nad 10 $\mu\text{g/ml}$ mají toxické účinky vlivem zvýšené produkce ROS a signální dráha Nrf2/HO-1 hraje klíčovou roli v cytoprotektivní odpovědi po vystavení buněk AgNPs. Na druhou stranu, výsledky naší práce na experimentálním modelu pro studium hojení ran ukazují, že nižší koncentrace AgNPs (0,25 a 2,5 $\mu\text{g/ml}$) neindukují generaci ROS, ale naopak napomáhají aktivaci signální dráhy Nrf2/HO-1, a tak chrání HDF před oxidačním stresem a podporují hojení ran. Tyto výsledky potvrzují i data získaná při rýhovém testu (Obr. 29 a 30).

Během poranění jsou buňky kromě oxidativního stresu vystaveny i stresu teplotnímu, v rámci něž dochází k aktivaci HSP. Vlivem AgNPs na HSP se zabývalo několik prací [160-162]. Kang a kol. pozorovali pouze nepatrný vliv AgNPs (60 µg/ml; 7,5 nm) na expresi HSP70 a HSP90 u knock-down HK-2 buněk po 24 hod inubaci [151]. Odlišné výsledky publikovali Foldbjerg a kol., kteří porovnávali účinek AgNPs (12,1 µg/ml; 15,9 nm) a Ag-I (1,3 µg/ml) na expresi malých (HSPB7, HSPB8, HSPB9 a HSPB10) a velkých (HSP70 a HSP90) HSP u buněčné linie A549. Zatímco u malých (HSPB8 a HSPB11) HSP bylo zaznamenáno pouze mírné zvýšení exprese těchto proteinů a nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi účinkem AgNPs a Ag-I, u HSP90 bylo pozorováno výraznější zvýšení exprese tohoto proteinu vlivem AgNPs ve srovnání s Ag-I [161]. Tyto výsledky částečně korelují s výsledky naší práce, ve které bylo rovněž pozorováno výraznější zvýšení exprese HSP90 vlivem AgNPs ve srovnání s Ag-I (Obr. 25). V naší studii byl rovněž pozorován menší účinek AgNPs a Ag-I na HSP27 v porovnání s HSP90, ale na rozdíl od výše zmiňované studie byl zaznamenán výraznější vliv Ag-I na HSP27 ve srovnání s AgNPs (Obr. 24). Je však důležité si uvědomit, že HSP mají u hojení ran i jiné uplatnění než jen reakci na buněčný stres [75]. Zvýšení exprese HSP90 účinkem AgNPs může být pozitivní např. proto, že tento protein je nezbytný pro translokaci FGF 1 a 2 do buňky a tedy správné fungování FGF signální kaskády, která je důležitá pro mnoho procesů, jako je proliferace, angiogeneze, migrace, přežívání a diferenciací buněk [163].

Se zarůstáním rány a migrací fibroblastů souvisí také MMP. Během hojení ran je pro tyto buňky typická zejména MMP-2 [76]. V nedávné studii bylo prokázáno, že AgNPs (0,25–25 µg/ml; 10 nm) neměly vliv na expresi MMP-2 u HDF a lidských keratinocytů [38]. Naproti tomu Jain a kol. zjistili, že AgNPs (7–20 nm) snižují aktivitu MMP-2 v závislosti na koncentraci (6,25–100 µg/ml) [164]. V naší práci byla pozorována zvýšená exprese MMP-2 u nejnižší koncentrace AgNPs (0,25 µg/ml), zatímco u vyšších koncentrací (2,5 a 25 µg/ml) se exprese tohoto proteinu příliš nelišila od kontroly (Obr. 32A). Tyto výsledky korelují s výsledky rýhového testu, kde byla u nejnižší koncentrace (0,25 µg/ml) zaznamenána nejmenší plocha rýhy a tedy její nejlepší zarůstání. Se zvyšující se koncentrací AgNPs byla plocha rýhy větší a tedy její zarůstání horší. V případě Ag-I byla po 8 hod inkubaci pozorována zvýšená exprese MMP-2 u všech studovaných koncentrací (0,025; 0,1 a 0,25 µg/ml) zatímco po 24 hod byla zaznamenána snížená exprese tohoto proteinu (Obr. 32B). Tyto výsledky nekorelují s výsledky rýhového testu, kde byla v obou časových intervalech u všech koncentrací zaznamenána větší rýha v porovnání s kontrolou a tedy horší zarůstání rány. Z výsledků disertační práce tedy vyplývá, že AgNPs v nízkých koncentracích

přispívají ke zrychlení buněčné migrace a tak zarůstání rýhy díky degradaci kolagenu [76, 77], zatímco v případě Ag-I by mohlo docházet k aktivaci inhibujícího efektu na buněčnou proliferaci [78]. Zhoršené zarůstání rýhy účinkem Ag-I by mohlo souviset i s pozorovanou zvýšenou hladinou ROS (Obr. 21).

Redoxní signalizace indukovaná oxidačním stresem vede k aktivaci transkripčních faktorů např. NF- κ B, který dále spouští expresi prozánětlivých genů včetně IL-6. Transkripční faktor NF- κ B je nezbytný pro vrozenou imunitní odpověď proti mikroorganismům vstupujícím do rány [51], ale dlouhotrvající nadměrná exprese může způsobit chronický zánět [53]. Vyhodnocení role IL-6 během hojení ran je rovněž komplikované. Jeho nedostatek vede ke špatnému hojení, naopak dlouhotrvající zvýšená exprese může způsobit vznik jizev [56]. V dřívějších studiích bylo publikováno, že AgNPs mohou ovlivnit signální dráhu NF- κ B, ale výsledky jsou protichůdné. Některé studie ukazují, že AgNPs zvyšují expresi NF- κ B [165-169], což vede k transkripci mnoha genů zapojených do zánětlivé odpovědi např. IL-6, IL-8, COX-2 a TNF- α [166, 167], jiné studie uvádějí, že expozice AgNPs nevede ke změnám NF- κ B [169] případně snižuje [170] expresi tohoto transkripčního faktoru v buňkách (viz Tabulka 6). Podobně rozporuplné jsou i výsledky studií zabývajících se vlivem AgNPs na hladinu IL-6. Samberg a kol. popsali zvýšení koncentrace IL-6 u lidských epidermálních keratinocytů vystavených AgNPs (0,34 μ g/ml; 20, 50 a 80 nm) po dobu 24 hod [145], zatímco Greulich a kol. pozorovali snížení koncentrace IL-6 u lidských mezenchymálních kmenových buněk po 7 denní expozici AgNPs (2,5 a 50 μ g/ml; 100 nm) a Ag-I (2,5 a 50 μ g/ml) [171]. Yen a kol. nezaznamenali žádný vliv AgNPs (1 μ g/ml; 2–40 nm) na koncentraci IL-6 u myších makrofágů [91]. Výsledky disertační práce ukázaly, že AgNPs v koncentraci 0,25 μ g/ml zvyšují expresi NF- κ B u HDF po 8 hod inkubaci, zatímco po 24 hod inkubaci buněk s AgNPs (0,25 a 2,5 μ g/ml) byla jeho exprese snížena (Obr. 28). Tyto výsledky korelují se zjištěními pro IL-6, kde byl pozorován pokles koncentrace tohoto cytokinu (Obr. 26). Získaná data naznačují, že AgNPs v koncentracích 0,25 a 2,5 μ g/ml by mohly předcházet vzniku chronických ran potlačením dráhy NF- κ B, ovšem tyto závěry musí být potvrzeny na úrovni genu. Z výsledků naší práce a výše uvedených studií vyplývá, že buněčný model, doba expozice, koncentrace a velikost nanočástic hrají důležitou roli při výsledném vlivu AgNPs na dráhu NF- κ B.

Tabulka 6: Vliv AgNPs na expresi transkripčního faktoru NF- κ B.

Expresa NF- κ B	Koncentrace [μ g/ml]	Velikost (nm)	Typ buněk	Inkubační doba (h)	Zdroj
<i>zvýšení</i>	0,3; 1; 3	66,2–77,2	HepG2	24	[172]
<i>zvýšení</i>	3; 10; 30	119–170	HepG2	24	[172]
<i>zvýšení</i>	100	20 a 200	HepG2	6	[169]
<i>zvýšení</i>	5	15, 25, 40 a 45	myší makrofágy	24	[167]
<i>zvýšení</i>	20	140	NHDF	8 a 24	[168]
<i>zvýšení</i>	0,05–0,2	5–10	lidské T-lymfocyty	24	[166]
<i>zvýšení</i>	400	6–20	plicní a mozkové buňky	48	[165]
<i>beze změn</i>	100	20 a 200	epiteliální buňky A549	6	[169]
<i>snížení</i>	50; 100; 150; 200	20–100	HCT116 nádorové buňky tračníku	48	[170]
<i>zvýšení</i>	0,25	10	NHDF	8	naše data
<i>snížení</i>	0,25; 2,5	10	NHDF	24	naše data
<i>beze změn</i>	25	10	NHDF	8 a 24	naše data

Mezi protizánětlivé molekuly aktivované transkripčním faktorem NF- κ B patří také COX-2, proto byl sledován vliv AgNPs a Ag-I na expresi tohoto proteinu. Vzhledem k tomu, že po 24 hod inkubaci HDF s AgNPs (0,25 a 2,5 μ g/ml) došlo ke snížení exprese NF- κ B předpokládali jsme, že dojde ke snížení i COX-2. Překvapivě však bylo pozorováno výrazné koncentračně a časově závislé zvýšení exprese tohoto proteinu (Obr. 27). Toto zjištění je v souladu se závěry Nishanth a kol., kteří pozorovali časově závislé zvýšení COX-2 na úrovni proteinu a RNA u myších makrofágů RAW 264.7 po 6, 12, 24 a 48 hod aplikaci AgNPs (5 μ g/ml; 15 a 40 nm) [167]. Dále pozorovali větší nárůst COX-2 po expozici menších nanočástic (15 nm), které se svou velikostí blíží námi testovaným AgNPs (10,43 \pm 4,74 nm). Časově závislé zvýšení exprese COX-2 bylo rovněž popsáno dalším výzkumným týmem z našeho pracoviště u lidských keratinocytů a HDF po 24 a 48 hod

expozici AgNPs (0,25; 2,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$) [38]. U Ag-I jsme naopak pozorovali pokles exprese COX-2 (Obr. 27). Na základě našich výsledků lze říci, že studované nanočástice pravděpodobně neaktivují COX-2 přes dráhu transkripčního faktoru NF- κ B. V dalších experimentech by bylo vhodné ověřit, zda jsou do jeho aktivace zapojeny např. MAP kinázy [173]. Stejně tak by bylo vhodné stanovit dlouhodobý vliv AgNPs na expresi COX-2, protože zvýšení exprese tohoto enzymu na počátku hojení ran může pomoci rychlé aktivaci obranné zánětlivé reakce, ovšem v pozdějších fázích hojení ran by bylo kontraproduktivní.

