

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



# **Studium procesu hojení ran *in vitro***

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2023

Ing. Renáta Novotná

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Ing. Renáta Novotná

# **Studium procesu hojení ran *in vitro***

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitelka: doc. Mgr. Jana Franková, Ph.D.

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období 2017–2023.

## Bibliografické identifikace

Jméno a příjmení autora: Ing. Renáta Novotná

Rodné příjmení: Sklenářová

Název disertační práce: Studium procesu hojení ran *in vitro*

Název disertační práce anglicky: Study of wound healing process *in vitro*

Studijní program: Lékařská chemie a klinická biochemie

Školitel: doc. Mgr. Jana Franková, Ph.D.

Rok obhajoby: 2023

Klíčová slova v češtině: hojení ran, zánětlivé cytokiny, matrixové metaloproteinasy, biomateriály, hyaluronan, polykaprolakton

Klíčová slova v angličtině: wound healing, inflammatory cytokines, matrix metalloproteinases, biomaterials, hyaluronan, polycaprolactone

Tato práce byla podpořena vnitřními granty IGA UPOL (IGA\_LF\_2018\_012, IGA\_LF\_2019\_015, IGA\_LF\_2020\_022, IGA\_LF\_2021\_011, IGA\_LF\_2022\_025 a IGA\_LF\_2023\_017) a projektem GAČR č.:21-45449L.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne 27.3. 2023

.....

Ing. Renáta Novotná

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svojí školitelce disertační práce doc. Mgr. Janě Frankové, Ph.D. za odborné vedení mé práce, za její čas, cenné poznámky, lidský přístup a možnost odborných konzultací. Také děkuji za její podporu během realizace řady projektů. Za odborné rady při realizaci studentského projektu IGRÁČEK děkuji také doc. RNDr. Jitce Vostálové, Ph.D.

Poděkování patří dále prof. Mgr. Martinu Modrianskému, Ph.D., přednostovi Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP a bývalé přednostce prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., za možnost podílet se na výzkumných projektech a vypracovat disertační práci na tomto pracovišti.

Dále bych chtěla poděkovat zahraničním kolegům, prof. May Griffith u které jsem absolvovala výzkumnou stáž ve vědeckém centru oftalmologie University of Montreal v Kanadě. Dále děkuji prof. Marii Manconi, se kterou jsem navázala spolupráci během krátkodobých stáží v rámci Erasmus+ programu na University of Cagliari v Itálii, za její odborné rady během měření části výsledků této disertační práce. Také bych chtěla poděkovat A.M. Abdel-Mohsen za spolupráci a přípravu hyaluronových biomateriálů a prof. I. Rajzer za spolupráci a přípravu polykaprolaktonových biomateriálů.

Také bych chtěla ráda poděkovat kolegyním z naší kanceláře a svým kolegům, Ph.D. studentům, za podporu, vytvoření přátelské atmosféry a správného týmového ducha.

Na závěr bych chtěla vyjádřit velké díky za trpělivost a velkou podporu svému manželovi a také rodičům, kteří mi byli oporou po celou dobu mého studia.

## SOUHRN

Hojení ran je přirozenou fyziologickou reakcí na poranění tkáně a skládá se z několika na sebe navazujících fází – hemostázi, zánětu, proliferace a remodelace tkáně. K narušení fyziologického průběhu hojení a k prodloužení zánětlivé fáze může vést mnoho faktorů, např. nadměrná produkce zánětlivých cytokinů a zvýšená hladina matrixových metaloproteinů (MMPs), které degradují komponenty extracelulární matrix (ECM). Přestože je zánětlivá fáze klíčová pro správný průběh hojení, její prodloužení může způsobit poškození okolní tkáně, a proto je třeba ji regulovat.

Cílem této práce bylo sledovat vliv přírodních a syntetických látek nebo biomateriálů na primární buňky a buněčné linie. Přírodní látky: myricetin (MYR), dihydromyricetin (DHM), oleuropein a olej z lentišku byly studovány pro své antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. MYR a DHM byly schopny snižovat expresi transkripčních faktorů Nrf2 a NFκB stejně jako hladinu prozánětlivých cytokinů (IL-6 a IL-8) u škrábnutých a LPS intoxikovaných fibroblastů a keratinocytů. Protizánětlivá aktivita byla prokázána i u vezikul oleuropeinu s lentiškovým olejem, které také inhibovaly produkci IL-6 v LPS intoxikovaných, škrábnutých fibroblastech a způsobily rychlejší uzavření rány *in vitro* (rýhový test).

Další možností, jak podpořit proces hojení rány, je využití biomateriálů, které lze připravit v několika aplikačních formách (např. hydrogely, filmy, membrány a kompozity). Nanokompozitní biofilmy hyaluronanu (HA) s chitinovými nanovláknami a biofilmy HA s polyvinylalkoholem a nanočásticemi ZnO, nevykazovaly žádnou cytotoxicitu a podporovali proliferaci primárních lidských dermálních fibroblastů (NHDF) a osteoblastů (SaOS-2). Polykaprolaktonové biomateriály (PCL), které jsou využívány při rhinoplastice pro své mechanické a fyzikální vlastnosti prokázaly, že jsou biokompatibilní a podporují viabilitu buněk SaOS-2. Některé z těchto PCL materiálů, připravené elektrostatickým zvlákněním byly obohaceny o ionty zinku a o biosklo (BG), které se běžně využívá v tkáňovém inženýrství zaměřujícím se na regeneraci kostní tkáně.

## SUMMARY

Wound healing is a natural physiological process consists of several consecutive phases: homeostasis, inflammation, proliferation, and tissue remodelling. Many factors can lead to disruption of the physiological course of healing. The prolongation of the inflammatory phase e.g. excessive production of inflammatory cytokines and increased level of matrix metalloproteinases (MMPs), which degrade the components of the extracellular matrix (ECM) and postpone the wound healing process. Although the inflammatory phase is key for the proper healing process, its prolongation can cause damage of the surrounding tissue and therefore needs to be regulated.

The aim of our study was to compare the influence of natural and synthetic materials or biomaterials on primary cells and cell lines. Natural substance myricetin (MYR), dihydromyricetin (DHM), oleuropein and lentisk oil were studied for their antioxidant and anti-inflammatory properties. MYR and DHM were able to downregulate the transcription factors Nrf2 and NF $\kappa$ B as well as the levels of proinflammatory cytokines (IL-6 and IL-8) in scratched and LPS intoxicated fibroblasts and keratinocytes. Anti-inflammatory activity was demonstrated with oleuropein vesicles with lentisk oil, which inhibited IL-6 production in LPS-intoxicated, scratched fibroblasts, and caused faster wound closure *in vitro* (scratch assay).

Another way to support the wound healing process is to use biomaterials. Many of them can be classified by their place and role in human body and can be prepared in several application forms (e.g. hydrogels, films, membranes and composites). Nanocomposite biofilms of hyaluronan (HA) with chitin nanofibers or biofilms of HA with polyvinyl alcohol and ZnO nanoparticles displayed no cytotoxicity effect and stimulated proliferation of primary dermal fibroblasts (NHDF) and osteoblasts (SaOS-2). Polycaprolactone (PCL) biomaterials, which are used in rhinoplasty for their outstanding mechanical and physical properties, have been shown to be biocompatible and support cell viability. Some of these PCL materials prepared by electrospinning, have been enriched with zinc ions and bioglass (BG), which is commonly used in bone engineering.



**Klíčová slova:** hojení ran, zánětlivé cytokiny, matrixové metaloproteinasy, biomateriály, hyaluronan, polykaprolakton

**Keywords:** wound healing, inflammatory cytokines, matrix metalloproteinases, biomaterials, hyaluronan, polycaprolactone

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Kůže .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Struktura kosti, chrupavky a osteochondrálního defektu.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Hojení rány .....</b>	<b>24</b>
	2.3.1 Fyziologický průběh.....	24
	2.3.2 Patologický průběh.....	27
<b>2.4</b>	<b>Parametry charakteristické pro hojení rány .....</b>	<b>29</b>
	2.4.1 Transkripční faktory NFκB a Nrf2.....	29
	2.4.2 Cytokiny a chemokiny .....	30
	2.4.3 Metaloproteinázy a jejich inhibitory .....	31
<b>2.5</b>	<b>Vybrané přírodní látky podporující <i>in vitro</i> hojení rány .....</b>	<b>32</b>
	2.5.1 Myricetin .....	32
	2.5.2 Dihydromyricetin .....	33
	2.5.3 Oleuropein .....	34
	2.5.4 Olej z lentišku.....	35
<b>2.6</b>	<b>Kompozitní membrány podporující hojení kožních a kostních defektů.....</b>	<b>36</b>
	2.6.1 Polykaprolaktonové membrány.....	36
	2.6.2 Hyaluronové membrány .....	37
<b>3</b>	<b>CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>39</b>

<b>4.1</b>	<b>Chemikálie, přístroje, materiál .....</b>	<b>39</b>
4.1.1	Chemikálie .....	39
4.1.2	Přístrojové vybavení.....	40
4.1.3	Ostatní laboratorní materiál.....	41
4.1.4	Roztoky .....	41
<b>4.2</b>	<b>Testovaný materiál.....</b>	<b>43</b>
4.2.1	Myricetin (MYR) a dihydromyricetin (DHM).....	43
4.2.2	Oleuropein a olej z lentišku.....	44
4.2.3	Kompozitní PCL membrány .....	44
4.2.4	Kompozitní biofilmy .....	45
<b>4.3</b>	<b>Postup izolace a kultivace buněk .....</b>	<b>46</b>
4.3.1	Izolace a kultivace lidských dermalních fibroblastů .....	46
4.3.2	Izolace a kultivace lidských epidermalních keratinocytů.....	47
4.3.3	Kultivace buněčné linie SaOS-2 .....	47
<b>4.4</b>	<b>Experimentální <i>in vitro</i> modely hojení ran .....</b>	<b>48</b>
4.4.1	<i>In vitro</i> model zánětu rány .....	48
4.4.2	Rýhový test.....	48
<b>4.5</b>	<b>Metody.....</b>	<b>49</b>
4.5.1	Stanovení viability – MTT test.....	49
4.5.2	Western blot .....	49
4.5.3	ELISA.....	50
4.5.4	Anti-glykační aktivita.....	51
4.5.5	Fluorescenční barvení .....	51
4.5.5.1	Barvení živých/mrtvých buněk .....	51
4.5.5.2	Barvení akridinovou oranží.....	51
4.5.5.3	Barvení cytoskeletu Alexa faloidin 555 a jádra DAPI.....	52
<b>4.6</b>	<b>Statistická analýza.....</b>	<b>52</b>

<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Efekt myricetinu a dihydromyricetinu na proces hojení ran <i>in vitro</i></b>	<b>53</b>
5.1.1	Hodnocení buněčné viability	53
5.1.2	Stanovení zvolených markerů (NF-κB, Nrf2, COX-2, MMP-2) v buněčném lyzátu metodou western blot	54
5.1.3	Stanovení prozánětlivých interleukinů metodou ELISA	57
5.1.4	Stanovení MMP-1, MMP-2 a TIMP-1 metodou ELISA	59
5.1.5	Anti-glykační aktivita	62
<b>5.2</b>	<b>Efekt oleuropeinu a oleje z lentišku na proces hojení ran <i>in vitro</i></b>	<b>63</b>
5.2.1	Hodnocení buněčné viability	63
5.2.2	Hodnocení rychlosti uzavírání rány <i>in vitro</i>	65
5.2.3	Stanovení MMP-1, MMP-2, IL-6 a IL-8 metodou ELISA	67
<b>5.3</b>	<b>Charakterizace kompozitních PCL membrán</b>	<b>70</b>
5.3.1	Hodnocení buněčné viability PCL membrán	70
5.3.2	Hodnocení biokompatibility PCL membrán	71
<b>5.4</b>	<b>Charakterizace kompozitních biofilmů</b>	<b>72</b>
5.4.1	Hodnocení buněčné viability a biokompatibility hyaluronan-chitosanových biofilmů	72
5.4.2	Hodnocení buněčné viability a biokompatibility hyaluronanových biofilmů a hyaluronanových biofilmů se zinkem	73
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>74</b>
<b>6.1</b>	<b>Efekt myricetinu a dihydromyricetinu na proces hojení ran <i>in vitro</i></b>	<b>74</b>
<b>6.2</b>	<b>Efekt oleuropeinu a oleje z lentišku na proces hojení ran <i>in vitro</i></b>	<b>78</b>
<b>6.3</b>	<b>Charakterizace kompozitních PCL membrán</b>	<b>80</b>
<b>6.4</b>	<b>Charakterizace kompozitních biofilmů</b>	<b>82</b>

<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>84</b>
<b>7.1</b>	<b>Efekt myricetinu a dihydromyricetinu na proces hojení ran <i>in vitro</i></b> .....	<b>84</b>
<b>7.2</b>	<b>Efekt oleuropeinu a oleje z lentišku na proces hojení ran <i>in vitro</i></b> .....	<b>84</b>
<b>7.3</b>	<b>Charakterizace kompozitních PCL membrán</b> .....	<b>84</b>
<b>7.4</b>	<b>Charakterizace kompozitních biofilmů</b> .....	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI</b> .....	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>89</b>

## SEZNAM ZKRATEK

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
ALP	alkalická fosfatáza
AMP	antimikrobiální peptidy
APS	peroxodisíran amonný
BG	biosklo
BMP	kostní morfogenetický protein
BSA	hovězí sérový albumin
ChNWs	chitinová nanovlákna
COX-2	cyklooxygenáza 2
CXC	chemokiny
DAPI	(4',6-diamidin-2-fenylindol) – fluorescenční barvivo
DHM	dihydromyricetin
DMEM	médium Dulbecco's Eagle
DMSO	dimethylsulfoxid
ECM	mezibuněčná hmota
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
ELISA	enzymově vázaná imunosorpční analýza
FBS	fetální hovězí sérum
FDA	fluorescein diacetát
HA	kyselina hyaluronová
HRP	křenová peroxidáza
IL	interleukin
Keap1	Kelch-like ECH-asociovaný protein 1
KGF	keratinocytový růstový faktor
LPS	lipopolysacharid
MMP	matrixové metaloproteinázy
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
MYR	myricetin
NFκB	nukleární faktor kappa B
NHDF	lidské dermální fibroblasty

NHEK	lidské epidermální keratinocyty
Nrf2	nukleární erythroidní faktor 2
PAGE	polyakrylamidový gel
PBS	fosfátový pufr (pH 7,4)
PCL	polykaprolakton
PDGF	růstový faktor produkovaný destičkami
PI	propidium jodid
PMSF	fenylmetansulfonyl fluorid
PVA	polyvinylalkohol
PVDF	polyvinylidenfluorid
ROS	reaktivní formy kyslíku
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor beta
TLR	receptory skupiny Toll
TIMP	inhibitory matrixových metaloproteináz
TMB	3,3',5,5' tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor beta
SaOS-2	buněčná linie odvozená od lidského osteoblastického sarkomu
SDS	dodecylsírán sodný
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

# 1 ÚVOD

Hojení ran je proces, který nastává v okamžiku poranění a je tvořen několika na sebe navazujícími fázemi – hemostázou, zánětem, proliferací a remodelací tkáně. V případě narušení fyziologického průběhu např. vlivem infekce, dochází k prodloužení zánětlivé fáze a tím i doby hojení. Jedním z důvodů prodloužení zánětlivé fáze může být i nadměrná produkce ROS a bakterií a s tím související tvorba biofilmu. Zvýšená hladina zánětlivých cytokinů může způsobit zvýšení hladiny MMPs, které degradují komponenty ECM. Tyto prozánětlivé cytokiny mohou interagovat s Toll-like receptory a aktivovat signální dráhy NF $\kappa$ B a Nrf2. Přestože je zánětlivá fáze klíčová pro správný průběh hojení, její prodloužení může způsobit poškození okolní zdravé tkáně, a proto je třeba ji regulovat. Jednou z možných metod regulace procesu hojení je terapeutické použití přírodních sloučenin nebo biomateriálů.