6.2 *Zapojení SeNPs do procesu hojení ran*

V současné době je hlavní zájem o studium SeNPs v oblasti protinádorové terapie. Díky jejich antioxidačním [96-98, 100, 101], protizánětlivým [96], imunitní systém stimulačním [98, 99], antibakteriálním a antivirovým [103, 174, 175] účinkům by mohly být využity, podobně jako AgNPs, také při hojení ran. Na druhou stranu některé *in vitro* studie popsaly jejich cytotoxicitu a antiproliferační účinky díky nimž jsou SeNPs často studovány jako potenciální látky proti rakovině. Tyto účinky však závisí na druhu použitých SeNPs, jejich koncentraci a době působení. Jedním z cílů disertační práce bylo stanovit možnou toxicitu SeNPs a vliv na morfologii HDF, vyhodnotit antibakteriální aktivitu SeNPs a na modelu pro studium hojení ran sledovat vliv na markery zapojené do procesu hojení ran.

Toxicita SeNPs a vliv na buněčnou morfologii, antibakteriální aktivitu, generaci ROS a IL-6

V rámci disertační práce byla nejprve sledována toxicita SeNPs (55 nm; 0,2–50 $\mu\text{g/ml}$) na buněčném modelu HDF po 24 hod inkubaci. Byl pozorován pokles životnosti buněk v závislosti na koncentraci a stanovena hodnota IC_{50} $13,7 \pm 0,9$ $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 33). Porovnání našich dat s publikovanými výsledky není jednoduché. Jak již bylo uvedeno výše, práce se převážně věnují protinádorovému působení SeNPs a pro stanovení toxicity využívají zejména buněčné nádorové linie. Normální (nenádorové) buňky jsou využívány pouze v některých případech jako kontroly. Druhým problémem pro jednoduché porovnání výsledků je, že testované SeNPs bývají často modifikovány, např. polysacharidy [100, 176-178] nebo organickými kyselinami [179, 180] pro zlepšení jejich vlastností jako je stabilita [100], vychytávání SeNPs buňkami [176, 179] a cytotoxicita [179]. Hodnoty IC_{50} přehledně ukazuje Tabulka 7. Je patrné, že hodnoty IC_{50} se liší v závislosti na typu použitých buněk, velikosti a modifikaci SeNPs a na době působení. Ze studií, které porovnávaly hodnoty IC_{50}

na normálních (nenádorových) buňkách s nádorovými liniemi vyplývá, že SeNPs působí toxičtěji na nádorové buněčné linie, což značí selektivní toxicitu SeNPs [100, 102, 177, 179-181].

Výsledky toxicity korelují s pozorovanou změnou morfologie buněk (Obr. 34). Nejnižší koncentrace SeNPs (6,25 µg/ml) nevyvolala u HDF žádné změny buněčné morfologie, zatímco vyšší koncentrace (12,5 a 25 µg/ml) způsobily ztrátu typického vřetenovitého tvaru buněk. Změna morfologie buněk způsobená účinkem SeNPs byla popsána rovněž u buněčné linie HepG2. Změna tvaru buněk na sférický byla pozorována vlivem SeNPs (70 nm; 10 µg/ml) [102] a SeNPs (40–60 nm; 1 µg/ml; stabilizace chitosanem) [176]. Luo a kol. pozorovali zakulacené buňky se sníženou adhezí u buněčných linií HeLa a MDA-MB-231 po 24 hod inkubaci s SeNPs (133 nm; 0,8–3,2 µg/ml) [99]. Znamky apoptózy byly popsány u buněk A375 po 24 hod expozici SeNPs (59 nm; 1,6–3,2 µg/ml; modifikace polysacharidem z řas) a u HeLa buněk po aplikaci SeNPs (50 nm; 12 µg/ml; modifikace kyselinou sialovou) [100, 179].

V rámci disertační práce byla sledována také antibakteriální aktivita SeNPs. Bylo zjištěno, že SeNPs působí baktericidně na dva kmeny *Staphylococcus aureus* (včetně methicilin-rezistentního) a na dva kmeny rodu *Candida*. Dále bylo zaznamenáno, že SeNPs působí bakteriostaticky na jeden kmen *Streptococcus haemolyticus* (Tabulka 4). Naše výsledky korelují s publikovanými daty. Tran a kol. pozorovali inhibici růstu a pokles množství živých bakterií *Staphylococcus aureus* účinkem SeNPs (40–60 nm; 7,8; 15,5 a 31 µg/ml) [182]. Vedle inhibice růstu *Staphylococcus aureus* byl popsán také antibakteriální vliv SeNPs (50–100 nm; 69 g/m²) na *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli* [183]. Cermonini a kol. publikovali antimikrobiální vliv tří druhů SeNPs (syntetizovaných v *Stenotrophomonas maltophilia* (170,6 nm), v *Bacillus mycoides* (160,6 nm) a chemicky (102,5 nm)) na kmeny *Pseudomonas aeruginosa* (8–512 µg/ml), *Candida albicans* (256–512 µg/ml) a *Candida parapsilosis* (512 µg/ml) [184]. Zastavení růstu *Candida albicans* potvrdili také Kheradmand a kol. u SeNPs (25–250 nm) získaných z *Lactobacillus plantarum* a *actobacillus johnsonii* [185].

Tabulka 7: Cytotoxicita SeNPs.

Typ buněk	IC ₅₀ (µg/ml)	Velikost (nm)	Inkubační doba (h)	Modifikace	Zdroj
HDF (lidské kožní fibroblasty)	5,36	59	72	polysacharid z mořských řas	[100]
	10,1	99,8 ± 0,5	72	polysacharid z houby	[176]
	13,7 ± 0,9	55	24	—	naše data
NIH-3T3 (linie myších embryonálních fibroblastů)	149 ± 0,5	64 ± 0,158	4	dextrin	[178]
	87 ± 0,7	?	4	—	
HK-2 (linie lidských renálních epitelii)	přes 40,0	50	72	kyselina sialová	[179]
	6,28 ± 0,41	50	24	polysacharid z mořských řas	[177]
	8,07	60	48	Se/Ru + kyselina gallová	[180]
MCF-7 (linie lidského prsního adenokarcinomu)	41,5	80–220	24	—	[98]
	1,11	59	72	polysacharid z mořských řas	[100]
	0,3	99,8 ± 0,5	72	polysacharid z houby	[176]
	15,8	255–615	72	—	
HeLa (linie lidského adenokarcinomu děložního hrdla)	0,63	60	48	Se/Ru + kyselina gallová	[180]
	1,58	105	48	kyselina gallová	
	přes 3,95	100–200	48	—	
	11,1	50	72	kyselina sialová	[179]
	29,4	442	72	—	
HepG2 (linie lidského nádoru jater)	1,04	59	72	polysacharid z mořských řas	[100]
	1–5	40–60	48	—	[186]

Selen je dobře známý antioxidant. Existují však práce, které popisují zvýšení hladiny ROS u buněk působením SeNPs [100, 176, 181, 187], což může být užitečné zejména v protinádorové terapii. Zvýšená hladina ROS byla pozorována u HepG2 buněk vlivem SeNPs s ATP (40 nm; 0,8–3,2 µg/ml) [181], u buněčné linie A375 účinkem SeNPs (59 nm; 1,6 a 3,2 µg/ml; modifikace polysacharidem z mořských řas) [100], u MCF-1 buněk po aplikaci SeNPs (99,8 nm; 1,6 µg/ml; modifikace polysacharidem z houby) [176] a u nádorových plicních buněk H157 vlivem SeNPs endogenně vytvořených inkubací se selenitem v koncentraci 10 µmol/l [187]. Na druhou stranu Jiang a kol. pozorovali pokles hladiny ROS u glioblastomových buněčných linií (lidské U87 a krysí C6) vlivem SeNPs (50 nm; 3,15–6,3 µg/ml; modifikace polysacharidem z mořských řas) [177]. Podobně Forootanfar a kol. prokázali zvýšení vychytávání volných radikálů po aplikaci SeNPs (80–220 nm; 200 µg/ml) na buněčnou linii MCF-7 [98]. Studium vlivu SeNPs na normální (nenádorové) buňky se zabývali Torres a kol., kteří po aplikaci SeNPs (100 nm; čisté nebo stabilizované L-cysteinem) na endotelové buňky HUVEC pozorovali pokles tvorby ROS [188]. Výsledky této studie částečně korelují s výsledky naší práce (Obr. 35), ve které byl zaznamenán pokles hladiny ROS po 24 hod inkubací HDF s SeNPs (6,25 a 12,5 µg/ml). Naopak nejvyšší koncentrace (25 µg/ml) způsobila zvýšení hladiny ROS, ačkoliv toto zvýšení nebylo statisticky významné. Je tedy možné, že toxicita SeNPs u vyšších koncentrací je způsobená oxidačním stresem.

Zánět je klíčový proces pro hojení ran, který může být indukovaný právě oxidačním stresem. Z tohoto důvodu byl v rámci disertační práce sledován také vliv SeNPs na koncentraci prozánětlivého cytokinu IL-6, přičemž bylo zjištěno, že po 24 hod aplikaci SeNPs došlo pouze k mírnému zvýšení koncentrace tohoto cytokinu (Obr. 36). Naše zjištění jsou v souladu s daty Cermonini a kol., kteří pozorovali statisticky nevýznamné zvýšení prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-8, IL-12 a TNF- α u HDF a dendritických buněk po 24 hod inkubací s SeNPs (500 µg/ml) [184].

Vliv SeNPs na markery zapojené do procesu hojení ran

Dalším dílčím cílem disertační práce bylo posoudit zapojení SeNPs do procesu hojení ran. K tomuto účelu byl použit stejný experimentální model pro studium hojení ran jako při experimentech s AgNPs a Ag-I. Na tomto modelu byl nejprve sledován vliv SeNPs (6,25; 12,5 a 25 µg/ml) na buněčnou morfologii. Bylo zjištěno, že s výjimkou nižší hustoty HDF u koncentrací 12,5 a 25 µg/ml nebyl pozorován žádný vliv na buněčnou morfologii. U všech buněk byl zachován vřetenovitý tvar charakteristický pro fibroblasty (Obr. 37 C-E).

DISKUSE

Tyto výsledky naznačují, že po mechanickém poškození a zahřátí působí SeNPs na buňky méně toxicky, možná až protektivně, a proto by mohly být využity v průběhu hojení ran. Naše zjištění korelují se závěry práce Yuan a kol., kteří publikovali, že lidské neonatální fibroblasty byly zahřátím nad 40 °C poškozeny, ale po 24 hod preinkubaci buněk s SeNPs (150 nm; 500 µg/ml) odolávaly buněčné smrti, pravděpodobně díky aktivaci některých anti-apoptotických genů chránících buňky před stresem, které zranění způsobilo [189].

Jak již bylo uvedeno výše, zánět je klíčový proces pro hojení ran. Z tohoto důvodu byl na buněčném modelu pro studium hojení ran sledován vliv SeNPs na markery zánětu IL-6 a COX-2. IL-6 má pozitivní i negativní vliv na průběh hojení. Jeho nedostatek vede ke špatnému hojení, a naopak dlouhodobé zvýšení může způsobit vznik jizev [56]. Podobně je to i v případě COX-2, u které zvýšená exprese na počátku hojení ran může pomoci rychlé aktivaci obrané zánětlivé reakce a naopak zvýšení exprese v pozdějších fázích hojení ran je kontraproduktivní. V rámci disertační práce bylo zjištěno, že SeNPs (6,25 a 12,5 µg/ml) zvyšují koncentraci IL-6 u HDF po 8 hod inkubaci zatímco po 24 hod nedošlo k ovlivnění tohoto cytokinu (Obr. 41). Tyto výsledky naznačují, že by SeNPs v nižších koncentracích mohly mít pozitivní vliv na hojení ran, avšak toto tvrzení musí být ještě ověřeno. V případě COX-2 (Obr. 42) byla pozorována zvýšená exprese tohoto proteinu pouze u nejvyšší koncentrace SeNPs (25 µg/ml) po 24 hod inkubaci, zatímco nižší koncentrace (6,25 a 12,5 µg/ml) neměly na hladinu tohoto proteinu dlouhodobější vliv. Zjištěné výsledky částečně korelují s prací Malhotra a kol., kteří publikovali, že genová exprese COX-2 u myši nebyla ovlivněna SeNPs [178]. Zhu a kol. naopak popsali snížení hladin COX-2 na úrovni mRNA u makrofágů po 1 hod inkubaci s SeNPs (130 nm; 0,8 µg/ml; úprava polysacharidem z řasy) [190].

Hojení ran je pro buňky stresová situace, kdy jsou vystaveny oxidačnímu a teplotnímu stresu. Z tohoto důvodu bylo studium rovněž zaměřeno na stanovení vlivu SeNPs na expresi markeru oxidačního stresu, proteinu HO-1, a také na expresi markerů teplotního stresu, proteiny HSP27 a HSP90. V případě HO-1 (Obr. 38) byla zaznamenána snížená exprese tohoto proteinu po 8 hod inkubaci HDF s SeNPs (6,25 a 25 µg/ml), zatímco po 24 hod byla pozorována zvýšená exprese u koncentrací 6,25 a 12,5 µg/ml. Zvýšenou expresi HO-1 pozorovali také Song a kol. na prasečích střevních epitelích (IPEC-J2) působením biogenně vzniklých SeNPs (139,43 nm; 0,1 µM). Naopak u chemicky syntetizovaných SeNPs (120,97 nm; 0,1 µM) nezaznamenali ve srovnání s kontrolou žádný rozdíl [191].

U HSP27 (Obr. 39) a HSP90 (Obr. 40) byla pozorována snížená exprese těchto proteinů po 8 hod inkubaci HDF s SeNPs v nejvyšší koncentraci (25 µg/ml), přičemž

DISKUSE

statisticky významný pokles byl zaznamenán pouze u HSP27. Wang a kol. testovali vliv amorfni (2,25 nm; 0,02; 0,06 a 0,16 mM) a krystalické (4,1 nm; 0,02; 0,06 a 0,16 mM) formy SeNPs. Po aplikaci amorfni formy SeNPs na HepG2 buňky pozorovali snížení exprese proteinů z rodin HSP27, HSP70 a HSP90. Autoři předpokládají, že snížení exprese těchto proteinů by mohlo vést k dysfunkci buněčné ochrany, což by vysvětlilo pozorované antiproliferativní a tumor supresorové účinky testovaných SeNPs [192]. Také Bao a kol., pozorovali pokles HSP90 u lidských plicních nádorových buněk H157 během tvorby endogenních SeNPs, a to i přesto, že u nádorových buněk byla popsána hyperaktivace tohoto proteinu. Autoři předpokládají, že při tvorbě SeNPs ze seleničitanu dochází k vychytávání HSP90. Toto vychytávání může přispívat k oxidativnímu stresu a tak cytotoxickým účinkům seleničitanu stejně jako SeNPs [187]. Naproti tomu Yuan a kol. prokázali protektivní vlastnosti SeNPs (150 nm; 500 µg/ml) po 24 hod preinkubaci HDF. Preinkubované buňky byly více odolné proti teplem indukované buněčné smrti (zahřátí 1 hod, 42°C nebo 45 °C), což bylo potvrzeno morfologicky a testem životnosti [189]. Výsledky disertační práce, kdy byly zaznamenány nezměněné hladiny HSPs u nižších koncentrací námi studovaných SeNPs (6,25 a 12,5 µg/ml) by mohly naznačovat tento ochranný efekt.

V rámci disertační práce byl sledován také vliv SeNPs na klíčové enzymy pro remodelaci ECM (MMP-1, MMP-2 a MMP-3). MMP-1 (kolagenáza) je nezbytná zejména v časných fázích hojení ran, protože umožňuje degradaci kolagenových vláken a tak odstranění poškozené tkáně. MMP-2 (želatináza) je spojena s migrací keratinocytů [193]. MMP-3 (Stromelyzin 1) se v hojení ran účastní remodelace pojivové tkáně a rozpouštění sraženin díky své široké substrátové specifitě [193]. V naší studii bylo zaznamenáno snížení exprese všech tří proteinů (Obr. 43-45) po 8 hod inkubaci HDF s SeNPs v nejvyšší koncentraci (25 µg/ml). Z těchto výsledků vyplývá, že koncentrace SeNPs 25 µg/ml je příliš vysoká a nevhodná pro využití při hojení ran. U nižších koncentrací SeNPs (6,25 a 12,5 µg/ml) nebyl pozorován výrazný vliv na žádný ze tří studovaných proteinů s výjimkou koncentrace 6,25 µg/ml, u které bylo zaznamenáno snížení exprese MMP-1 po 8 hod inkubaci. Naše výsledky se však liší od výsledků ostatních prací, což může souviset s faktem, že ostatní výzkumné týmy se zabývají možným využitím SeNPs jako protinádorové látky. Bylo publikováno, že SeNPs (100–200 nm) a nanočástice ze slitiny selenu a ruthenia s kyselinou gallovou (60 nm) v koncentraci 1,6 µg/ml mírně snižovaly expresi MMP-2 u HeLa buněk [180]. Snížená exprese MMP-2 byla rovněž pozorována u fibrosarkomové buněčné linie HT-1080, která byla vystavena SeNPs (80–220 nm; 1–100 µg/ml) [194].

Snížená exprese MMP-2 u nádorových buněčných linií může souviset se zabráněním migrace a invazivnosti rakovinných buněk.

6.3 Studium využití lidského séra (LS) pro regenerativní medicínu

Primární kultura lidských kožních fibroblastů (HDF) může být využita v mnoha experimentech, protože jejich izolace a následná kultivace těchto buněk není náročná. K podpoře růstu se využívají séra, nejčastěji fetální bovinní sérum (FBS). Jeho výhodou je, že obsahuje jen nízké hladiny protilátek, mnoho růstových faktorů a dalších proteinů, které usnadňují buňkám přežití, růst a dělení. Na druhou stranu má každá šarže FBS odlišné složení obsahových látek. Větším problémem je však riziko kontaminace zvířecími virovými infekcemi, mykoplazmaty a priony [109] nebo imunitní reakce na cizorodé proteiny, pokud jsou kultivované buňky využity pro léčbu u lidí. Buňky však v médiu bez séra nerostou moc dobře, což je problém zejména ve tkáňovém inženýrství, kde dlouhá kultivační doba může mít až fatální důsledky, např. u popálenin [111]. Z těchto důvodů je snahou vědců nahradit FBS sérem lidským (LS), ať už autologním nebo allogenním [108, 110, 111, 195].