MYR a DHM jsou přírodní látky, které se řadí mezi flavonoidy. Liší se pouze dvojnou vazbou mezi C2 a C3 na flavanovém kruhu. Zatím co se MYR vyskytuje v rostlině *Myrica nagi (esculenta)* a celé řadě potravin (zejména ovoci – bobulích, pomerančích, čaji a červeném víně), DHM se nachází pouze v rostlinách *Hovenia dulcis* nebo *Ampelopsis grossedentata*. MYR a DHM jsou studovány především pro své protizánětlivé, antioxidační a antimikrobiální vlastnosti. Další přírodní testovanou látkou byl oleuropein, který je nejhojněji zastoupenou fenolickou sloučeninou obsaženou v olivovníku. V přírodním léčení se používá k ošetření kožních onemocnění, zejména těch spojených se zánětem. Podobné bioaktivní látky jsou obsažené v lentiškovém oleji. Zejména fenolické sloučeniny mají pozitivní vliv na udržení homeostázy kůže a mohou být použity při léčbě kožních poranění. Pro zvýšení stability některých testovaných látek (oleuropeinu a oleje z lentišku) byly tyto bioaktivní látky začleněny do specificky formulovaných nanonosičů. Jako kontrola byly tyto látky (oleuropein a olej z lentišku) testovány v disperzi. Pro tyto přírodní sloučeniny se jako nejvhodnější nanonosiče ukázaly fosfolipidové vezikuly, protože jsou schopny stabilně začleňovat jak hydrofilní, tak lipofilní sloučeniny. Ty byly připraveny ve formě liposomů, transfersomů,



hyalurosomů a hyalutransfersomů, u kterých se očekává, že budou vhodným nosičem schopným procházet kůží.

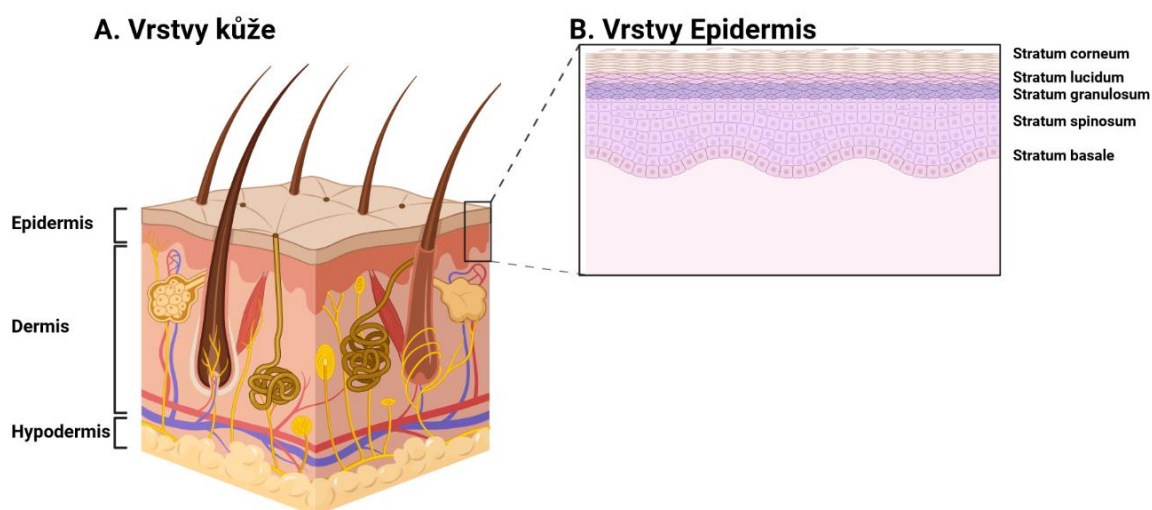
Další možností, jak podpořit proces hojení rány je využití biomateriálů. Tyto biomateriály mohou být dle typu poranění připraveny v několika provedeních (např. hydrogely, filmy, membrány a kompozity). V současné době se pro hojení kostních i kožních defektů zkoumají nanokompozitní materiály na bázi přírodních polymerů jako je škrob, celulóza, chitosan, chitin a kyselina hyaluronová. Tyto přírodní polymery jsou velmi často kombinovány s nanočásticemi pro zlepšení jejich vlastností, jako je mechanická pevnost, biokompatibilita, antimikrobiální vlastnosti a degradace. V naší práci jsme se zaměřili na testování nanokompozitních biofilmů HA s chitinovými nanovláknami a HA a polyvinylalkoholem (PVA) a nanočásticemi ZnO. Velmi dobrou biokompatibilitu vykazují také polykaprolaktonové (PCL) biomateriály, které jsou pro své mechanické, fyzikální a stabilitní vlastnosti využívány při rhinoplastice. Některé z těchto testovaných PCL materiálů byly obohaceny o ionty zinku a o biosklo (BG), které se také díky své výborné bioaktivitě využívá v tkáňovém inženýrství, a to zejména pro regeneraci kostní tkáně.

## 2 Přehled současného stavu problematiky

Tato disertační práce se zabývá *in vitro* studiem přírodních látek podporujících hojení kožních ran (myricetinu, dihydromyricetinu, oleuropeinu a oleje z lentišky) a kompozitních materiálů, které podporují hojení kožních a kostních/osteocondrálních defektů.

### 2.1 Kůže

Kůže je největší orgán lidského těla s plochou téměř 2 m<sup>2</sup>. Skládá ze tří hlavních funkčních vrstev – epidermis (pokožka), dermis (škára) a hypodermis (podkožní vazivo), z nichž každá se skládá z několika dalších vrstev (**Obr. 1**). Vytváří ochrannou bariéru těla před okolním prostředím, udržuje jeho integritu, optimální hladinu vody a účastní se osmoregulace. Je hlavním orgánem regulace tělesné teploty a je vysoce citlivá na dotek, chlad či bolest. Účastní se také látkové výměny a produkce vitamínu D. Kůže mění svou barvu, tloušťku (0,5 – 4 mm) a strukturu na různých částech těla podle specifických funkčních potřeb. Nejtenčí je na očním víčku a nejsilnější na dlaních a chodidlech. Na povrchu prstů tvoří jedinečné individuální otisky, které zůstávají nezměněny po celý život (Arda et al., 2014).



Obr. 1: Anatomie kůže. Kůže má 3 hlavní vrstvy: epidermis, dermis a hypodermis. Vytvořeno v programu Biorender.com

## Epidermis

Epidermis je nejsvrchnější vrstva kůže, kterou tvoří neustále se obnovující rohovějící vrstevnatý dlaždicový epitel. Tato tenká tkáň ektodermálního původu má pozoruhodnou schopnost nás chránit před mechanickým traumatem, chemickými látkami, ultrafialovým světlem a patogeny (Moreci & Lechler, 2020). Epidermis je bezcévnatá a její výživa je zajištěna difuzí z dermis. Je tvořena 4 typy buněk: keratinocyty, melanocyty, Langerhansovými buňkami a Merkelovými buňkami. Keratinocyty, jako hlavní buňky epidermis, jsou uspořádány do 5 vrstev: *Stratum basale* (bazální vrstva), *Stratum spinosum* (vrstva ostnitých buněk), *Stratum granulosum* (vrstva zrnitých buněk), *Stratum lucidum* (vrstva jasných buněk) a *Stratum corneum* (rohová vrstva) (Yousef et al., 2021), (Junqueira, 2002), (Rajnochová Svobodová, 2012).

*Stratum basale* je nejhlubší vrstva epidermis, oddělená od dermis bazální membránou (bazální lamina), ke které je připojena pomocí hemidesmosomů. Skládá se z mitoticky aktivních, basofilních cylindrických buněk (keratinocytů a části melanocytů), které proliferují, migrují směrem k povrchu a postupně se diferencují za vzniku stratifikované epidermis. *Stratum basale* je charakterizována expresí keratinu 5 a 14 (Roger et al., 2019).

*Stratum spinosum* je nejtlustší vrstva epidermis. Obsahuje nepravidelné, polygonální keratinocyty s cytoplazmatickými výběžky, které jsou opět mitoticky aktivní. Nachází se zde rozptýlené melanocyty a také Langerhansovy a Merkelovy buňky (Rajnochová Svobodová, 2012). Tato vrstva je charakterizována změnou exprese z keratinu 5 a 14 na keratin 1 a 10 (Fuchs & Green, 1980). V horní části této vrstvy je také syntetizován involukrin, marker časně terminální diferenciace. Buňky spinózní vrstvy pokračují v diferenciaci a zrání za vzniku *Stratum granulosum* (Miyoshi et al., 2012).

*Stratum granulosum* je tvořeno několika vrstvami oploštělých buněk. Tato vrstva je charakterizována expresí pozdních terminálních diferenciálních markerů loricrinu a filagrinu (Murphy et al., 1984), (Miyoshi et al., 2012). Ve *Stratum granulosum* tvoří některé keratiny amorfní agregáty nazývané keratohyalinová granula (Usui et al., 2019). Dále se tvoří lamelární granule, které obsahují glykolipidy.

*Stratum lucidum* je přítomné v silnější kůži na dlaních a chodidlech. Tato tenká čirá vrstva obsahuje eleidin, transformační produkt keratohyalinu (Yousef et al., 2021).

*Stratum corneum* jako nejbližší vrstva epidermis je první obrannou linií těla. Je tvořena korneocyty, což jsou bezjaderné keratinocyty, které dosáhly konečné fáze diferenciací (Norlén & Al-Amoudi, 2004). *Stratum corneum* obsahuje asi 15-20 vrstev zploštělých korneocytů, které jsou obklopeny zrohovatěným buněčným obalem složeným ze zesíťovaných proteinů a kovalentně vázaných lipidů. Přičemž hlavními zástupci lipidů jsou ceramidy, volné mastné kyseliny a cholesterol (Bouwstra & Ponec, 2006) a z proteinů involucrin, lorikrin a filaggrin (Gartner, 2020).

## **Dermis**

Dermis pochází ze tří různých mezenchymálních zárodečných listů a obsahuje různé typy buněk. Těmi hlavními jsou fibroblasty, dále makrofágy a žírné buňky. Tato vrstva kůže vyživuje a váže epidermis a hypodermis (Rippa et al., 2019). Dělí se na 2 vrstvy – povrchová (papilární) a hlubší (retikulární vrstva) (Arda et al., 2014). Povrchová vrstva vytváří mnoho výběžků mezi epidermis a obsahuje nervová zakončení a mikrovaskulární cévy, které jsou důležité pro výživu epidermis (Rippa et al., 2019). Tato vrstva je tvořena především kolagenním vazivem (typu III) a fibroblasty. Hlubší vrstva je silnější a je tvořena především kolagenem typu I. Dále obsahuje dermis kolagen typu IV a VII a elastin, který zajišťuje její pružnost. Prostor mezi kolagenními či elastinovými vlákny a buňkami vyplňují proteoglykany a glykoproteiny. Stárnutím se papilární dermis zmenšuje, ztenčuje se a je postupně nahrazována retikulární (Mine et al., 2008). Dermis také obsahuje hustou síť krevních a lymfatických cév, žláz (potních, mazových), nervů a vlasových folikulů (Arda et al., 2014), (Junqueira, 2002), (Rajnochová Svobodová, 2012).

## **Hypodermis**

Hypodermis je spodní vrstva kůže, která není ostře oddělena od dermis. Je tvořena řídkým vazivem a obsahuje síť krevních a lymfatických cév. Obsahuje množství tukových buněk, které jsou jak důležitou zásobou energie, tak prostředím pro vitamíny rozpustné v tucích (Junqueira, 2002), (Rajnochová Svobodová, 2012). Tato vrstva hraje také důležitou roli v termoregulaci (Blair et al., 2020).

## Kožní mikrobiom

Kůže a její vrstvy představují komplexní bariérový orgán tvořený symbiotickým vztahem s kožní mikrobiální flórou, tzv. kožním mikrobiomem, který je definován jako komunita mikroorganismů a jejich genomu (Dréno et al., 2016).

Kůže je však neustále vystavena různým endogenním a exogenním faktorům, které ovlivňují složení a funkci kožního mikrobiomu, jehož narušení může vést k zánětlivým kožním onemocněním, autoimunitním onemocněním nebo také k nehojícím se ránám. Většina bakterií na kůži je tzv. komenzálních (přírodně se vyskytujících), které na rozdíl od těch patogenních jsou pro svého hostitele neškodné nebo dokonce prospěšné (Harris-Tryon & Grice, 2022). Komenzální mikroby metabolizují hostitelské proteiny a lipidy epidermis a produkují bioaktivní molekuly, které inhibují invazi patogenů na kůži (Chen et al., 2018). Kožní mikrobiom ovlivňuje expresi různých imunomodulačních proteinů, včetně IL-1 $\alpha$ , složek komplementu a antimikrobiálních peptidů (AMP). (Chehoud et al., 2013).

Jedním z hlavních komenzálních rodů bakterií žijících na kůži je *Corynebacterium*. Tyto bakterie jsou přítomny na všech místech těla a dominují především na vlhkých místech (Chen et al., 2018). V místech suché kůže, jako jsou paže a nohy dominují druhy *Cutibacterium* (dříve *Propionibacterium*) a *Staphylococcus* (Ellis et al., 2019). Nejvýznamnější bakterií rodu *Staphylococcus* je *S. epidermidis* u kterého bylo prokázáno, že stejně jako *S. hominis*, vylučuje AMP, která zabíjejí patogenní *S. aureus* (Nakatsuji et al., 2017).

Patogenní *S. aureus* je schopný tvořit biofilm a vyskytuje se převážně v nehojících se ranách. Dalším patogenním druhem, který se v těchto ranách obvykle vyskytuje je *Pseudomonas aeruginosa* (Tomic-Canic et al., 2020). Přítomnost těchto bakterií může způsobit prodloužení zánětlivé fáze a pomalejší uzavírání rány (De Pessemier et al., 2021). Oproti tomu *S. epidermidis* má také významnou roli při hojení ran, kde indukuje CD8<sup>+</sup> T buňky, které stimulují proliferaci keratinocytů a zároveň podporují antimikrobiální ochranu rány (Linehan et al., 2018). Buněčná stěna *S. epidermidis* rovněž potlačuje zánětlivou reakci vazbou na Toll-like receptor 2 (TLR2) (Lai et al., 2009) a snížením hladiny TNF- $\alpha$  (Johnson et al., 2018).