HDF mají typickou vřetenovitou morfolologii [196]. Během stárnutí u nich dochází ke zvětšování, zploštění [134] a prodloužení [135]. Bylo publikováno, že u HDF inkubovaných v médiu s LS dochází ke změně morfologie [108, 111]. Se zvyšujícím se počtem pasáží byly HDF protáhlejší ve srovnání s buňkami inkubovanými v médiu s FBS [108]. V rámci disertační práce byl rovněž pozorován rozdílný vzhled HDF. Buňky kultivované v médiu s LS byly naopak kratší, tlustší se zvýrazněným jádrem ve srovnání s buňkami, které byly inkubovány v médiu s FBS (Obr. 46). Vzhledem k tomu, že životnost HDF kultivovaných v médiu s LS byla vyšší než u FBS (Obr. 50), což je v souladu s publikovanými daty [108, 195], bylo vyloučeno, že by změna tvaru mohla být projevem toxicity LS.

Studie zaměřené na proliferaci prokázaly, že HDF kultivované v médiu s 10 % allogenního LS rostly rychleji než ty, které byly kultivovány v médiu s FBS [108, 195]. Dále bylo publikováno, že HDF rostly přibližně 2krát rychleji v médiu s 2 % autologního LS ve srovnání s médiem s 10 % allogenního LS [111]. Výsledky těchto studií jsou v souladu s našimi zjištěními. Bylo prokázáno, že v médiu s 10 % LS30 a LS90 rostly HDF téměř 3x rychleji ve srovnání s 10 % FBS (Obr. 47). Zvýšená proliferace je však typická pro nádorovou transformaci a keloidní jizvy [197]. Z tohoto důvodu byl rovněž stanoven tumor supresorový transkripční faktor p53 (Obr. 49), jehož exprese je u nádorů

DISKUSE

snížená a u keloidů naopak zvýšená. Vzhledem k tomu, že protein p53 nebyl detekován u kontrolních HDF kultivovaných v médiu s FBS, ani u buněk inkubovaných v médiu s LS, obě tyto možné růstové abnormality byly vyloučeny.

Zvýšená proliferace HDF inkubovaných v médiu s LS by mohla souviset i s poruchou buněčného cyklu. Jeho analýza umožňuje zjistit, zda se u studovaných buněk nevyskytují aneuploidie nebo tetraploidie, protože abnormální DNA může vést až k nádorové transformaci. Rovněž poskytuje informaci o procentu buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, což odráží úroveň proliferace. Mazlyzam a kol. pozorovali větší počet buněk v S-fázi po inkubaci HDF v médiu s 10 % LS ve srovnání s 10% FBS, což naznačuje zvýšenou syntézu DNA a zvýšení proliferace při kultivaci buněk v médiu s LS [108]. Výsledky této práce se však neshodují s našimi zjištěními. Bylo pozorováno až 2x nižší zastoupení buněk v S-fázi u HDF inkubovaných v médiu s LS30 a LS90 v porovnání s buňkami kultivovanými v médiu s FBS (Tabulka 5). Vzhledem k tomu, že HDF inkubované v médiu s LS dosáhly 6. den plné konfluency, došlo k zástavě dělení a tak i replikaci DNA. Díky tomu mohl být pozorován pokles buněk v S-fázi, zatímco u HDF kultivovaných v médiu s FBS dosáhly buňky 6. den pouze 80 – 90 % konfluency a mohly se tedy dále dělit. Buňky byly v normálním diploidním stavu, což je v souladu s výsledky práce Mazlyzam a kol. [108].

V rámci disertační práce bylo pozorováno, že HDF rostoucí v médiu s LS, se rychleji oddělují ode dna kultivační nádoby po trypsinizaci, což by mohlo souviset se změnou exprese proteinů cytoskeletu. U HDF kultivovaných v médiu s 10 % LS30, LS70 a LS90 byl pozorován pokles exprese vimentinu v porovnání s buňkami kultivovanými v médiu s 10 % FBS (Obr. 56). Dřívější studie sledovaly vliv LS na ECM. Výsledky těchto studií jsou rozdílné. Zatímco Morimoto a kol. nepozorovali rozdíly u formace ECM ani změny v ukládání kolagenu I [111], Mazlyzam a kol. naopak popsali zvýšenou přilnavost HDF inkubovaných v médiu s LS a zvýšenou expresi kolagenu III a fibronektinu ve srovnání s buňkami kultivovanými v médiu s FBS [108]. Podobně Kondo a kol. pozorovali téměř 50% snížení migrace u HDF inkubovaných v médiu s LS [195].

Několik dřívějších studií se zabývalo sledováním vlivu LS a dalších krevních derivátů od dárců různého věku na proces stárnutí buněk. Nicméně výsledky těchto studií jsou rozdílné. Některé práce uvádějí, že nebyl pozorován rozdílný vliv LS od mladých a starších dárců na proces stárnutí buněk [118, 120], ale existují práce, které naopak rozdílný vliv LS mladších a starších dárců na proces stárnutí buněk zaznamenaly [121, 198]. Bayer a kol. nepozorovali rozdílný vliv LS mladších (18–30 let) a starších (60–80 let) dárců na expresi kolagenu u lidských fibroblastů (izolovány ze šlachy; dárci 18–32 let). Proliferace buněk byla

DISKUSE

rovněž stejná u obou skupin dárců [118]. Podobné výsledky publikovali také George a kol., kteří rovněž nezaznamenali rozdílný vliv LS mladších (23–36 let) a starších (69–84 let) dárců na proliferaci a diferenciaci lidských myoblastů (dárce 23 – 38 let) [120]. Rozdílné výsledky však publikovali Abdallah a kol., kteří popsali pokles exprese osteoblastických genů u lidských mezenchymálních buněk kultivovaných v médiu s LS starších (70–84 let) žen ve srovnání s buňkami kultivovanými v médiu s LS mladších (20–30 let) žen [198]. Při studiu vlivu lyzátu lidských destiček na proliferaci lidských mezenchymálních buněk byla zaznamenána nižší proliferace u lyzátu starších (> 45 let) dárců ve srovnání s mladšími (< 35 let) dárci. Lyzát starších dárců rovněž zvyšoval aktivitu β -gal [121]. Carlson a kol. a Mayack a kol. prokázali, že faktory obsažené v LS účinkují i u myši. Popsali, že inhibiční vliv LS starších dárců (21–24 měsíců) byl silnější než aktivační efekt LS mladších (2–3 měsíce) dárců [119, 122]. V našich experimentech byly použity LS od dárců různého věku, můžeme tedy mluvit o *in vitro* modelu pro heterochronní parabiózu. Dílčím cílem práce bylo porovnat vliv LS mladých dárců (LS30) a dárců vyššího věku (LS70, LS90, LS100z a LS100n) na markery související s procesem stárnutí HDF. Byly stanoveny dva inhibitory cyklin dependentních kináz (p16 a p21), které jsou mimo jiné aktivovány u senescentních buněk a při jejich zvýšené expresi dochází ke zpomalení buněčného cyklu [136]. Dále byla stanovena se senescencí asociovaná β -gal. V souladu se stanovenou zvýšenou proliferací HDF byl p16 (Obr. 53 A) a p21 (Obr. 53 B) ve všech případech negativní. Rovněž nebyla u HDF inkubovaných s LS (LS30, LS70 a LS90) pozorována zvýšená exprese β -gal (Obr. 55). Vzhledem k tomu, že u HDF (dárce 27 let) inkubovaných s LS od dárců vyššího věku než byly testované buňky (LS30, LS70, LS90, LS100z a LS100n) nebyla zaznamenána zvýšená exprese cyklin dependentních kináz (p16 a p21) a β -gal, můžeme vyloučit vliv negativní heterochronní parabiózy.

Pokud porovnáme výsledky u HDF kultivovaných s LS30 a LS90, nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly. Předpokládali jsme, že HDF porostou lépe v médiu s LS30 ve srovnání s LS90. Překvapivě, v obou případech byla zaznamenána vyšší proliferace buněk v porovnání s FBS, dokonce v případě LS90 o něco málo vyšší proliferace (Obr. 48) a menší množství PI pozitivních buněk (Obr. 50) ve srovnání s LS30. S ohledem na tuto skutečnost bude v následujících experimentech provedena detailní analýza LS90 pro možný obsah rejuvenačních faktorů, které by se daly využít v regenerativní medicíně, ale i hladin hormonů, růstových faktorů a případných léčiv, které mohly mít také vliv na růst buněk.