## 2.2 *Struktura kosti, chrupavky a osteochondrálního defektu*

### **Kost**

Kostra lidského těla se skládá ze dvou hlavních strukturálních typů kosti – kompaktní (hutné) a houbovitě. Na jejich povrchu se nachází vazivový obal, okostice. Kompaktní kost tvoří obal kolem dřevné dutiny. Je tvořena Haversovými systémy, které se skládají z koncentrických lamel kostní tkáně obklopujících centrální kanál obsahující krevní cévy a vytvářejí tzv. osteony. Houbovitá neboli spongiózní kost je umístěna uvnitř kosti, má nižší hustotu a větší povrch (Junqueira, 2002), (Ralston, 2021).

Kost je dynamická tkáň, která během života prochází obnovou prostřednictvím kostní remodelace. Vzniká z vaziva nebo chrupavky v procesu zvaném osifikace. Prostřední část kosti se nazývá diafýza, dva konce kosti pak epifýzy (**Obr. 2A**). Poskytuje mechanickou podporu kloubům, šlachám a vazům a chrání životně důležité orgány před poškozením. Zároveň funguje jako zásobárna vápníku a fosfátu při zachování minerální homeostázy (Ralston, 2021).

Hlavními kostními buňkami jsou osteocyty, které tvoří 90 % až 95 % všech kostních buněk v dospělé kosti a jsou nejdéle žijící kostní buňkou. Pochází z mezenchymálních kmenových buněk, které diferencují na osteoblasty. Při této diferenciaci je snižena produkce zejména alkalické fosfatázy (ALP). Kasein kináza II je naopak zvýšena, stejně jako osteokalcin. Z osteoblastů, které produkují kolagen typu I a mají zvýšenou hladinu ALP, následně diferencují na osteocyty. Na degradaci kostní matrice se podílejí osteoklasty (Bonewald, 2011).

Hlavní organickou složkou kostní matrice je kolagen typu I. Kostní matrice také obsahuje malá množství jiných kolagenů (např. kolagen III a V), strukturálních proteinů a růstových faktorů (Clarke, 2008). Některé z nich, jako je osteokalcin, jsou relativně specifické pro kosti, zatímco jiné, jako je fibronectin a růstové faktory (např. TGF- $\beta$ ), nejsou specifické. Na těchto proteinech kostní matrice dochází k mineralizaci. Mineralizace zajišťuje mechanickou tuhost, pevnost v tahu a elasticitu odvozenou od kostního kolagenu. Kostní minerál je složen převážně z vápníku a fosforečnanu uložených ve formě krystalů hydroxyapatitu ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$ ) (Ralston, 2021), (Marsell & Einhorn, 2011).

## Chrupavka

Kloubní chrupavka, je typ hyalinní chrupavky (**Obr. 2B**), která je tvořena hustou, elastickou pojivovou tkání, pokrývající povrch kloubů. Histologicky je uspořádána do 3 vrstev (povrchové, střední a hluboké), v nichž je rozdílná hustota strukturních vláken. Pod hlubokou vrstvou se nachází ještě vrstva kalcifikovaná (Wei & Dai, 2021).

Chrupavka je avaskulární tkáň, která není inervována a je složena primárně z jediného buněčného typu, chondrocytu (Armiento et al., 2018). Vzhledem k tomu, že kloubní chrupavka je avaskulární, chondrocyty fungují s hypoxickým metabolismem a živiny a kyslík jsou buňkám dodávány primárně difúzí ze synoviální tekutiny subchondrální kosti (Demoor et al., 2014), (Žylińska et al., 2021).

Chondrocyty produkují hlavně kolagen typu II a agrekan, dva hlavní markery specifické pro kloubní chrupavku. Tento typ kolagenu propůjčuje v chrupavce odolnost vůči kompresním silám. Agrekan je proteoglykan, který je složený z mnoha sulfatovaných glykosaminoglykanových řetězců, jako je chondroitin sulfát a keratan sulfát. V důsledku toho dokáže zadržovat značné množství vody, čímž poskytuje flexibilitu a viskoelasticitu (Roseti et al., 2019).

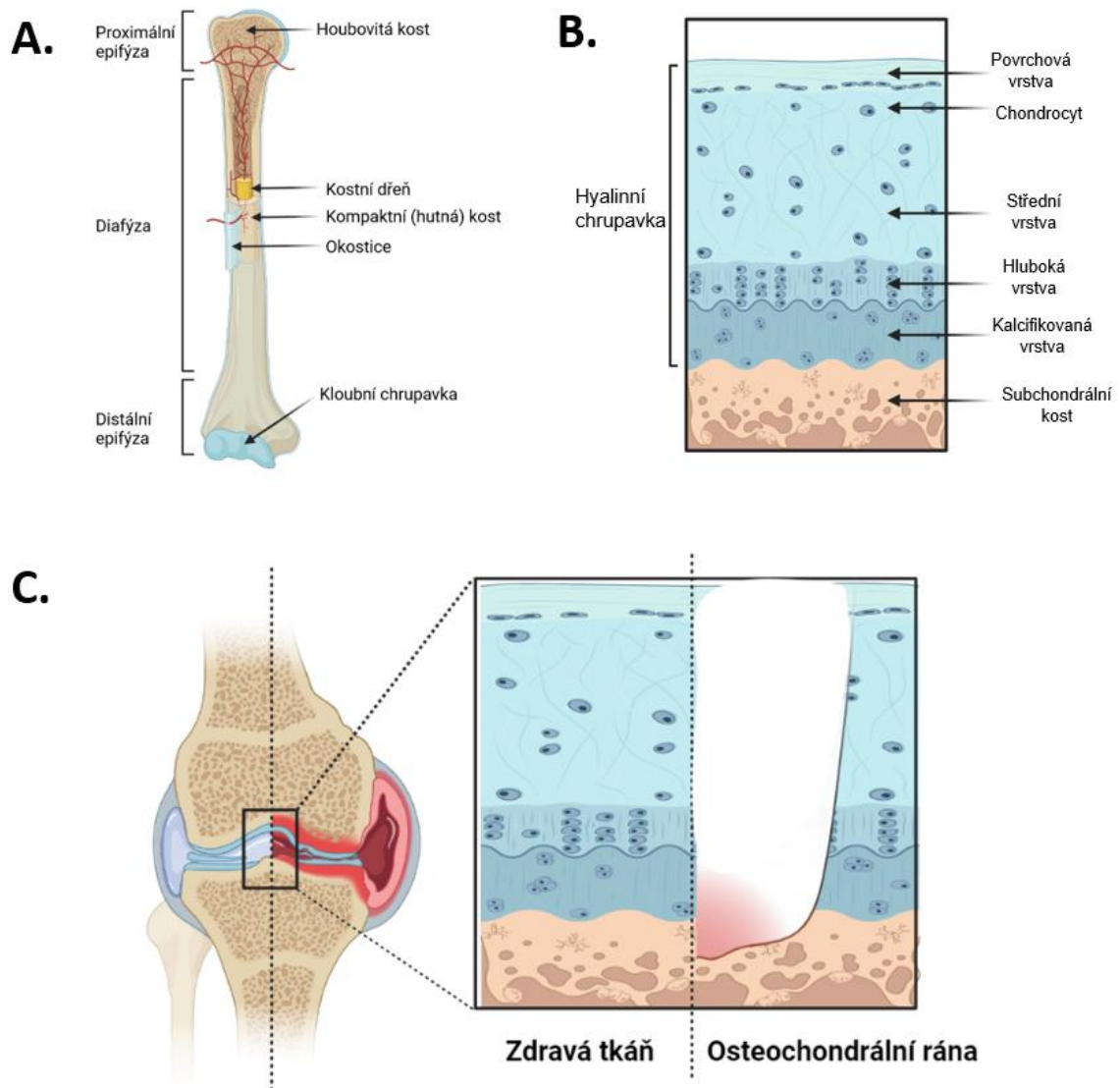
Chondrocyty syntetizují také faktory podílející se na degradaci ECM, jako jsou MMPs, hyaluronidázy a agrekanázy. Výsledkem je udržení jemné rovnováhy mezi anabolismem a katabolismem ECM chrupavky (Demoor et al., 2014).

## Osteochondrální defekt

Osteochondrální defekt (**Obr. 2C**) se týká oblasti poškození, která zahrnuje jak chrupavku, tak kost (subchondrální kost). Nejčastěji nastává v důsledku akutního traumatického poranění, degenerativními procesy nebo osteoporózou (Yu et al., 2023). Po poranění se kost může do určité míry sama opravit díky své neustálé remodelaci, vaskularizované povaze a mezenchymálním kmenovým buňkám, přítomných v kostní dřeni. Oproti tomu chrupavka má velmi omezenou schopnost samoopravy (Lesage et al., 2022).

Rekonstrukce osteochondrálního defektu pomocí tkáňového inženýrství je výzva v regenerativní medicíně a vyžaduje například implantaci autologních chondrocytů a osteochondrálních autoštěpů nebo použití biomateriálů, které zajišťují jak regeneraci kloubní chrupavky, tak remodelaci subchondrální kosti (Oprita et al., 2022). Mezi tyto biomateriály patří 3D tisknuté dvouvrstvé implantáty, kde horní vrstva indukuje hojení kloubní chrupavky a spodní vrstva subchondrální kosti. Mezi ně řadíme

i polykaprolaktonové (PCL) membrány diskutované níže v této práci. Navíc do těchto biomateriálů můžeme začlenit i růstové faktory, např. TGF- $\beta$  nebo/a BMP proteiny, které podporují buněčnou proliferaci a diferenciaci, čímž urychlují proces hojení osteochondrálního defektu (Zhou et al., 2020), (Reyes et al., 2012).



Obr. 2: Struktura kosti (A), hyalinní chrupavky (B) a osteochondrálního defektu (C). Vytvořeno v programu Biorender.com



## 2.3 Hojení rány

### 2.3.1 FYZIOLOGICKÝ PRŮBĚH

Hojení ran je komplexní proces (**Obr. 3**), který zahrnuje několik po sobě navazujících fází, které se do určité míry překrývají: hemostázu, zánět, proliferaci a remodelaci tkáně (Wang et al., 2018), (Sklenářová et al., 2022).

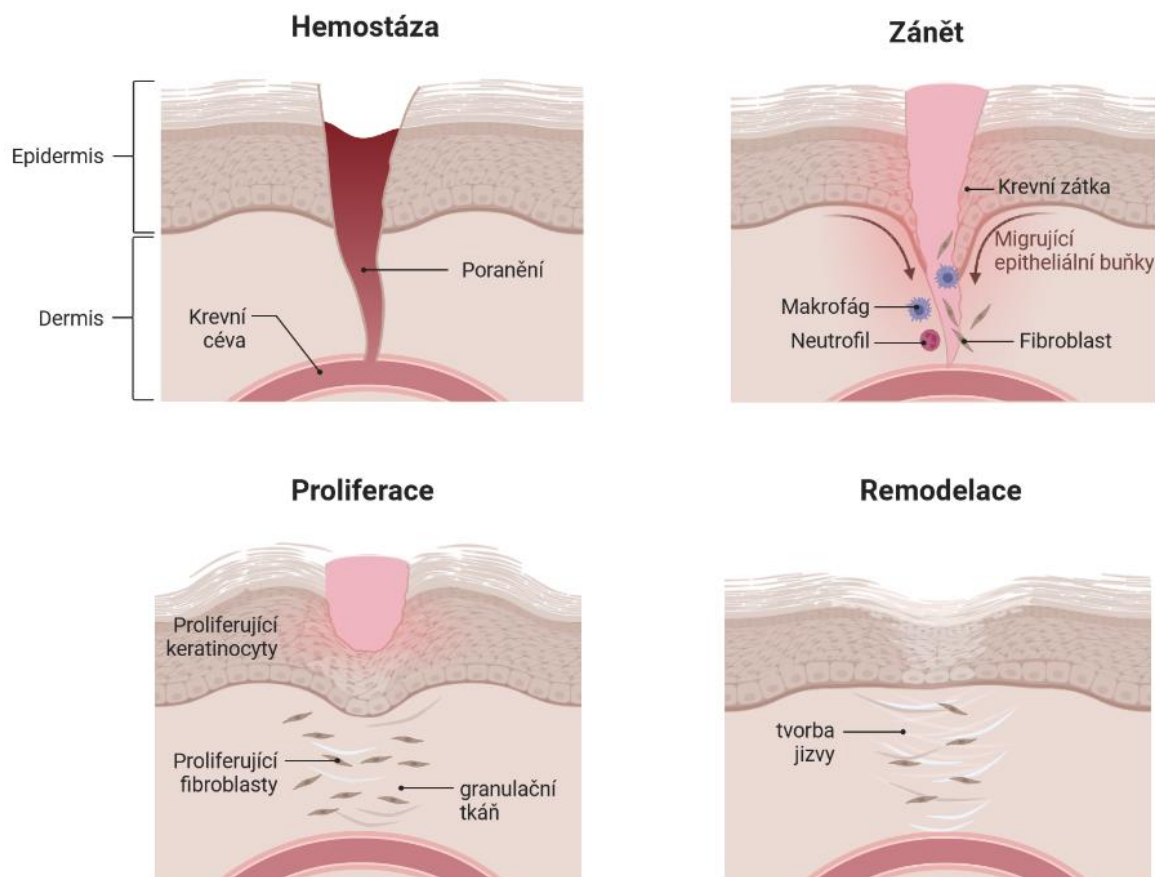
Prvním krokem po vzniku rány je vazokonstrikce krevních cév, následovaná aktivací trombocytů, které se vážou na kolagen a endoteliální výstelku za vytvoření primární krevní zátky. Toto dočasné utěsnění rány je dále podpořeno aktivací koagulační kaskády, která tvoří robustnější fibrinovou síť v místě poranění (Alberts et al., 2002). Těmto procesům napomáhá mnoho mediátorů včetně endotelinu, serotoninu, von Willebrandova faktoru, adenosindifosfátu, integrinů a kolagenu vázajícího glykoprotein VI, stejně jako uvolňování chemotaktických a růstových faktorů, jako je transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), který přispívá k obnovení normální homeostázy po traumatu (Farndale et al., 2004), (Golebiewska & Poole, 2015).

Jakmile rána nekrvácí, nastává fáze zánětu s rozšířením krevních cév a expesí prozánětlivých mediátorů. Tím se zvyšuje průtok krve a propustnost cév pro molekuly plazmy a imunitní buňky (Eming et al., 2014). Tento krok je důležitý pro opravu poškozených struktur a zejména okysličení a dodání živin pro vznik nové tkáně (DiPietro, 2016), (Demling, 2009). Cévní permeabilita v poraněné tkáni a kolem ní usnadňuje infiltraci leukocytů (neutrofilů a monocytů), které se účastní procesu čištění rány fagocytováním buněčných zbytků a patogenů v intersticiálním prostoru. Během této fáze rovněž dochází k uvolňování zánětlivých cytokinů a růstových faktorů, jako je IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  a PDGF. Produkce těchto cytokinů a růstových faktorů podporuje migraci a proliferaci kožních buněk a syntézu molekul ECM nezbytných pro regeneraci poškozené tkáně (Zhao et al., 2016).