7 Závěr

Disertační práce se zabývala studiem vlivu AgNPs, iontového stříbra (Ag-I) a SeNPs na proces hojení ran *in vitro*. V rámci studijního pobytu (9 měsíců) na Oddělení experimentální, diagnostické a speciální medicíny Univerzity v Boloni v Itálii bylo rovněž studováno využití lidského séra pro regenerativní medicínu. Na základě získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry:

7.1 Studium vlivu nanočástic stříbra a selenu na hojení ran

- ❖ Byla otestována toxicita AgNPs a Ag-I na buněčném modelu HDF. Na základě získaných výsledků byly vybrány netoxické koncentrace AgNPs (0,25; 2,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$) a Ag-I (0,025; 0,1 a 0,25 $\mu\text{g/ml}$), které byly použity pro následující experimenty.
- ❖ Bylo zjištěno, že vybrané koncentrace AgNPs a Ag-I neovlivňují hladinu ROS a pouze mírně zvyšují koncentraci IL-6.
- ❖ Byl vytvořen *in vitro* model pro studium hojení ran - lidské kožní fibroblasty (HDF), byly poškozeny (200 μl pipetovací špičkou) a následně zahřáty (1 hod; 42 °C) pro simulování situace ve skutečné ráně. Na vytvořeném *in vitro* modelu byl sledován vliv AgNPs a Ag-I na markery zapojené do procesu hojení ran. Bylo zjištěno, že:
 - AgNPs ani Ag-I neovlivňují morfologii HDF.
 - AgNPs nemají vliv na hladinu ROS a aktivují dráhu Nrf2/HO-1, zatímco Ag-I zvyšuje hladinu ROS a aktivace dráhy Nrf2/HO-1 je v porovnání s AgNPs nižší.
 - AgNPs zvyšují expresi chaperonového proteinu HSP90 a nemají vliv na expresi HSP27, zatímco Ag-I snižují expresi HSP90 a zvyšují expresi HSP27.
 - Obě formy stříbra snižují expresi transkripčního faktoru NF- κB .
 - AgNPs snižují koncentraci IL-6, zatímco Ag-I nemá vliv na koncentraci tohoto cytokinu.
 - Při provedení rýhového testu mají AgNPs pozitivní vliv na zarůstání rány, zatímco vliv Ag-I je negativní.

ZÁVĚR

Na základě získaných výsledků lze říci, že AgNPs, zejména v koncentraci 0,25 a 2,5 µg/ml, mají lepší účinky na hojení ran ve srovnání s Ag-I.

- ❖ SeNPs působí baktericidně na dva kmeny *Staphylococcus aureus* (včetně methicilin-rezistentního) a na dva kmeny rodu *Candida* a bakteriostaticky na jeden kmen *Staphylococcus haemolyticus*.
- ❖ Na buněčném modelu HDF byla otestována toxicita SeNPs a pro následující testování byly vybrány koncentrace: netoxická (6,25 µg/ml), blízká IC₅₀ (12,5 µg/ml) a toxická (25 µg/ml).
- ❖ SeNPs v koncentracích 6,25 a 12,5 µg/ml neovlivňují morfologii buněk a snižují hladinu ROS. V koncentraci 25 µg/ml ovlivňují morfologii buněk, zvyšují hladinu ROS a koncentraci IL-6.
- ❖ Na *in vitro* modelu pro studium hojení ran bylo zjištěno, že:
 - SeNPs neovlivňují morfologii HDF.
 - SeNPs po 8 hod snižují a po 24 hod zvyšují expresi HO-1. V koncentraci 25 µg/ml snižují SeNPs expresi HSP27, ale nemají vliv na expresi HSP90.
 - SeNPs (6,25 a 12,5 µg/ml) zvyšují koncentraci IL-6. Exprese COX-2 je zvýšena pouze při aplikaci koncentrace 25 µg/ml.
 - SeNPs v koncentraci 25 µg/ml snižují expresi MMP-1, MMP-2 a MMP-3. Ostatní koncentrace nemají statisticky významný vliv na tyto proteiny.

Při porovnání účinků AgNPs a SeNPs a jejich zapojení do procesu hojení ran, lze konstatovat na základě výsledků získaných na *in vitro* modelu pro studium hojení ran, že tento proces výrazněji ovlivňují AgNPs. Přestože byla u SeNPs publikována celá řada vlastností, díky nimž by mohly mít tyto nanočástice uplatnění při hojení ran, na základě získaných výsledků se SeNPs v tomto směru nejeví jako vhodné.

7.2 *Studium vlivu lidského séra na HDF*

- ❖ Při kultivaci buněk v médiu s LS (LS30, LS70, LS90, LS100z, LS100n) byla pozorována změna tvaru HDF. Buňky byly kratší, tlustší s výraznějším jádrem.
- ❖ Při kultivaci buněk v médiu s LS30 a LS90 byla proliferace HDF zvýšena ve srovnání s buňkami kultivovanými v médiu s FBS. Bylo vyloučeno, že by zvýšený růst HDF byl způsoben nádorovou transformací maligní nebo benigní (keloidy).
- ❖ Životnost (množství PI pozitivních buněk) u HDF inkubovaných v médiu s LS30 a LS90 byla vyšší než v médiu s FBS.
- ❖ U HDF kultivovaných v médiu s LS (LS30, LS70 a LS90) nebyla zaznamenána zvýšená exprese β -galaktozidázy. Rovněž nebyla u buněk inkubovaných v médiu s LS (LS30, LS70, LS90, LS100z a LS100n) zjištěna zvýšená exprese inhibitorů cyklin dependentních kináz (p16 a p21). Nebyl prokázán vliv negativní heterochronní parabiosy.
- ❖ Bylo prokázáno, že HDF je možné kultivovat v médiu s LS místo běžně používaného FBS.
- ❖ Porovnáním výsledků u HDF kultivovaných v médiu s LS30 a LS90 byla v obou případech zaznamenána vyšší proliferace buněk ve srovnání s FBS. V případě LS90 byla zaznamenána mírně vyšší proliferace a menší množství propidium jodid pozitivních buněk ve srovnání s LS30.

S ohledem na výsledky získané v rámci disertační práce je probíhající studium zaměřeno na detailní analýzu LS90 pro možný obsah rejuvenačních faktorů, které by se daly využít v regenerativní medicíně, ale i hladin hormonů, růstových faktorů a případných léčiv, které také mohly mít vliv na růst buněk.

8 Seznam prací vztahujících se k disertaci

Publikace

1. Galandáková A., Franková J., Ambrožová N., Habartová K., Pivodová V., Zálešák B., Šafářová K. & Ulrichová J.: Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Human Experimental. Toxicology* 35 (9), 946–957 (2015).
(IF₂₀₁₅=1,747)
2. Ambrožová, N., Zálešák, B., Ulrichová, J., Čížková, K., & Galandáková, A.: Low concentrations of silver nanoparticles have a beneficial effect on wound healing in vitro. *Journal of nanoparticle research*, 19 (3), 1–15 (2017).
(IF₂₀₁₆=2,020)
3. Ambrožova, N., Ulrichova, J., & Galandakova, A.: Models for the study of skin wound healing. The role of Nrf2 and NF-κB. *Biomedical papers*, 161 (1), 1–13 (2017).
(IF₂₀₁₆=0,924)

Publikace připravené k odeslání

1. Ambrožová, N., Ulrichová, J., & Galandáková, A.: Evaluation of the toxicity and effect on wound healing of selenium nanoparticles *in vitro*. Manuscript připravovaný k publikaci.
2. Ambrožová, N., Capri, M., Lanzarini, C., Franceschi C., Ulrichová J.: The human serum from young and old donors changes morphology and increases proliferation of human dermal fibroblast *in vitro*. Manuscript připravovaný k publikaci.

Prezentace na konferencích

1. Ambrožová N., Galandáková A., Zálešák B., Ulrichová J.: Vliv nanočástic metalického stříbra na dráhy Nrf2 a NF- κ B v procesu hojení ran. *In vitro* studie. Konference vědeckých prací studentů DSP. 16. – 17. 12. 2013, Olomouc, Česká Republika.
2. Ambrožová N., Lanzarini C., Capri M., Galandáková A, Ulrichová J.: Porovnání účinku lidského a fetálního bovinního séra na životnost a proliferaci lidských kožních fibroblastů. Konference vědeckých prací studentů DPS. 9. – 10. 9. 2014, Olomouc, Česká Republika.
3. Ambrožová N., Galandáková A., Zálešák B., Ulrichová J.: The effects of silver nanoparticles on Nrf2 and NF- κ B pathways in normal human dermal fibroblast. XXIV. Biochemický zjazd. 18. – 21. 9. 2014, Bratislava, Slovenská Republika.
4. Ambrožová N., Galandáková A. Zálešák B., Ulrichová J.: The effects of selenium nanoparticles on normal human dermal fibroblasts. *In vitro* study. XVII. setkání biochemiků a molekulárních biologů. 10. – 11. 11. 2015, Brno, Česká Republika.
5. Ambrožová N., Zálešák B., Ulrichová J., Galandáková A.: Comparison of effects of silver and selenium nanoparticles on markers for wound healing. *In vitro* study. 7th International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology. 1. – 4. 9. 2016, Andros, Řecko.
6. Ambrožová N., Galandáková A., Zálešák B., Ulrichová J.: Vliv nanočástic selenu na hojení ran. *In vitro* studie. Konference vědeckých prací studentů DSP. 14. – 15. 9. 2016, Olomouc, Česká Republika.

9 Literatura

1. Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. European journal of dermatology: EJD, 2001. **12**(4): p. 390-9; quiz 400-1.
2. Arenberger, P. and I. Obstová, *Obecná dermatovenerologie*. 2001: Czechopress Agency. 246.
3. Lüthmann-Rauch, R., *Histologie*. 2012: Grada Publishing a.s. 556.
4. Freinkel, R.K. and D.T. Woodley, *The Biology of the Skin*. Ilustrované vydání. ed. 2001: Taylor & Francis. 432.
5. Kittnar, O., *Lékařská fyziologie*. 2011: Grada Publishing a.s. 790.
6. Chong, S.Z., M. Evrard, and L.G. Ng, *Lights, camera, and action: vertebrate skin sets the stage for immune cell interaction with arthropod-vectored pathogens*. Frontiers in immunology, 2013. **4**: p. 286.
7. Jatana, S. and L.A. DeLouise, *Understanding engineered nanomaterial skin interactions and the modulatory effects of ultraviolet radiation skin exposure*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2014. **6**(1): p. 61-79.
8. Pejznochová, I., *Lokální ošetřování ran a defektů na kůži*. 2010: Grada Publishing a.s. 80.
9. Kalvach, Z., et al., *Křehký pacient a primární péče*. 2012: Grada Publishing a.s. 400.
10. Ferko, A., Z. Šubrt, and T. Dědek, *Chirurgie v kostce: 2., doplněné a přepracované vydání*. 2015: Grada Publishing a.s. 512.
11. Enoch, S. and D.J. Leaper, *Basic science of wound healing*. Surgery (Oxford), 2008. **26**(2): p. 31-37.
12. Boateng, J.S., et al., *Wound healing dressings and drug delivery systems: a review*. Journal of pharmaceutical sciences, 2008. **97**(8): p. 2892-2923.
13. Serrano, I., et al., *Integrin-linked kinase (ILK) modulates wound healing through regulation of hepatocyte growth factor (HGF)*. Experimental cell research, 2012. **318**(19): p. 2470-2481.
14. Wild, T., et al., *Basics in nutrition and wound healing*. Nutrition, 2010. **26**(9): p. 862-866.
15. Arwert, E.N., E. Hoste, and F.M. Watt, *Epithelial stem cells, wound healing and cancer*. Nature Reviews Cancer, 2012. **12**(3): p. 170-180.
16. Schreml, S., et al., *Wound healing in the 21st century*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2010. **63**(5): p. 866-881.
17. Young, A. and C.-E. McNaught, *The physiology of wound healing*. Surgery (Oxford), 2011. **29**(10): p. 475-479.
18. Hiebert, P.R. and D.J. Granville, *Granzyme B in injury, inflammation, and repair*. Trends in molecular medicine, 2012. **18**(12): p. 732-741.
19. Menke, N.B., et al., *Impaired wound healing*. Clinics in dermatology, 2007. **25**(1): p. 19-25.
20. Gottrup, F., *A specialized wound-healing center concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds*. The American journal of surgery, 2004. **187**(5): p. S38-S43.
21. Thomas, D.R., *Age-related changes in wound healing*. Drugs & aging, 2001. **18**(8): p. 607-620.
22. Posnett, J., et al., *The resource impact of wounds on health-care providers in Europe*. Journal of Wound care, 2009. **18**(4): p. 154-161.
23. Pietramaggiore, G., et al., *Healing modulation induced by freeze-dried platelet-rich plasma and micronized allogenic dermis in a diabetic wound model*. Wound repair and regeneration, 2008. **16**(2): p. 218-225.
24. Velander, P., et al., *Cell suspensions of autologous keratinocytes or autologous fibroblasts accelerate the healing of full thickness skin wounds in a diabetic porcine wound healing model*. Journal of Surgical Research, 2009. **157**(1): p. 14-20.
25. Kiwanuka, E., et al., *Comparison of healing parameters in porcine full-thickness wounds transplanted with skin micrografts, split-thickness skin grafts, and cultured keratinocytes*. Journal of the American College of Surgeons, 2011. **213**(6): p. 728-735.
26. Wong, V.W., et al., *Surgical approaches to create murine models of human wound healing*. BioMed Research International, 2010. **2011**.
27. Gottrup, F., M.S. Ågren, and T. Karlsmark, *Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue*. Wound Repair and Regeneration, 2000. **8**(2): p. 83-96.
28. Gouin, J.-P. and J.K. Kiecolt-Glaser, *The impact of psychological stress on wound healing: methods and mechanisms*. Immunology and allergy clinics of North America, 2011. **31**(1): p. 81-93.
29. Coulomb, B. and L. Dubertret, *Skin cell culture and wound healing*. Wound Repair and Regeneration, 2002. **10**(2): p. 109-112.
30. Regnier, M., et al., *Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells*. Medical and Biological Engineering and Computing, 1998. **36**(6): p. 821-824.

LITERATURA

31. Groeber, F., et al., *Skin tissue engineering—in vivo and in vitro applications*. Advanced drug delivery reviews, 2011. **63**(4): p. 352-366.
32. Ades, E.W., et al., *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. Journal of Investigative Dermatology, 1992. **99**(6): p. 683-690.
33. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 14-20.
34. Wolf, N.B., et al., *Influences of opioids and nanoparticles on in vitro wound healing models*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009. **73**(1): p. 34-42.
35. Walter, M., et al., *Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays*. Experimental cell research, 2010. **316**(7): p. 1271-1281.
36. Liu, X. and 劉雪來, *The role of silver nanoparticles on skin wound healing, tissue remodeling and their potential cytotoxicity*. HKU Theses Online (HKUTO), 2013.
37. Liang, C.-C., A.Y. Park, and J.-L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nature protocols, 2007. **2**(2): p. 329-333.
38. Franková, J., et al., *Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model*. Journal of applied biomaterials & functional materials, 2016. **14**(2).
39. Rattan, S.I., et al., *Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation*. Dose-response, 2009. **7**(1): p. dose-response. 08-014. Rattan.
40. Tandon, N., et al., *Galvanic microparticles increase migration of human dermal fibroblasts in a wound-healing model via reactive oxygen species pathway*. Experimental cell research, 2014. **320**(1): p. 79-91.
41. Pianigiani, E., et al. *Human de-epidermized dermis as a stem cell carrier*. in *Transplantation proceedings*. 2010. Elsevier.
42. Tonnesen, M.G., X. Feng, and R.A. Clark. *Angiogenesis in wound healing*. in *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2000. Nature Publishing Group.
43. McGuire, L., et al., *Pain and wound healing in surgical patients*. Annals of Behavioral Medicine, 2006. **31**(2): p. 165-172.
44. Gerstenhaber, J.A., et al., *Electrospun soy protein scaffolds as wound dressings: Enhanced reepithelialization in a porcine model of wound healing*. Wound Medicine, 2014. **5**: p. 9-15.
45. Rowan, A.N., *Ending the Use of Animals in Toxicity Testing and Risk Evaluation*. Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics, 2015. **24**(04): p. 448-458.
46. Bouffard, N.A., et al., *Tissue stretch decreases soluble TGF- β 1 and type-1 procollagen in mouse subcutaneous connective tissue: Evidence from ex vivo and in vivo models*. Journal of cellular physiology, 2008. **214**(2): p. 389-395.
47. Shaterian, A., et al., *Real-time analysis of the kinetics of angiogenesis and vascular permeability in an animal model of wound healing*. Burns, 2009. **35**(6): p. 811-817.
48. Sherratt, J.A. and J.C. Dallon, *Theoretical models of wound healing: past successes and future challenges*. Comptes rendus biologies, 2002. **325**(5): p. 557-564.
49. Cumming, B.D., D. McElwain, and Z. Upton, *A mathematical model of wound healing and subsequent scarring*. Journal of The Royal Society Interface, 2010. **7**(42): p. 19-34.
50. Gupta, S.C., et al., *Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2010. **1799**(10): p. 775-787.
51. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends in immunology, 2004. **25**(6): p. 280-288.
52. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annual review of immunology, 1998. **16**(1): p. 225-260.
53. Ben-Neriah, Y. and M. Karin, *Inflammation meets cancer, with NF-kappa B as the matchmaker*. Nature Immunology, 2011. **12**(8): p. 715-723.
54. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiological reviews, 2003. **83**(3): p. 835-870.
55. Gallucci, R.M., et al., *Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice*. The FASEB Journal, 2000. **14**(15): p. 2525-2531.
56. Liechty, K.W., N.S. Adzick, and T.M. Crombleholme, *Diminished interleukin 6 (IL-6) production during scarless human fetal wound repair*. Cytokine, 2000. **12**(6): p. 671-676.
57. Giroux, M. and A. Descoteaux, *Cyclooxygenase-2 Expression in Macrophages: Modulation by Protein Kinase C- α* . The Journal of Immunology, 2000. **165**(7): p. 3985-3991.
58. Ricciotti, E. and G.A. FitzGerald, *Prostaglandins and inflammation*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2011. **31**(5): p. 986-1000.

LITERATURA

59. Matsuo, T., *Prostaglandins F2 α and E2 in aqueous humor of patients with cataract surgery*. Journal of ocular pharmacology and therapeutics, 2004. **20**(2): p. 101-106.
60. Shao, J., et al., *Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(43): p. 33951-33956.
61. Eming, S.A., T. Krieg, and J.M. Davidson, *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms*. Journal of Investigative Dermatology, 2007. **127**(3): p. 514-525.
62. Spriggs, K.A., M. Bushell, and A.E. Willis, *Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress*. Molecular cell, 2010. **40**(2): p. 228-237.
63. Laplante, A.F., et al., *Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1998. **46**(11): p. 1291-1301.
64. Rattan, S.I., et al., *HEAT STRESS AND HORMETIN-INDUCED HORMESIS IN HUMAN CELLS: EFFECTS ON AGING, WOUND HEALING, ANGIOGENESIS, AND DIFFERENTIATION*. Dose-Response, 2009. **7**: p. 90-103.
65. Christian, L.M., et al., *Stress and wound healing*. Neuroimmunomodulation, 2007. **13**(5-6): p. 337-346.
66. auf dem Keller, U., et al., *Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds*. The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings, 2006. **11**(1): p. 106-111.
67. Ma, Q., *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2013. **53**: p. 401.
68. Beyer, T., et al., *Roles and mechanisms of action of the Nrf2 transcription factor in skin morphogenesis, wound repair and skin cancer*. Cell death and differentiation, 2007. **14**(7): p. 1250-1254.
69. Braun, S., et al., *Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(15): p. 5492-5505.
70. Piao, M.S., et al., *Differentiation-dependent expression of NADP (H): quinone oxidoreductase-1 via NF-E2 related factor-2 activation in human epidermal keratinocytes*. Journal of dermatological science, 2011. **62**(3): p. 147-153.
71. Lee, J. and J. Johnson, *An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism*. Journal of biochemistry and molecular biology, 2004. **37**(2): p. 139.
72. Kang, S.J., et al., *Role of the Nrf2-heme oxygenase-1 pathway in silver nanoparticle-mediated cytotoxicity*. Toxicology and applied pharmacology, 2012. **258**(1): p. 89-98.
73. Morimoto, R.I., *Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes*. SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-, 1993. **259**: p. 1409-1409.
74. Kregel, K.C., *Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance*. Journal of applied physiology, 2002. **92**(5): p. 2177-2186.
75. Atalay, M., et al., *Heat shock proteins in diabetes and wound healing*. Current protein & peptide science, 2009. **10**(1): p. 85.
76. Tandara, A.A. and T.A. Mustoe, *MMP-and TIMP-secretion by human cutaneous keratinocytes and fibroblasts—impact of coculture and hydration*. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2011. **64**(1): p. 108-116.
77. Martins, V.L., M. Caley, and E.A. O'Toole, *Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair*. Cell and tissue research, 2013. **351**(2): p. 255-268.
78. Gill, S.E. and W.C. Parks, *Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2008. **40**(6): p. 1334-1347.
79. Stryja, J., *Repetitorium hojeni ran*. 2008: Geum. 199.
80. Alexander, J.W., *History of the medical use of silver*. Surgical infections, 2009. **10**(3): p. 289-292.
81. Marambio-Jones, C. and E.M. Hoek, *A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment*. Journal of Nanoparticle Research, 2010. **12**(5): p. 1531-1551.
82. Atiyeh, B.S., et al., *Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature*. burns, 2007. **33**(2): p. 139-148.
83. Tian, J., et al., *Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing*. ChemMedChem, 2007. **2**(1): p. 129-136.
84. Kwan, K.H., et al., *Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2011. **7**(4): p. 497-504.
85. Liu, X., et al., *Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing*. ChemMedChem, 2010. **5**(3): p. 468-475.
86. Shechter, R. and M. Schwartz, *CNS sterile injury: just another wound healing?* Trends in molecular medicine, 2013. **19**(3): p. 135-143.