Po několika dnech nastává přechod z fáze zánětu do fáze proliferace. Pro výstavbu nové tkáně a proces hojení je zásadní tvorba nových krevních cév, která probíhá souběžně ve všech fázích reparačního procesu. Nástup angiogeneze je stimulován několika faktory, především VEGF a TGF- $\beta$  (DiPietro, 2016). Dalším mediátorem, který silně stimuluje

tento proces, je kolagen typu I. Zdá se, že vazba integrinových receptorů  $\alpha 1\beta 1$  /  $\alpha 2\beta 1$  na povrchu endoteliálních buněk je klíčová pro jeho angiogenní aktivitu (Twardowski et al., 2007). V průběhu této fáze do rány migrují fibroblasty a tvoří granulační tkáň, která se skládá z nové pojivové tkáně a drobných krevních cév, hojně proliferuje a produkuje proteiny ECM (Frangogiannis, 2016). Následně se fibroblasty změň na svůj myofibroblastový fenotyp a navážou se na fibronectin a kolagen v extracelulární matrix (Ramasastry, 2005). V proliferační fázi je klíčová produkce TGF- $\beta$ , který ovlivňuje transkripční geny kolagenu, snižuje produkci MMP a zvyšuje hladiny inhibitorů proteáz – TIMP (Cabral-Pacheco et al., 2020).

Závěrečný proces reepitelizace, důležitý pro obnovu intaktní epidermis, zajišťují především keratinocyty, které migrují podél fibrinové krevní sraženiny a na povrchu granulační tkáně (Pastar et al., 2014). Proces remodelace tkáně je poslední fází hojení rány a může trvat i několik měsíců. Pevnost rány v tahu se postupně zvyšuje nahrazením kolagenu charakteristického pro hojení (typ III) běžným kolagenem typu I. Konečným výsledkem je plně vyžralá jizva (Reinke & Sorg, 2012), (Velnar et al., 2009).

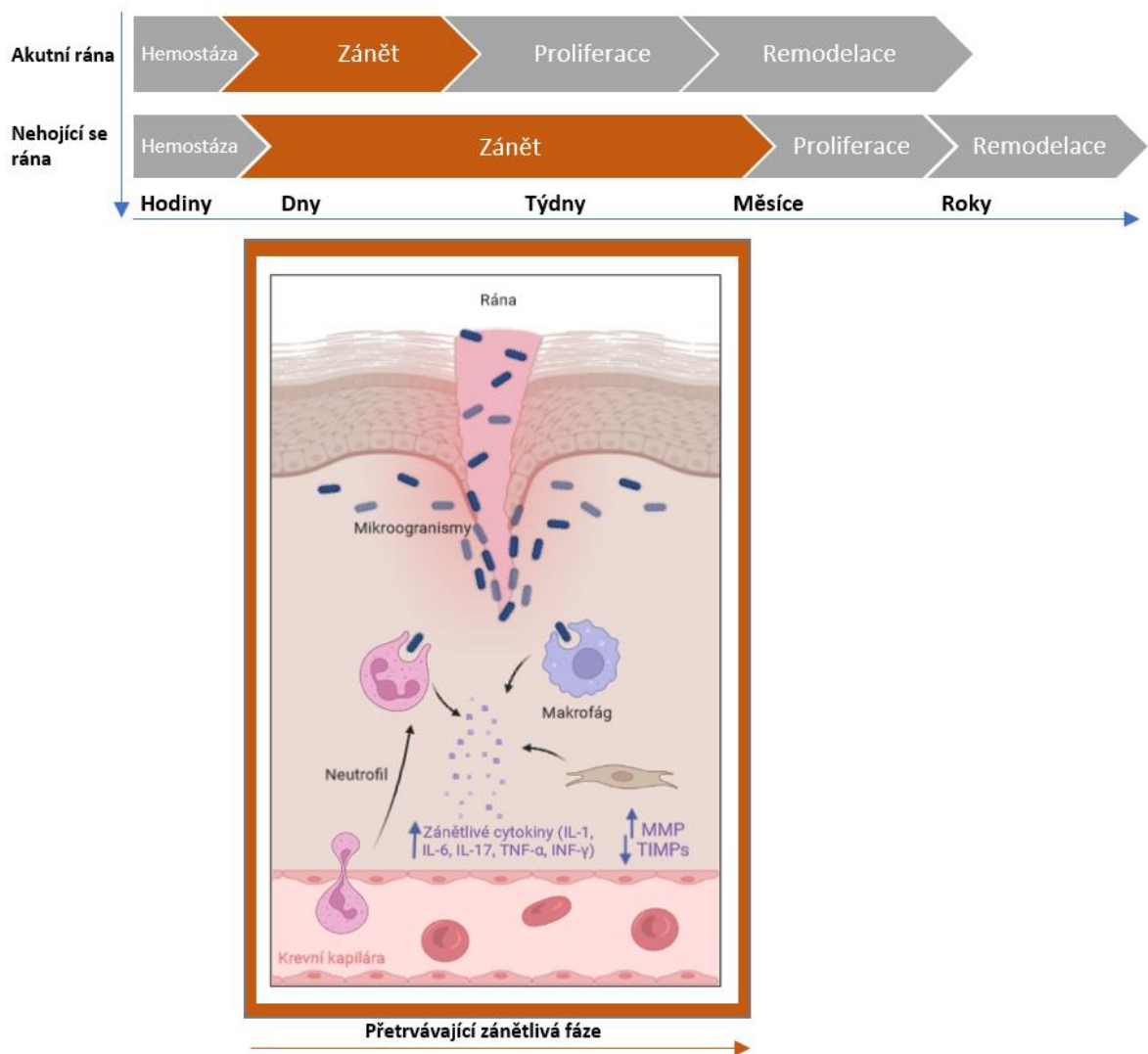


Obr. 3: Proces hojení ran. Hojení ran je důležitým fyziologickým procesem k udržení integrity kůže po traumatu. Reparace rány začíná hemostázou, kdy destičková zátka zabraňuje ztrátě krve a tvoří se předběžná fibrinová matrice. Poté následuje zánětlivá fáze charakteristická přílivem neutrofilů, makrofágů a produkcí zánětlivých cytokinů. Následuje proliferační fáze, kde migrující keratinocyty a fibroblasty uzavírají ránu, zároveň probíhá tvorba nových cév a na závěr probíhá remodelace tkáně a tvorba jizvy. Vytvořeno v programu BioRender.com.

### 2.3.2 PATOLOGICKÝ PRŮBĚH

Nehojící se rány jsou definovány jako rány nezhojené do 12 týdnů a v konstantním a nadměrném zánětlivém stavu (**Obr. 4**). Jsou úzce spojeny s narušeným fenotypovým přechodem prozánětlivých makrofágů na protizánětlivé fenotypy v ranách (Li et al., 2021). Jako odpověď na mikrobiální kontaminaci se tyto rány vyznačují vysokým počtem Langerhansových buněk, neutrofilů a nadměrnou produkcí zánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) (Wilkinson & Hardman, 2020). Zdá se, že kritickým faktorem v tomto cyklu přetrvávajícího zánětu je nadměrná infiltrace neutrofilů, která vede k nadprodukci ROS, což způsobuje přímé poškození ECM (Schilrreff & Alexiev, 2022). U nehojících ran je také pozorován vysoký výskyt běžných patogenů ran, jako je *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, které mohou na povrchu rány tvořit biofilm (Loesche et al., 2017).

Prodloužená zánětlivá fáze působí také na reepitelizaci a dermální remodelaci. Nehojící se rány jsou charakterizovány hyperkeratotickým okrajem. Současně je dermální rekonstrukce významně inhibována vysokými hladinami MMPs (MMP-2, MMP-9) a nízkými hladinami jejich inhibitorů (TIMPs) v ráně. Tyto proteázy nejen rozkládají dermální ECM, ale také degradují důležité růstové faktory (např. VEGF, TGF- $\beta$ ) (Lauer et al., 2000). Tato nerovnováha mezi MMPs a TIMPs zvyšuje degradaci ECM, zhoršuje migraci buněk, snižuje proliferaci fibroblastů a syntézu kolagenu. Kromě této nerovnováhy je za prodloužení hojení ran zodpovědný také nízký obsah oxidu dusnatého (NO) a nedostatečné okysličení tkání (Schilrreff & Alexiev, 2022).



Obr. 4: Nehojící se rána: prodloužená zánětlivá fáze. Počáteční vstup patogenů vede makrofágy a neutrofilů k uvolňování zánětlivých cytokinů, které přitahují další imunitní buňky do místa poranění a zvyšují vaskulární permeabilitu. Současně je dermální rekonstrukce významně inhibována vysokými hladinami MMPs. U nehojících se ran přetrvává tato uvedená fáze i několik týdnů (Schilrreff & Alexiev, 2022), (Przekora, 2020). Vytvořeno v programu Biorender.com

## 2.4 Parametry charakteristické pro hojení rány

### 2.4.1 TRANSKRIPČNÍ FAKTORY NF- $\kappa$ B A Nrf2

Transkripční faktory jsou klíčové buněčné složky, které řídí expresi genů. Tyto proteiny se spolupodílejí na iniciaci transkripce (přepis dědičné informace z genu (z DNA) na mRNA) (Lambert et al., 2018). Transkripční faktory NF- $\kappa$ B (nukleární faktor- $\kappa$ B) a Nrf2 (nukleární erythroidní faktor 2) mají vliv na celou řadu pochodů včetně působení při hojení ran svými protizánětlivými (NF- $\kappa$ B) a antioxidačními (Nrf2) účinky.

Nrf2 je cytosolický transkripční faktor, který za fyziologických podmínek je asociován s proteinem Keap1. Za patologických podmínek je Nrf2 oddělen od svého inhibičního proteinu Keap1 a translokuje do jádra, kde se váže na oblast ARE, která kóduje mnoho antioxidačních a detoxikačních enzymů. Tyto enzymy jsou důležité pro ochranu buňky, neboť eliminují cytotoxické působení ROS. Hlavní funkce Nrf2 při hojení ran je právě ochrana před nadměrnou akumulací ROS (Ambrozova et al., 2017).

NF- $\kappa$ B (nukleární faktor- $\kappa$ B) sleduje expresi genů zapojených do zánětlivé odpovědi. Během hojení ran se NF- $\kappa$ B signální dráha, na podnět poškození tkání, oxidačního stresu a prozánětlivých cytokinů, aktivuje tzv. kanonickou dráhou pomocí Toll-like receptorů (TLR), což vede k fosforylaci podjednotky I $\kappa$ B, následné disociaci NF- $\kappa$ B a translokaci do jádra. Na tento děj navazuje zvýšená sekrece prozánětlivých cytokinů, jako je IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  a dalších zánětlivých markerů jako je např. cyklooxygenáza 2 (COX-2) (Saha et al., 2020). Na rozdíl od kanonické NF- $\kappa$ B dráhy, nekanonická NF- $\kappa$ B dráha selektivně reaguje na specifickou skupinu stimulů, např. ligandů TNFR (TNF receptory pro T a B buňky). Nezahrnuje degradaci I $\kappa$ B $\alpha$ , ale k fosforylaci podjednotky p100, což zjednodušeně vede ke vzniku komplexu NF- $\kappa$ B p52 a jeho jaderné translokaci a expresi cílových genů (zejména imunitního systému – funkci B-Lymfocytů) (Liu et al., 2017).

Je známo, že Nrf2 negativně reguluje signální dráhu NF- $\kappa$ B pomocí mnoha mechanismů i) Nrf2 inhibuje aktivaci NF- $\kappa$ B zprostředkovanou oxidačním stresem snížením intracelulárních hladin ROS ii) Nrf2 zabraňuje proteozomální degradaci I $\kappa$ B- $\alpha$  a inhibuje jadernou translokaci NF- $\kappa$ B iii) Nrf2 indukuje zvýšení exprese antioxidačních

enzymů (např. hemoxygenázy 1 (HO-1), které blokují degradaci podjednotky I $\kappa$ B- $\alpha$  (Soares et al., 2004), (Ganesh Yerra et al., 2013).

## 2.4.2 CYTOKINY A CHEMOKINY

Makrofágy, neutrofilů, fibroblasty a krevní destičky uvolňují během hojení ran celou řadu cytokinů včetně interleukinů (IL), chemokinů (CXC) a růstových faktorů (Patel et al., 2016). Mezi prozánětlivé cytokiny, které jsou nejčastěji stanovovány během procesu hojení řadíme např. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 a TNF- $\alpha$  (Barrientos et al., 2008).

Během prvních 24 hodin po poranění je produkován cytokin TNF- $\alpha$ , který se podílí na přitahování neutrofilů a makrofágů do místa poranění (Han et al., 2001). Je také exprimován v hyperproliferativním epitelu na okraji rány. Přispívá ke stimulaci migrace fibroblastů a keratinocytů, expresi růstových faktorů a zvýšení antimikrobiální obrany. Zvýšená a prodloužená exprese TNF- $\alpha$  má negativní účinek na hojení, a to tím že potlačuje syntézu ECM a TIMP a zároveň zvyšuje syntézu MMPs. Po dokončení proliferační fáze hojení ran se TNF- $\alpha$  vrací na svou fyziologickou hladinu (Xu et al., 2013).

Ukázalo se, že jak TNF- $\alpha$ , tak IL-1 $\beta$  si navzájem udržují zvýšenou expresi, působí parakrině a zesilují tak zánětlivou reakci. IL-1 $\beta$  je také důležitý regulátor aktivity zánětu způsobených makrofágy, kde zabraňuje jejich polarizaci směrem k protizánětlivému fenotypu (Raziyeva et al., 2021).

Dalším prozánětlivým interleukinem, jehož produkce je zvýšena během hojení, je IL-6. Transkripce IL-6 je indukována řadou stimulů, jako jsou ligandy Toll-like receptoru (TLR), IL-1, TNF $\alpha$  a ROS, které jsou více exprimované v zánětlivé fázi hojení. Může být také produkován makrofágy a neutrofilů jako odpověď na specifické mikrobiální molekuly (PAMPs) (Hirano, 2021).

Rodina chemokinů CXC chemotaktických cytokinů CXCL1, CXCL5 a CXCL8 je nadměrně exprimována při poranění stimulací prozánětlivých cytokinů, jako je IL-1 a TNF- $\alpha$  nebo přítomností bakterií. Indukovaná exprese chemokinů přitahuje leukocyty, monocyty, neutrofilů a makrofágy do místa rány za účelem odstranění cizorodých částic

(Reinke & Sorg, 2012). Bylo prokázáno, že CXCL8 (neboli IL-8) hraje roli při reepitelizaci zvýšením migrace a proliferace keratinocytů (Barrientos et al., 2008).

### 2.4.3 METALOPROTEINÁZY A JEJICH INHIBITORY

MMPs je rodina enzymů, které ve své struktuře obsahují zinek. Degradují ECM a mají schopnost se účastnit fyziologických procesů buněčné migrace, růstu a zánětu během hojení ran (Martins et al., 2013). MMP jsou často vylučovány v neaktivní formě (proMMP), která je štěpena na aktivní formu proteinázami včetně jiných MMP. Za fyziologických podmínek jsou jejich hladiny velmi nízké, ale jejich exprese je transkripčně řízena zánětlivými cytokiny, růstovými faktory, hormony nebo mezibuněčnou interakcí. Jsou regulovány tkáňovými inhibitory metaloproteináz (TIMP). Rovnováha mezi MMP a TIMP (u hojení ran zejména TIMP-1 a TIMP-2) je velmi důležitá pro remodelaci ECM (Nagase et al., 2006).

MMP zasahují do všech fází hojení a jejich zvýšená exprese se v průběhu hojení mění. Do procesu hojení ran jsou zapojeny především MMP-1, MMP-2, MMP-8 a MMP-9. Intersticiální kolagenáza MMP-1, která štěpí intersticiální kolagen I, II a III na charakteristické 3/4 a 1/4 fragmenty, také štěpí proMMP-9 na jeho aktivní formu a je nadměrně produkována během zánětlivé fáze působením cytokinů, jako je TNF- $\alpha$  a IL-1 (Cui et al., 2017). V poraněné kůži je její produkce indukována především keratinocyty. Tyto hlavní buňky epidermis se váží prostřednictvím  $\alpha 2$  a  $\beta 1$  integrinů na kolagen typu I v dermis. Hladina neutrofilní kolagenázy MMP-8 se také zvyšuje v zánětlivé fázi hojení a je nezbytná pro debridement rány a pro štěpení poškozeného kolagenu typu I (Cabral-Pacheco et al., 2020).

Želatinázy (MMP-2 a MMP-9) hrají důležitou roli v angiogenezi a také buněčné migraci, která je nezbytná pro hojení ran. MMP-2 a MMP-9 snadno štěpí želatinu a také kolagen typu IV, V, XI a laminin. MMP-2 štěpí rovněž kolagen I, II a III podobným způsobem jako kolagenázy. MMP-2 se také účastní proteolýzy lamininu-5 během fáze remodelace (Cabral-Pacheco et al., 2020).

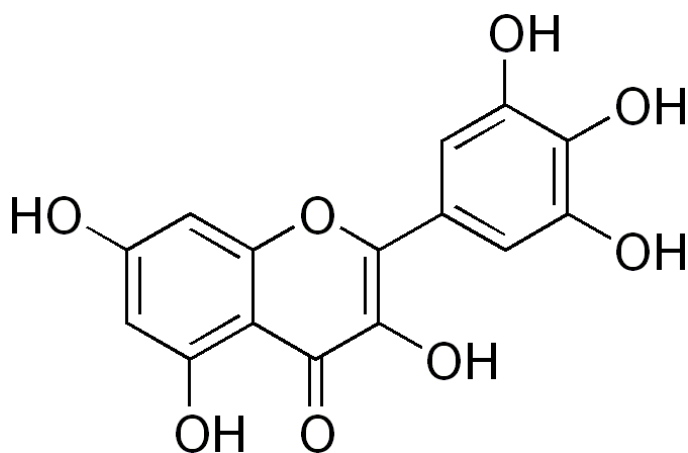


## 2.5 Vybrané přírodní látky podporující *in vitro* hojení rány

### 2.5.1 MYRICETIN

Myricetin (3, 5, 7, 3', 4', 5'-hexahydroxyflavonol, MYR) se řadí mezi flavonoidy, které se dále dělí na flavany, flavony, flavonoly a anthokyanidiny (**Obr. 5**), (Rauter et al., 2018).

MYR byl původně izolován z kůry stromu *Myrica rubra*. Čeleď Myricaceae, Polygonaceae, Primulaceae, Pinaceae a Anacardiaceae jsou nejbohatšími zdroji myricetinu (Imran et al., 2021). Běžně se také vyskytuje v bobulích, ovoci, zelenině, medu, červeném víně, čaji a dalších potravinách (Song et al., 2021). MYR je studován zejména kvůli svým protizánětlivým (Lee et al., 2007), (Lee & Lee, 2016), protinádorovým (Ma et al., 2019), antibakteriálním a antivirovým účinkům (Jiang et al., 2019). Také je studován jeho vliv na prevenci obezity (Hu et al., 2018) a kardiovaskulárních chorob (Wang et al., 2019). Nové studie ukazují, že MYR může inhibovat expresi IL-6, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  blokováním signální dráhy NF- $\kappa$ B (Kan et al., 2019). Také byl účinný při inhibici LPS-indukovaného zánětlivého poškození plic a srdce *in vivo* a *in vitro* (Zhang et al., 2018).



**Obr. 5:** Struktura myricetinu. Vytvořeno v programu ChemSketch.

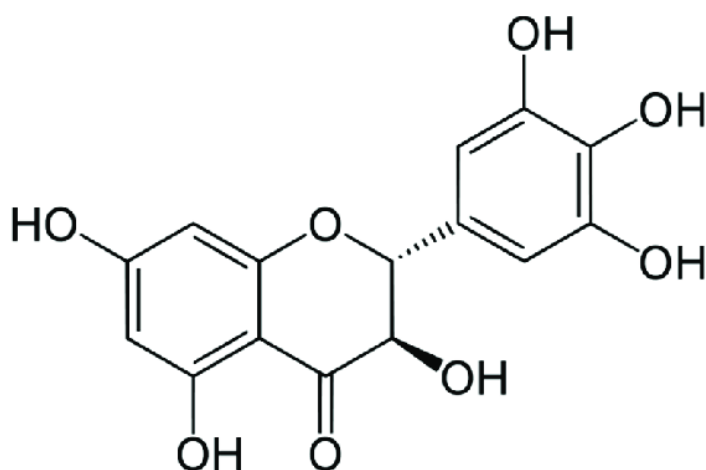
## 2.5.2 DIHYDROMYRICETIN

Dihydromyricetin (3,5,7,3',4',5'-hexahydroxy-2,3-dihydroflavonol; DHM; **Obr. 6**), také známý jako Ampelopsin je hlavní bioaktivní flavonoid izolovaný z tradiční čínské léčivé rostliny *Ampelopsis grossedentata* (Liu et al., 2019). Obsah DHM v *A. grossedentata* se pohybuje od 30 % do 40 %, což je považováno za nejvyšší obsah flavonoidů v rostlinách (Gao et al., 2015).

DHM je studován především pro své antioxidační, antimikrobiální, antivirové a protizánětlivé účinky. Současný výzkum také poukazuje na jeho terapeutické přínosy při léčbě onemocnění spojených s užíváním alkoholu (Li et al., 2017) a léčbě onemocnění SARS-CoV-2 (Xiao et al., 2021).

Bylo popsáno, že DHM inhibuje TNF- $\alpha$  indukovaný zánět prostřednictvím inaktivace signalizace NF- $\kappa$ B v buňkách HeLa. Konkrétně DHM defosforyluje a inhibuje degradaci I $\kappa$ B $\alpha$  a inaktivuje jadernou translokaci p65. Kromě toho DHM také snižuje expresi cílových genů NF- $\kappa$ B (Tang et al., 2016).

Studie DHM na LPS-indukovaných myších modelech plicní tkáně, rovněž potvrdily efekt DHM na snížení hladiny prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ ), potlačení aktivace NF- $\kappa$ B signální dráhy a zároveň zvýšení produkce protizánětlivého interleukinu IL-10. (Wang et al., 2018).

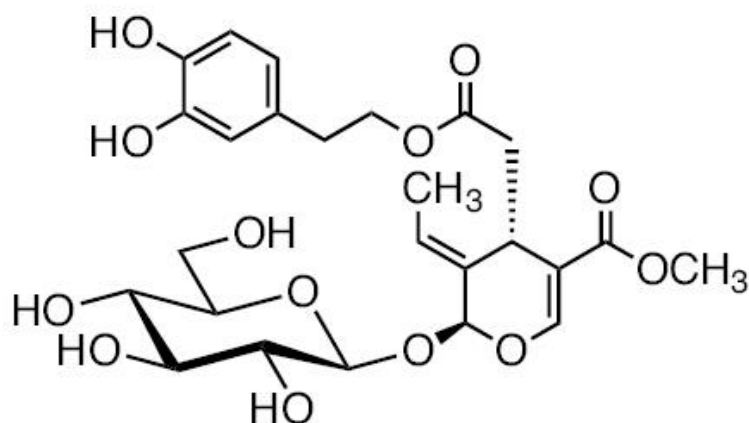


**Obr. 6:** Struktura dihydromyricetinu. Vytvořeno v programu ChemSketch.

### 2.5.3 OLEUROPEIN

Oleuropein (**Obr. 7**) je polyfenolická sloučenina patřící mezi sekoiridoidy, která se skládá se ze tří strukturních podjednotek: hydroxytyrosolu, kyseliny elenolové a molekuly glukózy (Ahmad et al., 2019). Oleuropein se přirozeně vyskytuje v olivách botanicky známých jako *Olea europaea*, olivovém oleji a listech olivovníku. V mladých olivách může dosáhnout koncentrací až 140 mg/g sušiny a v listech až 60–90 mg/g sušiny (Haris Omar, 2010). Vyskytuje se v glykosylovaných a neglykosylovaných formách, což mění jeho rozpustnost. V lipidové frakci (v olivovém oleji) převládá jeho neglykosylovaná forma (Romani et al., 2019).

Bylo prokázáno, že oleuropein má řadu pozitivních efektů na zdraví, mezi které řadíme jeho kardioprotektivní, protizánětlivé, antioxidační (Nediani et al., 2019) a protirakovinné účinky (Shamshoum et al., 2017). Oproti tomu se oleuropein vyznačuje nízkou rozpustností, vysokou citlivostí na podmínky prostředí (pH) a špatnými senzoryckými vlastnostmi, které snižují jeho využití. Proto bylo navrženo dodávat oleuropein za použití strukturovaných lipidových nosičů, které zlepšují podmínky během transdermálního transportu látky (Cristiano et al., 2021), (Allaw et al., 2021).



**Obr. 7:** Struktura oleuropeinu. Vytvořeno v programu ChemSketch.

## 2.5.4 OLEJ Z LENTIŠKU

Olej z lentišku (někdy se mu také říká z pistácie) patří mezi vzácné esenciální oleje. Je získáván z keře *Pistacia lentiscus* (běžně známý jako lentišek), který se nachází zejména ve středomoří. Hlavním produktem z této rostliny je právě lentiškový olej získávaný z bobulí a pryskyřice, která je vylučovaná nařezáváním kůry (Allaw et al., 2021). V této pryskyřici se prokázala přítomnost  $\alpha$ -pinenu,  $\beta$ -pinenu, limonenu, terpen-4-olu a terpineolu (Congiu et al., 2002). Olej z lentišku se skládá převážně z mononenasycených mastných kyselin (52,4 %), následují nasycené mastné kyseliny (26,4 %) a polynenasycené mastné kyseliny (21,2 %) (Poljšak et al., 2020). Tento olej byl analyzován také pomocí GC-MS a byla zjištěna přítomnost  $\alpha$ -pinenu, myrcenu, limonenu, seskviterpenu, ketonů a alifatických esterů a fenolických sloučenin (Douissa et al., 2005). Je také bohatý na minerální látky jako jsou Na, K, Ca, Mg, Fe a Cu (Wissal et al., 2013).

V přírodním léčitelství byl olej z lentišku ceněn zejména pro své antiseptické vlastnosti a používal se k léčbě ran a žaludečních vředů (Siano et al., 2020). Navíc bylo prokázáno, že tento esenciální olej vykazuje antioxidační, protizánětlivé a antimikrobiální účinky (Benhammou et al., 2008). Lentiškový olej a jeho hlavní složky  $\alpha$ -pinen a myrcen významně zvyšují hladinu transkripčního faktoru Nrf2 a jeho cílových antioxidačních genů. Také mají cytoprotektivní účinky. Bylo prokázáno, že chrání keratinocyty před poškozením vyvolaným působením peroxidu vodíku nebo UVB zářením a také zlepšují migraci buněk (Xanthis et al., 2021).

## 2.6 Kompozitní membrány podporující hojení kožních a kostních defektů

### 2.6.1 POLYKAPROLAKTONOVÉ MEMBRÁNY

PCL je důležitý polymer v oblastí tkáňového inženýrství díky svým mechanickým vlastnostem, kompatibilitě s velkým množstvím jiných polymerů a biologické rozložitelnosti (doba biologické rozložitelnosti se udává dle struktury materiálu na 12-36 měsíců). Je tvořen biologicky odbouratelnými polyesterem, mezi které patří polymery, jako je kyselina polyglykolová, polylaktid a jejich kopolymery. Teplota tání PCL je vyšší než tělesná teplota (59–64 °C) (Eftekhari et al., 2016).

PCL se ukázal jako preferovaný materiál pro regeneraci kostní tkáně díky biokompatibilitě a rychlosti resorpce. PCL membrány lze připravit pomocí elektrostatického zvlákňování, kdy vytváří nanovláknenné porézní matrice, které napodobují mnoho vlastností ECM, jako je poréznost a uspořádání vláken (Siddiqui et al., 2021). Pro aplikace tkáňového inženýrství je povrch PCL membrán často potažen hydrofilními přírodními molekulami, jako je želatina, fibronectin a proteoglykany, aby se zlepšila buněčná adheze a proliferace (Agrawal et al., 2018).

Pro zlepšení mechanických vlastností byly PCL membrány připraveny v kombinaci s chitosanem (vykazovaly větší hydrofilitu a vyšší termostabilitu) (Fadaie et al., 2018), s poly(laktid-ko-glykolidem) (PLGA) (podpora adheze a proliferace fibroblastů) (Hiep & Lee, 2010), s hydroxyapatitem (regulace osteoinduktivity a stimulace tvorby kosti) (Rajzer et al., 2021). Dalším materiálem, který byl použit k obohacení PCL membrán je biosklo (BG). BG je typ bioaktivního keramického materiálu obecně složeného ze  $\text{SiO}_2$ -CaO- $\text{P}_2\text{O}_5$  a  $\text{Na}_2\text{O}$  a jeho hlavní předností je vynikající bioaktivita a stimulace osteogeneze. Do tohoto materiálu je možné začlenit i antibakteriální kovové ionty (měď, zlato, zinek, stříbro) (Rajzer et al., 2019). Přídavek těchto iontů vede ke snížení nebo odstranění bakteriálních infekcí a následných komplikací po operacích kostních defektů. Výzkum se nyní zabývá i začleněním antibiotik do PCL membrán pro lepší kontrolu nad pooperační infekcí v průběhu hojení kostí (Wei et al., 2017).

## 2.6.2 HYALURONOVÉ MEMBRÁNY

Kyselina hyaluronová (HA) je jednou z hlavních složek ECM. Tento polysacharid je nesulfatovaný lineární glykosaminoglykan složený z opakujících se disacharidových jednotek  $\beta$ -D-N-acetylglukosaminu a  $\beta$ -(1,4)-D-glukuronové kyseliny. Vzhledem ke karboxylovým skupinám je HA záporně nabitá, vysoce hydrofilní a při vysokých molekulových hmotnostech tvoří viskózní gel. Bylo prokázáno, že vysokomolekulární HA (>900 kDa) vykazuje antioxidační a protizánětlivou aktivitu, zatímco nízkomolekulární degradační produkty HA (<120 kDa) mají opačný účinek (indukují prozánětlivé cytokiny) (Litwiniuk et al., 2016), (King & Sorooshian, 2020), (Aya & Stern, 2014). Navíc HA tvoří pericelulární obal kolem většiny buněk, kde plní funkci signální molekuly interagující s vazebnými proteiny a regulující buněčnou adhezi, migraci a proliferaci (Abatangelo et al., 2020).

Vzhledem k vlastnostem HA (jako je biokompatibilita, biologická odbouratelnost, schopnost hojení, tepelná stabilita a hydrofilní charakter) se používá k výrobě různých krytí na rány, jako jsou membrány a hydrogely (Graça et al., 2020).