LITERATURA

87. AshaRani, P., et al., *Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells*. ACS nano, 2008. **3**(2): p. 279-290.
88. Carlson, C., et al., *Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species*. The Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(43): p. 13608-13619.
89. Kaur, J. and K. Tikoo, *Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles*. Food and Chemical Toxicology, 2013. **51**: p. 1-14.
90. Piao, M.J., et al., *Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis*. Toxicology letters, 2011. **201**(1): p. 92-100.
91. Yen, H.J., S.h. Hsu, and C.L. Tsai, *Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes*. Small, 2009. **5**(13): p. 1553-1561.
92. Prabhu, S. and E.K. Poulouse, *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*. International Nano Letters, 2012. **2**(1): p. 32.
93. Rai, M., A. Yadav, and A. Gade, *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. Biotechnology advances, 2009. **27**(1): p. 76-83.
94. Rayman, M.P., *Selenium and human health*. The Lancet, 2012. **379**(9822): p. 1256-1268.
95. Sajid, M., et al., *Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects*. Environmental Science and Pollution Research, 2015. **22**(6): p. 4122-4143.
96. Kong, H., et al., *Synthesis and antioxidant properties of gum arabic-stabilized selenium nanoparticles*. International journal of biological macromolecules, 2014. **65**: p. 155-162.
97. Estevez, H., et al., *Effects of chitosan-stabilized selenium nanoparticles on cell proliferation, apoptosis and cell cycle pattern in HepG2 cells: comparison with other selenospecies*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. **122**: p. 184-193.
98. Forootanfar, H., et al., *Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2014. **28**(1): p. 75-79.
99. Luo, H., et al., *Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **94**: p. 304-308.
100. Chen, T., et al., *Selenium nanoparticles fabricated in Undaria pinnatifida polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2008. **67**(1): p. 26-31.
101. Huang, B., et al., *Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **35**(7): p. 805-813.
102. Yu, S., et al., *The inhibitory effect of selenium nanoparticles on protein glycation in vitro*. Nanotechnology, 2015. **26**(14): p. 145703.
103. Beheshti, N., et al., *Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against Leishmania major: in vitro and in vivo studies*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2013. **27**(3): p. 203-207.
104. Zhang, J., X. Wang, and T. Xu, *Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with se-methylselenocysteine in mice*. Toxicological sciences, 2008. **101**(1): p. 22-31.
105. Ramamurthy, C., et al., *Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells*. Bioprocess and biosystems engineering, 2013. **36**(8): p. 1131-1139.
106. Mason, C. and P. Dunnill, *A brief definition of regenerative medicine*. 2008.
107. Měšťák, J., M. Molitor, and O. Měšťák, *Základy plastické chirurgie*. 2015.
108. Mazlyzam, A.L., et al., *Human Serum Is an Advantageous Supplement for Human Dermal Fibroblast Expansion: Clinical Implications for Tissue Engineering of Skin*. Archives of Medical Research, 2008. **39**(8): p. 743-752.
109. Van der Valk, J., et al., *The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture*. Toxicology in vitro, 2004. **18**(1): p. 1-12.
110. Mizuno, N., et al., *Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures*. Cell biology international, 2006. **30**(6): p. 521-524.
111. Morimoto, N., et al., *The Utilization of Animal Product-Free Media and Autologous Serum in an Autologous Dermal Substitute Culture*. Journal of Surgical Research, 2011. **171**(1): p. 339-346.
112. Conboy, M.J., I.M. Conboy, and T.A. Rando, *Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity*. Aging cell, 2013. **12**(3): p. 525-530.
113. Conboy, I.M., et al., *Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment*. Nature, 2005. **433**(7027): p. 760-764.

LITERATURA

114. Snoeck, H.-W., *Serum of youth?* Nature biotechnology, 2005. **23**(4): p. 434-435.
115. Villeda, S.A. and T. Wyss-Coray, *The circulatory systemic environment as a modulator of neurogenesis and brain aging.* Autoimmunity reviews, 2013. **12**(6): p. 674-677.
116. Conboy, I.M. and T.A. Rando, *Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches.* Cell Cycle, 2012. **11**(12): p. 2260-2267.
117. Barberi, L., et al., *Age-dependent alteration in muscle regeneration: the critical role of tissue niche.* Biogerontology, 2013. **14**(3): p. 273-292.
118. Bayer, M.L., et al., *No donor age effect of human serum on collagen synthesis signaling and cell proliferation of human tendon fibroblasts.* Mechanisms of ageing and development, 2012. **133**(5): p. 246-254.
119. Carlson, M.E. and I.M. Conboy, *Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches.* Aging cell, 2007. **6**(3): p. 371-382.
120. George, T., et al., *Sera from young and older humans equally sustain proliferation and differentiation of human myoblasts.* Experimental gerontology, 2010. **45**(11): p. 875-881.
121. Lohmann, M., et al., *Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells.* PloS one, 2012. **7**(5): p. e37839.
122. Mayack, S.R., et al., *Systemic signals regulate ageing and rejuvenation of blood stem cell niches.* Nature, 2010. **463**(7280): p. 495-500.
123. Kvítek, L., A. Panáček, and R. Prucek, *Process for preparing aqueous dispersions of metal nanoparticles.*, in Patent CZ 304160B, Czech Republic. 2013.
124. Maines, M., *In vitro methods for detecting cytotoxicity in current protocols in toxicology.* 1998, Wiley, Hoboken.
125. Negre-Salvayre, A., et al., *Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes.* Methods in enzymology, 2002. **352**: p. 62.
126. Yu, H., et al., *Functional morphometric analysis in cellular behaviors: shape and size matter.* Advanced healthcare materials, 2013. **2**(9): p. 1188-1197.
127. Pozarowski, P. and Z. Darzynkiewicz, *Analysis of cell cycle by flow cytometry.* Checkpoint Controls and Cancer: Volume 2: Activation and Regulation Protocols, 2004: p. 301-311.
128. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo.* Nature protocols, 2009. **4**(12): p. 1798-1806.
129. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(20): p. 9363-9367.
130. Young, L., et al., *Detection of Mycoplasma in cell cultures.* Nature protocols, 2010. **5**(5): p. 929-934.
131. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
132. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Analytical biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
133. Atiyeh, B.S., M. Costagliola, and S.N. Hayek, *Keloid or hypertrophic scar: the controversy: review of the literature.* Annals of plastic surgery, 2005. **54**(6): p. 676-680.
134. Gire, V. and D. Wynford-Thomas, *Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies.* Molecular and cellular biology, 1998. **18**(3): p. 1611-1621.
135. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains.* Experimental cell research, 1961. **25**(3): p. 585-621.
136. Alcorta, D.A., et al., *Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(24): p. 13742-13747.
137. Dreesen, O., et al., *The contrasting roles of lamin B1 in cellular aging and human disease.* Nucleus, 2013. **4**(4): p. 283-290.
138. Eckes, B., et al., *Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts.* Journal of cell science, 1998. **111**(13): p. 1897-1907.
139. Rottem, S. and M.F. Barile, *Beware of mycoplasmas.* Trends in biotechnology, 1993. **11**(4): p. 143-151.
140. Zurita-Salinas, C.S., et al., *Contamination with Mycoplasma spp. induces interleukin-13 expression by human skin fibroblasts in culture.* FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1996. **15**(2-3): p. 123-128.
141. Gottrup, F., *A specialized wound-healing center concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds.* Am J Surg, 2004. **187**(5A): p. 38S-43S.