Hyaluronové membrány mohou být použity na rány jako samostatné (avšak zesíťované), anebo zesíťované ve směsi s jinými polymery pro zlepšení jejich mechanických vlastností (Abdelrahman et al., 2020). Mezi nejpoužívanější polymery pro výrobu HA membrán řadíme chitosan, kolagen, alginát, polyvinylalkohol (PVA) a jejich modifikace. Tyto membrány mohou být rovněž obohaceny o bioaktivní složky nebo nanočástice, pro zlepšení jejich hojivých a antibakteriálních vlastností.

### 3 Cíle disertační práce

Cílem předkládané disertační práce bylo *in vitro* studium přírodních látek podporujících hojení kožních ran (myricetinu, dihydromyricetinu, oleuropeinu a oleje z lentišku) a kompozitních materiálů podporujících hojení kožních a kostních defektů.

#### Konkrétní cíle byly:

1. Studium vlivu myricetinu a dihydromyricetinu na proces hojení ran *in vitro*
  - Izolace lidských dermálních fibroblastů (NHDF) a lidských epidermálních keratinocytů (NHEK)
  - Příprava *in vitro* modelu kožní rány (monovrstva škrábnutých kožních buněk infikovaná LPS).
  - Stanovení cytotoxicity MYR a DHM
  - Stanovení produkce vybraných transkripčních faktorů (NFκB, Nrf2) a zánětlivých markerů (COX-2, IL-6, IL-8)
  - Stanovení MMP-1, MMP-2 a TIMP-1, které se účastní procesu hojení
  - Stanovení anti-glykační aktivity MYR a DHM
  
2. Studium vlivu oleuropeinu a oleje z lentišku na proces hojení ran *in vitro*
  - Izolace NHDF
  - Příprava *in vitro* modelu kožní rány (monovrstva škrábnutých kožních buněk stimulovaná LPS).
  - Stanovení cytotoxicity oleuropeinu a oleje z lentišku
  - Hodnocení rychlosti uzavírání rány *in vitro*
  - Stanovení produkce vybraných markerů (IL-6, IL-8, MMP-1, MMP-2)
  
3. Studium biokompatibility kompozitních membrán *in vitro*
  - Testování cytotoxicity PCL membrán na buněčné linii SaOS-2
  - Testování cytotoxicity hyaluronových membrán na buněčné linii SaOS-2 a lidských dermálních fibroblastech
  - Studium biokompatibility vybraných kompozitních membrán s využitím fluorescenční mikroskopie

## 4 Experimentální část

### 4.1 Chemikálie, přístroje, materiál

#### 4.1.1 CHEMIKÁLIE

Adenin, aminoguanidin, amoniak ( $\text{NH}_3$ ), akridinová oranž, akrylamid/bis-akrylamid, amfotericin B, aminokyseliny (L-histidin, L-izoleucin, L-metionin, L-tryptofan, L-tyrozin), ampicilin, apotransferrin, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS substrát), barvicí roztok Ponceau S, bromfenolová modř, Coomassie Brilliant Blue G, dimetylsulfoxid (DMSO), 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid (MTT), dodecylsírán sodný (SDS), Dulbeccem modifikované Eaglovo médium (DMEM) a epidermální růstový faktor (EFG) byly zakoupeny od firmy Merck (Waltham, USA). EpiLife médium bylo dodáno firmou Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Fenylmetansulfonyl fluorid (PMSF), fetální hovězí sérum – tepelně inaktivované (FBS), fluorescein diacetát (FDA), glukóza, glycerol, HAM F12 médium, Hesper, hovězí sérový albumin (BSA) byly dodány firmou Merck (Waltham, USA). Hydrogenfosforečnan draselný ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), hydrogenfosforečnan sodný heptahydrát ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ), hydroxid sodný (NaOH), hydrokortizon, chlorid draselný (KCl), chlorid sodný (NaCl), insulin, KBM-2 bazální médium a keratinocytový růstový faktor (KGF) byly pořízeny od firmy Merck (Waltham, USA). Keratinocytové růstové suplementy (HKGS) byly zakoupeny od firmy Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). KGM-2 SingleQuots suplementy byly zakoupeny od firmy East Port Praha s.r.o. (Praha, Česká republika). Kyselina chlorovodíková (HCl), LPS z membrány gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, metanol, methylglyoxal, paraformaldehyd (4 %), peroxodisíran amonný (APS), propidium jodid (PI) byly dodány firmou Merck (Waltham, USA). Primární protilátky – polyklonální: kozí anti- $\beta$ -aktin (sc-1616), králičí anti-COX-2 (sc-7951), králičí anti-MMP-2 (sc-10736) králičí anti-NF- $\kappa$ B p65 (sc-372), králičí anti-Nrf2 p65 (sc-722). Sekundární protilátky – polyklonální kozí IgG protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) rozpoznávající králičí (sc-2004) a králičí proti kozí (sc-2922) byly zakoupeny od firmy



Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Protílátka Alexa Fluor 555 faloidin byla zakoupena od firmy Cell Signaling Technology (Praha, Česká republika). SlowFade Golg Antifade Mountant medium s DAPI bylo zakoupeno od firmy Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Roztok 10 000 U/ml penicilinu s 10 mg/ml streptomycinu (P/S), N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED), 3,3',5,5'tetramethylbenzidin (TMB substrát), 3,3,5-trijodo-L-tyronin, Triton X-100, trypanová modř, trypsin/etylendiamintetraoctová kyselina (trypsin/EDTA; 0,25 %) a Tween 20 byly dodány firmou Merck (Waltham, USA). Fixovaný olej z lentišku poskytla společnost Mediflora (Pula, Itálie), oleuropein (> 80 % podle HPLC) byl zakoupen od Merck (Waltham, USA). Fosfolipidy (S75), směs fosfolipidů ze sóji (70 % fosfatidylcholinu a 9 % fosfatidylethanolaminu a 3 % lysofosfatidylcholinu) poskytla firma Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Německo).

#### **4.1.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ**

Analytické váhy A&D GR-202 EC (Schoeller Instruments, Česká republika)  
Automatická promývačka mikrotitračních destiček Hydroflex TECAN (Schoeller Instruments, Česká republika)  
Box laminární THERMO MSC 12 A Advantage (Merci, Česká republika)  
Centrifuga Hettich® MIKRO 220R (Hettich Zentrifugen, Německo)  
Centrifuga Hettich® ROTINA 38R (Hettich Zentrifugen, Německo)  
Centrifuga Labofuge 400 (Heraeus, Německo)  
Centrifugy MiniSpin® (Eppendorf, Německo)  
Fluorescenční mikroskop Olympus BX40 (Olympus, Česká republika)  
Fluorescenční konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 780 (Zeiss, Německo)  
Hlubokomrazicí box -86 °C skříňový Panasonic Health Care Biomedical (Schoeller Instruments, Česká republika)  
Incubátor Cellstar (Queue System, USA)  
Lázeň vodní třepací OLS 200 (Grant Instruments Ltd, Velká Británie)  
Míchačka magnetická s ohřevem IKA RH Digital (Merci, Česká republika)  
Mikroskop laboratorní Olympus CK2 inverzní mikroskop (Olympus, Česká republika)  
pH metr HI-2211 Bench Top pH/mV Meter (Hanna Instruments, Česká republika)

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

Třepačka Duomax 1030 (Heidolph Instruments, Německo)

Zařízení pro přípravu deionizované vody Ultrapur (Watrex, Česká republika)

### **4.1.3 OSTATNÍ LABORATORNÍ MATERIÁL**

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

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

Injekční stříkačky INKJET 20 ml BRAUN (BRAUN, Německo)

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

Thermo Scientific™Nunc Nunclon™ kultivační láhve 25 cm<sup>2</sup> /75 cm<sup>2</sup>, Petriho misky, 6, 24, 48 a 96-jamková mikrotitrační destička, plastová pipeta 5, 10 a 25 ml, zkumavka centrifugační 50 ml, mikrozukavky Eppendorf a 8 jamkový Nunc™ Lab-Tek™ II CC2™ Chamber slide (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)

### **4.1.4 ROZTOKY**

#### **Fosfátový pufru (PBS)**

10× PBS: NaCl (0,137 mol/l), KCl (0,00268 mol/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,00896 mol/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,00147 mol/l), pro experimenty byl používán sterilní a 10× ředěný (1× PBS)

#### **Roztoky pro izolaci a kultivaci kožních buněk**

**Transportní roztok pro kůže:** 60 ml PBS, 2 ml směsi antibiotik (amfotericin B (1,25 mg/ml), penicilin (500 mg/ml), streptomycin (500 U/ml))

**Médium pro kůže:** médium DMEM/HAM F12 v poměru 3:1 s přidavkem 10 % FBS a uvedenými suplementy ve finálních koncentracích (adenin 26,4 µg/ml; ATB (směs 0,125 µg/ml amfotericinu B; penicilin 100 mg/ml; streptomycin 100 U/ml); EGF 1 ng/ml; hydrokortizon 0,8 µg/ml; inzulin 0,12 U/ml; trijodtyronin 0,136 µg/ml; apotransferin 5 µg/ml)

**Rozvolnění epidermis:** 0,25 % trypsin v EDTA

**Médium pro izolaci NHEK z epidermis:** bazální médium KBM-2 s přidavkem KGM-2 SingleQuots

**Roztok A:** pufrovaný fyziologický roztok pH = 7,4; glukóza (0,01 mol/l), NaCl (0,13 mol/l), KCl (0,003 mol/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,001 mol/l), Hepes (0,03 mol/l)

**Zastavovací roztok:** roztok A + 2 % FBS

**Médium pro kultivaci NHEK:** základní médium EpiLife s HKGS a antibiotiky (penicilin, 50 U/ml; streptomycin, 50 µg/ml; ampicillin 0,25 µg/ml)

**Experimentální médium pro NHEK:** základní médium EpiLife s aminokyselinami (L-histidin; L-izoleucin; L-metionin; L-tryptofan; L-tyrozin ve finálních koncentracích 0,05 g/l; 0,1 g/l; 0,014 g/l; 0,009 g/l; 0,014 g/l), hydrokortizonem (finální koncentrace 0,2 mg/l) a 1 % P/S

**Médium pro kultivaci NHDF:** médium DMEM s 10 % FBS s 1 % P/S (penicilin 100 mg/ml; streptomycin 100 U/ml)

**Experimentální médium pro NHDF:** médium DMEM s 1 % P/S (penicilin 100 mg/ml; streptomycin 100 U/ml)

### **Roztoky pro kultivaci buněk SaOS-2**

**Kultivační médium:** McCoy's medium s 10 % FBS a 1 % P/S (penicilin 100 mg/ml; streptomycin 100 U/ml)

**Médium pro experimenty:** McCoy's medium s 1 % P/S (penicilin 100 mg/ml; streptomycin 100 U/ml)

### **Roztoky pro elektroforézu a western blot**

roztok pro separační gel (1,5 mol/l Tris-HCl; pH = 8,8), roztok pro zaostřovací gel (0,5 mol/l Tris-HCl; pH = 6,8), 10 % SDS, 10 % APS, 40 % akrylamid/bis-akrylamid (29:1), N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED), 10 × TBS (0,25 mol/l Tris báze, 2 mol/l NaCl; pH = 7,5), TBS-T (1 × TBS + 0,1 % Tween-20), vzorkovací pufr (0,125 mol/l Tris-HCl, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0,2 mol/l DTT, 0,02 % bromfenolová modř; pH = 6,8), Ponceau S (0,1 % Ponceau S, % kyselina octová), 5 % BSA v TBS, 5 % nízkotučné mléko v TBS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS substrát) společně s 10 × Tris/Glycin/SDS pufrem a 10 × transferovým pufrem pro semi-dry blotovací systém byly zakoupeny od firmy Merck (Waltham, USA).

### **Roztoky pro ELISA**

PBS, promývací pufr (0,05 % Tween-20 v PBS), blokovací pufr (1 % BSA v PBS), ředící pufr (0,05 % Tween-20 + 0,1 % BSA v PBS), ABTS substrát (Merck, Waltham, USA), 3,3',5,5'tetramethylbenzidin (TMB) substrát (Merck, Waltham, USA), zastavovací roztok 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### **Reakční kity pro ELISA**

Human IL-6 ELISA Development Kit (900-K16), (PeproTech, Velká Británie)

Human IL-8 ELISA Development Kit (900-K18), (PeproTech, Velká Británie)

Human Total MMP-1 DuoSet ELISA (DY901B-05), (R&D Systems, USA)

Human Total MMP-2 DuoSet ELISA (DY902), (R&D Systems, USA)

Human Total TIMP-1 DuoSet ELISA (DY970-05), (R&D Systems, USA)

### **Roztoky pro fluorescenční barvení**

PBS, fixační roztok: 4 % paraformaldehyd, permeabilizační roztok: 0,1 % Triton X-100 v PBS, blokovací roztok: 3 % BSA v PBS, 0,01 % Akridinová oranž, Fluorescein diacetát (5 mg/ml v acetonu), Propidium jodid (2 mg/ml v PBS), Alexa Fluor 555 faloidin (zásobní roztok 6,6 μM, ředění 1:20 v PBS)

## **4.2 Testovaný materiál**

### **4.2.1 MYRICETIN (MYR) A DIHYDROMYRICETIN (DHM)**

MYR (TCI, Japonsko, čistota 97 %, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)

DHM (APIChem, čistota 98 %, Čínská lidová republika, Hangzhou APIChem Technology Co., Ltd)

Vzorky MYR a DHM byly připraveny rozpuštěním v dimethylsulfoxidu (DMSO). Zásobní roztok měl koncentraci 100 mM. Jednotlivé vzorky byly před experimentem naředěny v médiu bez séra na finální koncentrace: 5 μM, 10 μM a 15 μM.

## 4.2.2 OLEUROPEIN A OLEJ Z LENTIŠKU

Fixovaný olej z lentišku poskytl společnost Mediflora (Pula, Itálie), oleuropein (> 80 % podle HPLC) byl zakoupen od firmy Merck (Waltham, USA). Fosfolipidy (S75), směs fosfolipidů ze sóji (70 % fosfatidylcholinu a 9 % fosfatidylethanolaminu a 3 % lysofosfatidylcholinu) poskytla firma Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Německo).

Jednotlivé vzorky byly připraveny na Ústavu životního prostředí, Univerzity v Cagliari. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v *Tabulce 1*.

Vzorek	S75 (mg/ml)	Oleuropein (mg/ml)	Olej z lentišku (mg/ml)	Tween (mg/ml)	Kyselina hyaluronová (mg/ml)	Voda (ml)
Liposomy	180	20	75	--	--	1
Transfersomy	180	20	75	7,5	--	1
Hyalurosomy	180	20	75	--	1	1
Hyalutransfersomy	180	20	75	7,5	1	1

*Tabulka 1: Složení liposomů, transfersomů, hyalurosomů a hyalutransfersomů*

## 4.2.3 KOMPOZITNÍ PCL MEMBRÁNY

Jednotlivé PCL membrány byly připraveny na Katedře materiálového inženýrství, ATH Univerzita Bielsko-Biala, Bielsko-Biala v Polsku.

Byly testovány 3 druhy membrán připravených metodou elektrostatického zvláknování: (1) PCL, (2) PCL-BG a (3) PCL-BG Zn (Rajzer et al., 2023).

#### 4.2.4 KOMPOZITNÍ BIOFILMY

Nanokompozitních biofilmy byly připraveny v CEITEC (Středoevropský technologický institut), Vysoké učení technické v Brně v České republice.

Biofilmy z hyaluronanu (HA) a částečně deacetylovaných chitinových nanovláken (ChNWs) byly připraveny metodou lití a odpařování. Tyto biofilmy byly testovány v různých poměrech HA/ChNWs (HA/ChNWs 1:0,1; HA/ChNWs 1:10; HA/ChNWs 1:35; HA/ChNWs 1:50) spolu s kontrolními biofilmy (Net ChNWs a Net HA film), (Abdelrahman et al., 2020).

Dále byly připraveny biofilmy z HA a polyvinyl alkoholu (PVA), případně HA, PVA a nanočásticemi ZnO (Abdel-Rahman et al., 2022). Tyto biofilmy byly testovány v různých poměrech PVA/HA a PVA/HA/ZnO viz. *Tabulka 2.*:

<b>Biofilm</b>	<b>Poměr mezi PVA to HA</b>	<b>Objemová frakce ZnO nanočástic</b>
<b>PVA film</b>	100/ 0	0
<b>PVA/HA (80/20)</b>	80/20	0
<b>PVA/HA (60/40)</b>	60/40	0
<b>PVA/HA (40/60)</b>	40/60	0
<b>PVA/HA/ZnO 1</b>	40/60	0,001
<b>PVA/HA/ZnO 2</b>	40/60	0,005
<b>PVA/HA/ZnO 3</b>	40/60	0,01
<b>PVA/HA/ZnO 4</b>	40/60	0,05
<b>PVA/HA/ZnO 5</b>	40/60	0,1

*Tabulka 2: Složení PVA biofilmů s hyaluronanem a nanočásticemi zinku*

### **4.3 Postup izolace a kultivace buněk**

Normální lidské dermální fibroblasty (NHDF) a normální lidské epidermální keratinocyty (NHEK) byly izolovány ze vzorků kožní tkáně po estetických operacích na Oddělení Plastické a estetické chirurgie ve FN Olomouc. Kůže zdravých dobrovolníků, kteří podepsali informovaný souhlas byla odebírána při redukci prsní tkáně nebo při abdominoplastice. Studie byla schválena etickou komisí FN a LF UP Olomouc (Ref. č. 41/09) a byla prováděna v souladu s etickými standardy. Morfologie primárních buněčných kultur byla ověřena na Ústavu histologie a embryologie LF UP Olomouc

#### **4.3.1 IZOLACE A KULTIVACE LIDSKÝCH DERMALNÍCH FIBROBLASTŮ**

Vzorky kůže byly odebrány na chirurgickém sále Oddělení Plastické a estetické chirurgie ve FN Olomouc, kde byly vloženy do transportního roztoku (60 ml PBS, 2 ml směsi antibiotik (amfotericin, penicilin, streptomycin)), ve kterém byly ponechány jednu hodinu. V laboratoři, ve sterilním boxu byla kůže promyta PBS a nastříhána na čtverce o rozměrech 0,5-1 cm<sup>2</sup>, které byly přeneseny na Petriho misku o průměru 90 mm (4 ks na misku). Kultivace probíhala za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % relativní vlhkost vzduchu) v médiu pro kůže, které bylo měněno dvakrát týdně a umožňovalo růst NHDF.

Jakmile bylo dno Petriho misky se vzorky kůže pokryto NHDF, byla provedena jejich izolace. Médium bylo odstraněno, vzorky kůže byly přeneseny na novou Petriho misku a monovrstva NHDF byla opláchnuta PBS. Pro uvolnění adheovaných buněk byl přidán trypsin/EDTA. Po uvolnění buněk bylo přidáno médium pro kultivaci NHDF. Tato suspenze buněk byla přenesena do kultivační láhve (75 cm<sup>2</sup>).

NHDF byly kultivovány za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % relativní vlhkost vzduchu), médium bylo měněno každé 3 dny. Jejich pasáž při 90 % konfluenci buněk byla provedena stejným způsobem jako v případě jejich izolace. Pro experimenty byly použity buňky ve 2.-8. pasáži (Franková et al., 2016), (Sklenářová et al., 2021).

### **4.3.2 IZOLACE A KULTIVACE LIDSKÝCH EPIDERMALNÍCH KERATINOCYTŮ**

Ze vzorků kůže, které byly vytaženy z transportního roztoku a promyty PBS byly nastříhány drobné kousky (o průměru cca 0,3 cm<sup>2</sup>) pro izolaci NHEK. Tyto kousky kůže byly vloženy do 0,25 % roztoku trypsinu v EDTA a ponechány 24 hodin při 4 °C. Takto rozvolněná epidermis byla oddělena pomocí pinzety od dermis a přenesena do média pro izolaci suplementovaného 2 % FBS. Po celou dobu izolace bylo nutné pracovat na ledě a se studenými roztoky. Buňky byly pipetou rozsuspendovány, přefiltrovány přes buněčné sítko (Cell Strainer 40 μm) a centrifugovány (1300 rpm; 10 min; 4 °C). Supernatant byl odstraněn, pelet NHEK byl rozsuspendován ve vychlazeném médiu (10 ml) pro izolaci keratinocytů a přenesen do malé kultivační lahve (25 cm<sup>2</sup>) s přídatkem 25 μl FBS. NHEK byly kultivovány za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % relativní vlhkost vzduchu). Třetí den bylo izolační médium nahrazeno médiem kultivačním, které bylo vyměňováno každý druhý den. Po dosažení 80 % konfluence byly buňky pasážovány. Kultivační médium bylo odstraněno, buňky byly opláchnuty roztokem A uvolněny ze dna kultivační lahve pomocí roztoku trypsin/EDTA. Účinek trypsinu byl přerušen pomocí zastavovacího roztoku A. Suspenze NHEK byla centrifugována (1300 rpm; 10 min; 4 °C), vzniklý pelet byl rozsuspendován v kultivačním médiu s přídatkem 25 μl FBS. Následně byla suspenze NHEK přenesena do kultivační lahve (75 cm<sup>2</sup>), doplněna kultivačním médiem a kultivována za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % relativní vlhkost vzduchu). Kultivační médium bylo vyměňováno každý druhý den (Franková et al., 2016).

### **4.3.3 KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE SaOS-2**

Lidská buněčná linie SaOS-2 (osteoblastická osteosarkoma, č. 89050205) byla zakoupena od ECCAC (The European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Velká Británie).

Buněčná linie SaOS-2 byla kultivována v kultivačním médiu pro SaOS-2 za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % relativní vlhkost vzduchu). Médium bylo měněno každých 48 hodin. Po dosažení 80 % konfluence byly buňky



pasážovány. Kultivační médium bylo odstraněno, buňky byly opláchnuty sterilním PBS, uvolněny roztokem trypsin/EDTA resuspendovány v 10 ml média a centrifugovány 5 minut při 1300 rpm a pokojové teplotě. Pelet buněk byl resuspendován v kultivačním médiu, následně byla suspenze SaOS-2 přenesena do kultivační lahve (75 cm<sup>2</sup>), doplněna kultivačním médiem a kultivována za standardních podmínek. Pro experimenty byly buňky využity ve 3.-10. pasáži (Pivodova et al., 2013).

#### **4.4 Experimentální in vitro modely hojení ran**

##### **4.4.1 IN VITRO MODEL ZÁNĚTU RÁNY**

Experimentální model byl tvořen monovrstvou škrábnutých kožních buněk (NHEK nebo NHDF). Buňky byly vysety ve 3. pasáži na Petriho misku (ø 90 mm) a ponechány růstu v kultivačním médiu do 100 % konfluence. Simulace rány byla vytvořena škrábnutím konfluentní monovrstvy NHEK, resp. NHDF pomocí 10 ml sterilní plastové pipety. Následně byly buňky opláchnuty pomocí sterilního PBS. Zánět v ráně byl indukován přidáním média pro experimenty (bezsérového) s přidáním LPS (*Pseudomonas aeruginosa*, finální koncentrace 10 µg/ml) po dobu 6 hodin (Juráňová et al., 2019), (Sklenářová et al., 2021).

Na připravený *in vitro* model zánětu rány byly aplikovány sub-toxické koncentrace MYR, DHM (Sklenářová et al., 2021), oleuropeinu a oleje z lentišku (Sklenarova et al., 2023).

##### **4.4.2 RÝHOVÝ TEST**

Experimentální model byl tvořen monovrstvou škrábnutých NHDF. Buňky byly vysety ve 2. - 4. pasáži na 6-jamkovou desku a ponechány růst v kultivačním médiu do 100 % konfluence. Simulace rány byla vytvořena škrábnutím konfluentní monovrstvy NHDF pomocí 5 ml sterilní plastové pipety. Následně byly buňky opláchnuty pomocí sterilního PBS.

Rychlost buněčné migrace vedoucí k uzavření rány byla pozorována pod světelným mikroskopem s 10× objektivem, zachycujícím snímky v plánovaných časových intervalech (0, 24 a 48 hodin). Pořízené snímky byly kvantifikovány pomocí ZEN 3.3 blue edition (Carl Zeiss) měřením oblasti rány. Migrace buněk byla vyjádřena jako procento uzavření rány:  $WC\% = [(a_0 - a_{\Delta}) / a_0] \times 100$ , kde  $a_0$  je poraněná oblast bezprostředně po poškrábání a  $a_{\Delta}$  je poraněná oblast měřená 24 a 48 hodin po poškrábání.

Pro sledování rychlosti uzavírání rány *in vitro* byly na škrábnuté NHDF aplikovány testované látky (oleuropein a olej z lentišky) v subtoxických koncentracích. NHDF kultivované pouze v médiu byly použity jako kontrola (Sklenarova et al., 2023).

## 4.5 Metody

### 4.5.1 STANOVENÍ VIABILITY – MTT TEST

Žlutá tetrazoliová sůl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) je redukována mitochondriálními dehydrogenázami metabolicky aktivních buněk na fialový formazan, který je vhodný ke spektrofotometrickému stanovení.

Roztok MTT byl naředěný 1:10 s médiem pro experimenty a aplikován na buňky (100  $\mu$ l). Následně po 4 hodinách bylo médium s MTT odsáto a bylo přidáno 100  $\mu$ l DMSO s 1 % amoniaku. Po rozpuštění fialových krystalů byla změřena absorbance při 540 nm.

### 4.5.2 WESTERN BLOT

Western blot byl použit k detekci proteinů NF- $\kappa$ B, Nrf-2, COX-2, MMP-2 a  $\beta$ -aktinu po jejich elektroforetické separaci.

Nejprve byla stanovena koncentrace proteinu v celkovém buněčném lyzátu, spektrofotometricky ( $\lambda_{max} = 540$  nm) pomocí Bradfordova činidla. Jednotlivé vzorky byly naředěny vzorkovacím pufrem v poměru 4:1, povařeny 5 minut a ochlazeny na ledu.

Před elektroforézou byly temperovány na 37 °C a byly naneseny (40 µg proteinu) na 10 % SDS-polyakrylamidový gel (SDS-PAGE) a separovány v elektrickém poli podle své molekulové hmotnosti. Následně byly proteiny přeneseny na membránu z polyvinylidenfluoridu (PVDF), která byla blokována vůči nespecifickým interakcím s protilátkami v 5 % netučném mléku v TBS/T nebo v 5 % BSA v TBS/T (u detekce MMP-2) po dobu 2 hodin. Primární protilátky vůči sledovanému proteinu byly ředěny 1:500 (v 5 % netučném mléku v TBS/T (NF-κB, Nrf-2, COX-2 a β-aktin) nebo 5 % BSA v TBS/T (MMP-2)) a inkubovány přes noc (4 °C). Následující den byly membrány promývány 30 minut v TBS/T a následně inkubovány se sekundární protilátkou (enzymově značená křenuvou peroxidázou (HRP), inkubace 1,5 hodiny, ředění 1:10000 ve 2,5 % netučném mléku nebo BSA v TBS/T). Po promytí v TBS/T byl použit chemiluminiscenční substrát (Western Blotting Luminol Reagent kit; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA), který vizualizoval analyzovaný protein na fotografický film. Intenzita signálu byla denzitometricky kvantifikována pomocí ImageJ softwaru (1.48v; National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA).

### **4.5.3 ELISA**

Koncentrace interleukinů IL-6 a IL-8 byla stanovena v buněčném médiu pomocí ELISA Development kitu (PeproTech; Londýn, Velká Británie). Při analýze bylo postupováno dle protokolu výrobce.

Koncentrace metaloproteináz MMP-1 a MMP-2 a inhibitoru TIMP-1 byla stanovena v buněčném médiu pomocí následujících kitů: Human Total MMP-1 DuoSet ELISA, Human Total MMP-2 DuoSet ELISA a Human Total TIMP-1 DuoSet ELISA (R&D Systems, USA). Při stanovení koncentrace proteinů bylo postupováno dle protokolu výrobce.

## 4.5.4 ANTI-GLYKAČNÍ AKTIVITA

Fluorescenční spektroskopie je široce používanou metodou pro identifikaci a měření glykačních nebo anti-glykačních aktivit. Tato metoda je založena na detekci fluorescence AGE ve struktuře proteinu při vlnových délkách  $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$  350/420 nm. Glykace byla provedena inkubací BSA a testovaných látek (MYR, DHM) v přítomnosti 100  $\mu$ M methylglyoxalu po dobu 48 hodin při 37 ° C.

Intenzita fluorescence byla hodnocena v koncentračním rozmezí vzorků MYR a DHM (1-50  $\mu$ M s 5 mg/ml BSA v 0,1 M PBS (pH 7,4)) při 420 nm po excitaci při 350 nm pomocí čtečky fluorescenčních mikrodestiček (Tecan Infinite M200 PRO, Schoeller Instruments, Česká republika) při laboratorní teplotě (integrační čas 20  $\mu$ s; excitační šířka pásma 9 nm; emisní šířka pásma 20 nm). Podrobněji viz. (Yanagisawa et al., 1998).

## 4.5.5 FLUORESCENČNÍ BARVENÍ

### 4.5.5.1 Barvení živých/mrtvých buněk

Po kultivaci buněk (SaOS-2 a NHDF v koncentraci  $3 \times 10^5$  buněk/ml) bylo odsáto médium z jamek Chamber slidu a buňky byly opláchnuty PBS. Barvicí roztok byl připraven vždy čerstvý z 5 ml média pro experimenty, 8  $\mu$ l FDA (koncentrace 5mg/ml v acetonu) a 50  $\mu$ l PI (2 mg/ml v PBS). Barvení probíhalo po dobu 5 minut, při laboratorní teplotě a bez přístupu světla. Následně byl barvicí roztok odsát a buňky byly třikrát promyty PBS. Buňky byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX40 (Praha, Česká republika).

### 4.5.5.2 Barvení akridinovou oranží

Pro stanovení viability a biokompatibility SaOS-2 na PCL kompozitních membránách bylo použito barvení 0,01 % roztokem akridinové oranžiči. Zásobní roztok akridinové oranžiči byl připraven v 1 % koncentraci (v PBS) a dále naředěn pomocí PBS. Buňky na kompozitních membránách byly opláchnuty PBS, barveny 1 minutu 0,01 % akridinovou oranžiči a 5krát dobře opláchnuty PBS. Membrány byly opatrně

pinzetou přeneseny na mikroskopické sklíčko a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX40 (Praha, Česká republika).