LITERATURA

142. Posnett, J., et al., *The resource impact of wounds on health-care providers in Europe*. J Wound Care, 2009. **18**(4): p. 154-161.
143. Sur, I., et al., *The influence of the surface chemistry of silver nanoparticles on cell death*. Nanotechnology, 2012. **23**(37): p. 375102.
144. Hidalgo, E. and C. Dominguez, *Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts*. Toxicology letters, 1998. **98**(3): p. 169-179.
145. Samberg, M.E., S.J. Oldenburg, and N.A. Monteiro-Riviere, *Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro*. Environmental health perspectives (Online), 2010. **118**(3): p. 407-413.
146. Burd, A., et al., *A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models*. Wound repair and regeneration, 2007. **15**(1): p. 94-104.
147. Kim, S., et al., *Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells*. Toxicology in vitro, 2009. **23**(6): p. 1076-1084.
148. Park, M.V., et al., *The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(36): p. 9810-9817.
149. Liu, W., et al., *Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size*. Nanotoxicology, 2010. **4**(3): p. 319-330.
150. Lee, Y.-H., et al., *Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts*. Biomaterials, 2014. **35**(16): p. 4706-4715.
151. Kang, S.J., et al., *Silver nanoparticles-mediated G2/M cycle arrest of renal epithelial cells is associated with NRF2-GSH signaling*. Toxicology letters, 2012. **211**(3): p. 334-341.
152. Jebali, A. and B. Kazemi, *Triglyceride-coated nanoparticles: skin toxicity and effect of UV/IR irradiation on them*. Toxicology in Vitro, 2013. **27**(6): p. 1847-1854.
153. Ahlberg, S., et al., *Comparison of silver nanoparticles stored under air or argon with respect to the induction of intracellular free radicals and toxic effects toward keratinocytes*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2014. **88**(3): p. 651-657.
154. Keller, U.A.D., et al., *Nrf transcription factors in keratinocytes are essential for skin tumor prevention but not for wound healing*. Molecular and Cellular Biology, 2006. **26**(10): p. 3773-3784.
155. Mamalis, A., et al., *Resveratrol prevents high fluence red light-emitting diode reactive oxygen species-mediated photoinhibition of human skin fibroblast migration*. PloS one, 2015. **10**(10): p. 1-9.
156. Alam, J. and J.L. Cook, *How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene?* American journal of respiratory cell and molecular biology, 2007. **36**(2): p. 166-174.
157. El-Ansary, A. and S. Al-Daihan, *On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview*. Journal of toxicology, 2009. **2009**: p. 754810.
158. Aueviriyavit, S., D. Phummiratch, and R. Maniratanachote, *Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells—induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles*. Toxicology letters, 2014. **224**(1): p. 73-83.
159. Piao, M.J., et al., *Silver nanoparticles down-regulate Nrf2-mediated 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 through inactivation of extracellular regulated kinase and protein kinase B in human Chang liver cells*. Toxicology letters, 2011. **207**(2): p. 143-148.
160. Bouwmeester, H., et al., *Characterization of translocation of silver nanoparticles and effects on whole-genome gene expression using an in vitro intestinal epithelium coculture model*. ACS nano, 2011. **5**(5): p. 4091-4103.
161. Foldbjerg, R., et al., *Global gene expression profiling of human lung epithelial cells after exposure to nanosilver*. Toxicological Sciences, 2012. **130**(1): p. 145-157.
162. Lim, D.-H., et al., *The effects of sub-lethal concentrations of silver nanoparticles on inflammatory and stress genes in human macrophages using cDNA microarray analysis*. Biomaterials, 2012. **33**(18): p. 4690-4699.
163. Wesche, J., et al., *FGF-1 and FGF-2 require the cytosolic chaperone Hsp90 for translocation into the cytosol and the cell nucleus*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(16): p. 11405-11412.
164. Jain, J., et al., *Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use*. Molecular Pharmaceutics, 2009. **6**(5): p. 1388-1401.
165. AshaRani, P., et al., *Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells*. Genome Integr, 2012. **3**(1): p. 2.
166. Eom, H.-J. and J. Choi, *p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells*. Environmental science & technology, 2010. **44**(21): p. 8337-8342.
167. Nishanth, R.P., et al., *Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: Role of ROS-NFκB signaling pathway*. Nanotoxicology, 2011. **5**(4): p. 502-516.

LITERATURA

168. Romoser, A.A., et al., *Distinct immunomodulatory effects of a panel of nanomaterials in human dermal fibroblasts*. Toxicology letters, 2012. **210**(3): p. 293-301.
169. Stepkowski, T., K. Brzóska, and M. Kruszewski, *Silver nanoparticles induced changes in the expression of NF- κ B related genes are cell type specific and related to the basal activity of NF- κ B*. Toxicology in Vitro, 2014. **28**(4): p. 473-478.
170. Satapathy, S.R., et al., *Silver-based nanoparticles induce apoptosis in human colon cancer cells mediated through p53*. Nanomedicine, 2013. **8**(8): p. 1307-1322.
171. Greulich, C., et al., *Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs)*. Langenbeck's Archives of Surgery, 2009. **394**(3): p. 495-502.
172. Prasad, R.Y., et al., *Investigating oxidative stress and inflammatory responses elicited by silver nanoparticles using high-throughput reporter genes in HepG2 cells: Effect of size, surface coating, and intracellular uptake*. Toxicology in Vitro, 2013. **27**(6): p. 2013-2021.
173. Fukata, M. and M.T. Abreu, *Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies*. Oncogene, 2008. **27**(2): p. 234.
174. Chudobova, D., et al., *Comparison of the effects of silver phosphate and selenium nanoparticles on Staphylococcus aureus growth reveals potential for selenium particles to prevent infection*. FEMS microbiology letters, 2014. **351**(2): p. 195-201.
175. Khiralla, G.M. and B.A. El-Deeb, *Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens*. LWT-Food Science and Technology, 2015. **63**(2): p. 1001-1007.
176. Wu, H., et al., *Surface decoration of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides-protein complexes to achieve enhanced cellular uptake and antiproliferative activity*. Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(19): p. 9602-9610.
177. Jiang, W., et al., *Gracilaria lemaneiformis polysaccharide as integrin-targeting surface decorator of selenium nanoparticles to achieve enhanced anticancer efficacy*. ACS applied materials & interfaces, 2014. **6**(16): p. 13738-13748.
178. Malhotra, S., et al., *In vitro and in vivo antioxidant, cytotoxic, and anti-chronic inflammatory arthritic effect of selenium nanoparticles*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2015.
179. Zheng, J.-S., et al., *Sialic acid surface decoration enhances cellular uptake and apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011. **83**(1): p. 183-187.
180. Zhou, Y., et al., *Green synthesis of Se/Ru alloy nanoparticles using gallic acid and evaluation of their anti-invasive effects in HeLa cells*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016. **144**: p. 118-124.
181. Zhang, Y., et al., *Enhancement of cell permeabilization apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles by ATP surface decoration*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2013. **9**(1): p. 74-84.
182. Tran, P.A. and T.J. Webster, *Selenium nanoparticles inhibit Staphylococcus aureus growth*. International journal of nanomedicine, 2011. **6**: p. 1553.
183. Wang, Q., P. Larese-Casanova, and T.J. Webster, *Inhibition of various gram-positive and gram-negative bacteria growth on selenium nanoparticle coated paper towels*. International journal of nanomedicine, 2015. **10**: p. 2885.
184. Cremonini, E., et al., *Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts*. Microbial Biotechnology, 2016.
185. Kheradmand, E., et al., *The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against Candida albicans*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. **22**(1): p. 48.
186. Lopez-Heras, I., et al., *Effect of Chitosan-stabilized Selenium nanoparticles on cell cycle arrest and invasiveness in hepatocarcinoma cells revealed by quantitative proteomics*. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 2014. **2014**.
187. Bao, P., et al., *Selenite-induced toxicity in cancer cells is mediated by metabolic generation of endogenous selenium nanoparticles*. Journal of proteome research, 2015. **14**(2): p. 1127-1136.
188. Torres, S., et al., *Biosynthesis of selenium nanoparticles by Pantoea agglomerans and their antioxidant activity*. Journal of nanoparticle research, 2012. **14**(11): p. 1-9.
189. Yuan, B., T.J. Webster, and A.K. Roy, *Cytoprotective effects of cerium and selenium nanoparticles on heat-shocked human dermal fibroblasts: an in vitro evaluation*. International journal of nanomedicine, 2016. **11**: p. 1427.
190. Zhu, C., et al., *Selenium nanoparticles decorated with Ulva lactuca polysaccharide potentially attenuate colitis by inhibiting NF- κ B mediated hyper inflammation*. Journal of nanobiotechnology, 2017. **15**(1): p. 20.

LITERATURA

191. Song, D., et al., *Biogenic Nanoselenium Particles Effectively Attenuate Oxidative Stress-Induced Intestinal Epithelial Barrier Injury by Activating the Nrf2 Antioxidant Pathway*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017. **9**(17): p. 14724-14740.
192. Wang, G., et al., *Mitochondria-Mediated Protein Regulation Mechanism of Polymorphs-Dependent Inhibition of Nanoselenium on Cancer Cells*. Scientific reports, 2016. **6**.
193. Armstrong, D.G. and E.B. Jude, *The role of matrix metalloproteinases in wound healing*. Journal of the American Podiatric Medical Association, 2002. **92**(1): p. 12-18.
194. Shakibaie, M., et al., *Biosynthesis and recovery of selenium nanoparticles and the effects on matrix metalloproteinase-2 expression*. Biotechnology and applied biochemistry, 2010. **56**(1): p. 7-15.
195. Kondo, H., Y. Yonezawa, and H. Ito, *Inhibitory effects of human serum on human fetal skin fibroblast migration: migration-inhibitory activity and substances in serum, and its age-related changes*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2000. **36**(4): p. 256-261.
196. AN, Z.-y., et al., *Isolation, Culture and Identification of Primary Human Skin Dermal Fibroblasts Cell Lines*. Biotechnology, 2013. **2**: p. 016.
197. Tanaka, A., et al., *Expression of p53 family in scars*. Journal of dermatological science, 2004. **34**(1): p. 17-24.
198. Abdallah, B.M., et al., *Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females*. Bone, 2006. **39**(1): p. 181-188.