#### **4.5.5.3 Barvení cytoskeletu Alexa faloidin 555 a jádra DAPI**

Pro stanovení adheze a biokompatibility SaOS-2 na PCL kompozitních membránách bylo použito barvení cytoskeletu Alexa faloidin 555 a jádra DAPI. SaOS-2 byly zafixovány na membránách pomocí 4 % paraformaldehydu po dobu 15 minut. Následně byly buňky permeabilizovány 10 minut 0,1 % Tritonem X-100 v PBS, blokovány 20 minut v 3 % BSA v PBS a barveny 15 minut Alexa faloidin 555 (ředění 1:20 v PBS). Buňky na membránách byly následně třikrát opláchnuty PBS. Na každý vzorek byla aplikována kapka SlowFade Golg Antifade Mountant medium s DAPI. Membrány byly opatrně pinzetou přeneseny na mikroskopické sklíčko a pozorovány pod fluorescenčním konfokálním mikroskopem Carl Zeiss LSM 780 (Zeiss, Německo).

## **4.6 Statistická analýza**

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

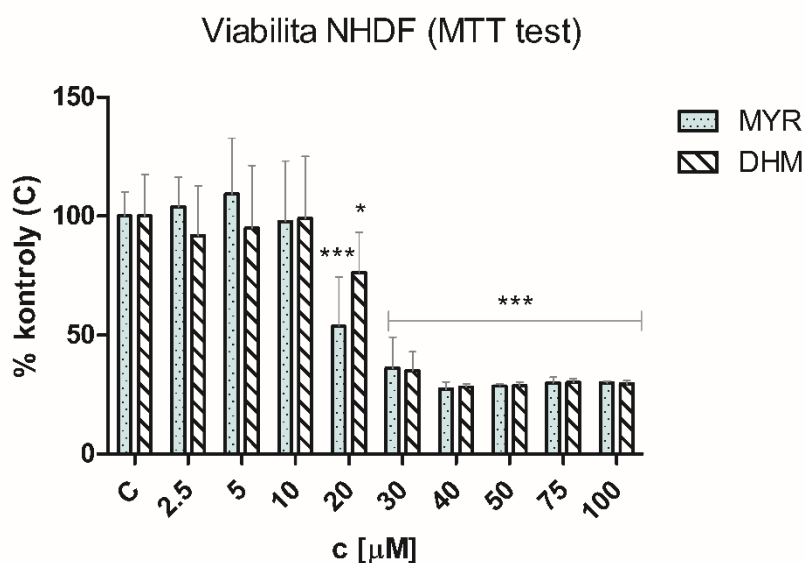
Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu MS Excel 2019 (Microsoft, USA) a Studentovým t-testem na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

## 5 Výsledky

### 5.1 Efekt myricetinu a dihydromyricetinu na proces hojení ran *in vitro*

#### 5.1.1 HODNOCENÍ BUNĚČNÉ VIABILITY

Před vlastním experimentem byla stanovena viabilita buněk NHDF po 24hodinové inkubaci s MYR a DHM. Viabilita byla hodnocena pomocí testu MTT, který měřil mitochondriální redukci MTT na nerozpustný purpurový formazan. Na základě výsledků MTT testu byly zvoleny sub-toxické koncentrace (5, 10 a 15  $\mu\text{M}$  MYR a DHM). Vyšší koncentrace byly považovány za toxické. Například 20  $\mu\text{M}$  koncentrace MYR způsobila snížení životaschopnosti buněk o 46 % a v případě DHM o 24 %. Koncentrace v rozmezí od 30-100  $\mu\text{M}$  MYR a DHM způsobily snížení životaschopnosti buněk o 70 % (Obr. 8).



**Obr. 8:** Vliv MYR a DHM na viabilitu NHDF. \*  $P < 0,05$  a \*\*\*  $P < 0,001$  byly považovány za statisticky významné ve srovnání s kontrolou (C). Jako kontrola (C) byly NHDF kultivované v médiu pro experimenty. Počet měření:  $n = 6$ .

### 5.1.2 STANOVENÍ ZVOLENÝCH MARKERŮ (NF- $\kappa$ B, Nrf2, COX-2, MMP-2) V BUNĚČNÉM LYZÁTU METODOU WESTERN BLOT

Vliv MYR a DHM na regulaci zánětlivých proteinů (COX-2, MMP-2) a významných transkripčních faktorů (NF- $\kappa$ B, Nrf2), které se zapojují do iniciace zánětlivé odpovědi byl analyzován v buněčném lyzátu NHDF (*Obr. 9*) a NHEK (*Obr. 10*) metodou Western blot.

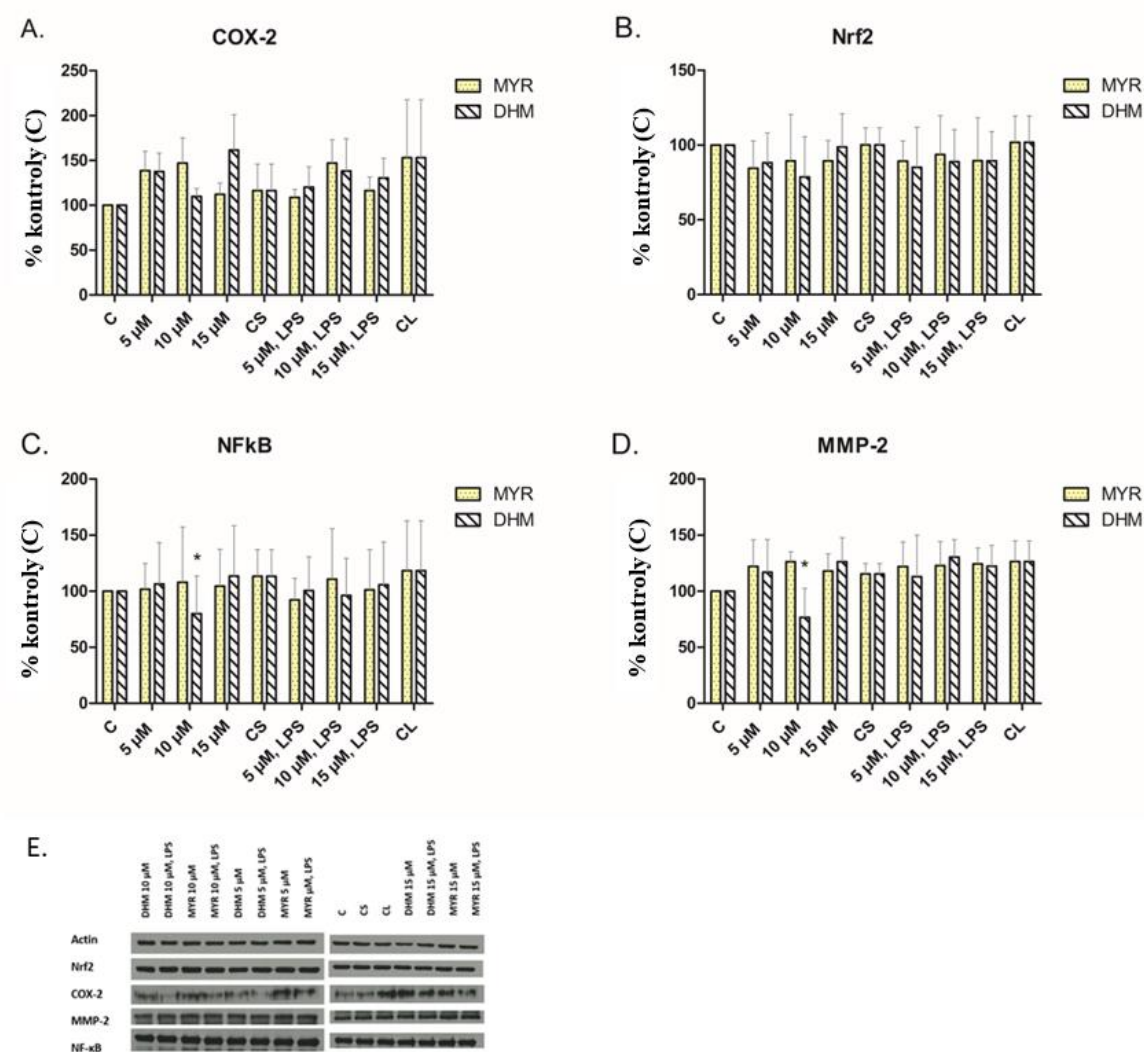
Hladina inducibilní formy cyklooxygenázy (COX-2), která katalyzuje tvorbu prostaglandinů jako odpověď na zánět, byla zvýšena u škrábnutých NHDF. Hladina tohoto enzymu byla snížena po aplikaci 15  $\mu$ M MYR a 10  $\mu$ M DHM ve srovnání s kontrolou (škrábnutými buňkami; CS). Avšak v LPS infikovaných NHDF byla COX-2 snížena u všech aplikovaných koncentrací MYR a DHM ve srovnání s CL (škrábnutými buňkami infikovanými LPS). U NHEK jsme zaznamenaly pokles hladiny COX-2 v buněčném lyzátu se snižující se koncentrací MYR i DHM (*Obr. 9A, 10A*).

Dále jsme zkoumali vliv MYR a DHM na signální dráhu Nrf2 jejíž aktivace poskytuje ochranu před oxidačním stresem. Z grafu je patrné (*Obr. 9B, 10B*), že hladina transkripčního faktoru Nrf2 byla snížena po aplikaci všech testovaných koncentrací MYR a DHM v buněčném lyzátu u škrábnutých NHDF a NHEK ve srovnání s CS. Rovněž MYR a DHM snížily hladinu Nrf2 v LPS infikovaných NHDF a NHEK ve srovnání s CL (*Obr. 9B, 10B*).

NF- $\kappa$ B, transkripční faktor, který se podílí na indukci exprese prozánětlivých markerů, byl analyzován v buněčném lyzátu NHDF a NHEK po aplikaci MYR a DMY. Jeho hladina u škrábnutých NHDF a NHEK byla významně snížena po aplikaci 10  $\mu$ M DHM ve srovnání s CS. Ostatní testované koncentrace MYR a DHM neměly významný vliv na regulaci NF- $\kappa$ B v těchto buňkách. Rovněž bylo pozorováno mírné snížení hladiny NF- $\kappa$ B v LPS infikovaných NHDF ve srovnání s CL (*Obr. 9C, 10C*).

Z výsledků Western blotu je také zřejmé, že 10  $\mu$ M DHM významně snížil hladinu MMP-2 u škrábnutých NHDF a NHEK ve srovnání s CS. U ostatních testovaných koncentrací MYR a DHM aplikovaných na NHDF byla hladina MMP-2 stejná s kontrolní populací buněk CL resp. CS. Současně lze pozorovat trend snižující se hladiny MMP-2

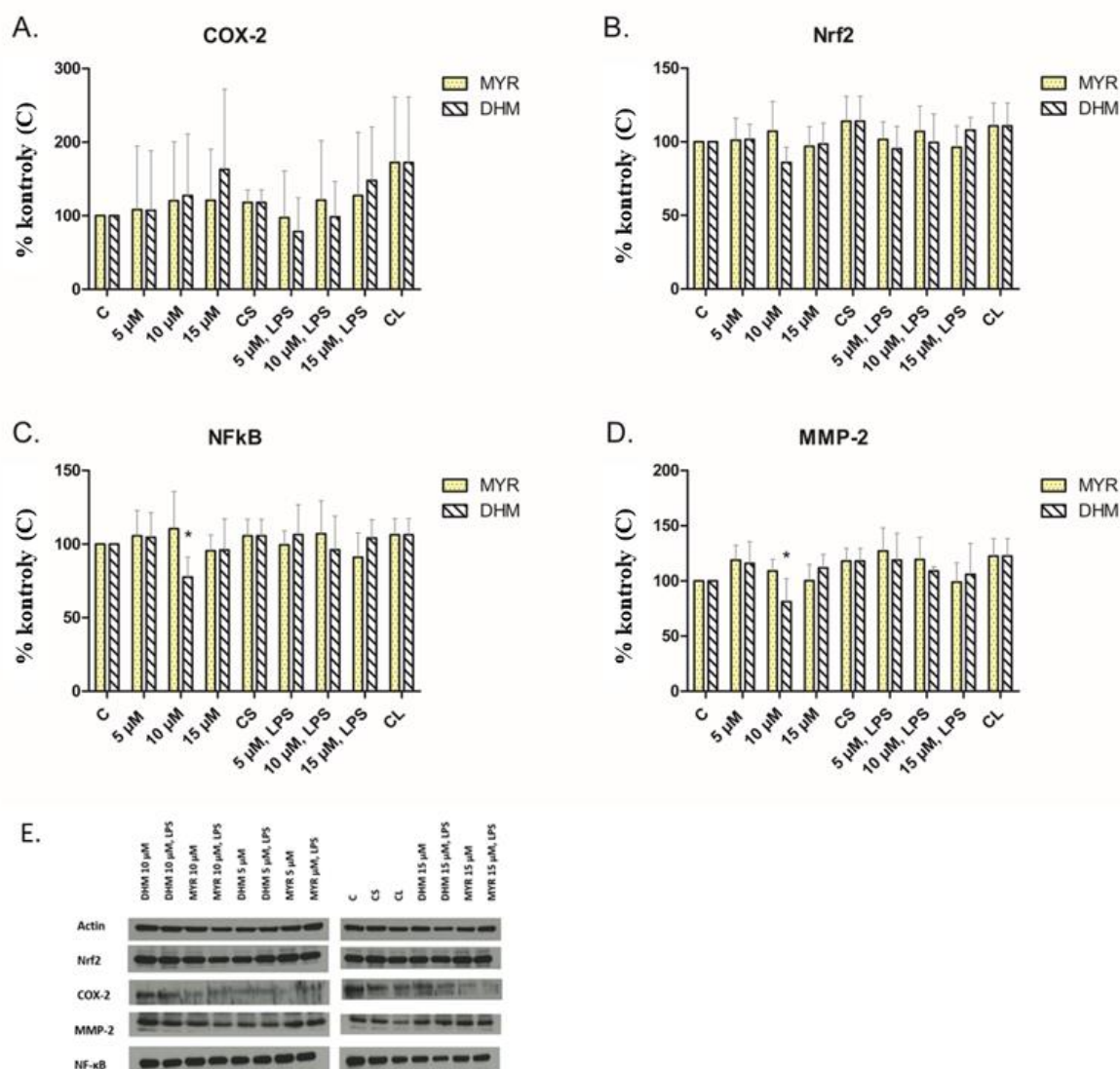
se zvyšující se koncentrací MYR a DHM v NHDF infikovaných LPS ve srovnání s CL (Obr. 9D, 10D).



**Obr. 9:** Efekt MYR a DHM na expresi (A) COX-2, (B) Nrf2, (C) NF-kB, (D) MMP-2 stanovené metodou Western blot v buněčném lyzátu NHDF.

Reprezentativní Western blot (E). \*  $P < 0,05$  byly považovány za statisticky významné ve srovnání se škrábnutou kontrolou (CS). Jako kontrola (C) byly NHDF kultivované v médiu pro experimenty. Další kontroly: škrábnuté NHDF inkubované nejprve s LPS a následně pouze s experimentálním médiem (CL) a škrábnuté NHDF kultivované v médiu pro experimenty (CS). Počet měření:  $n = 5$ .





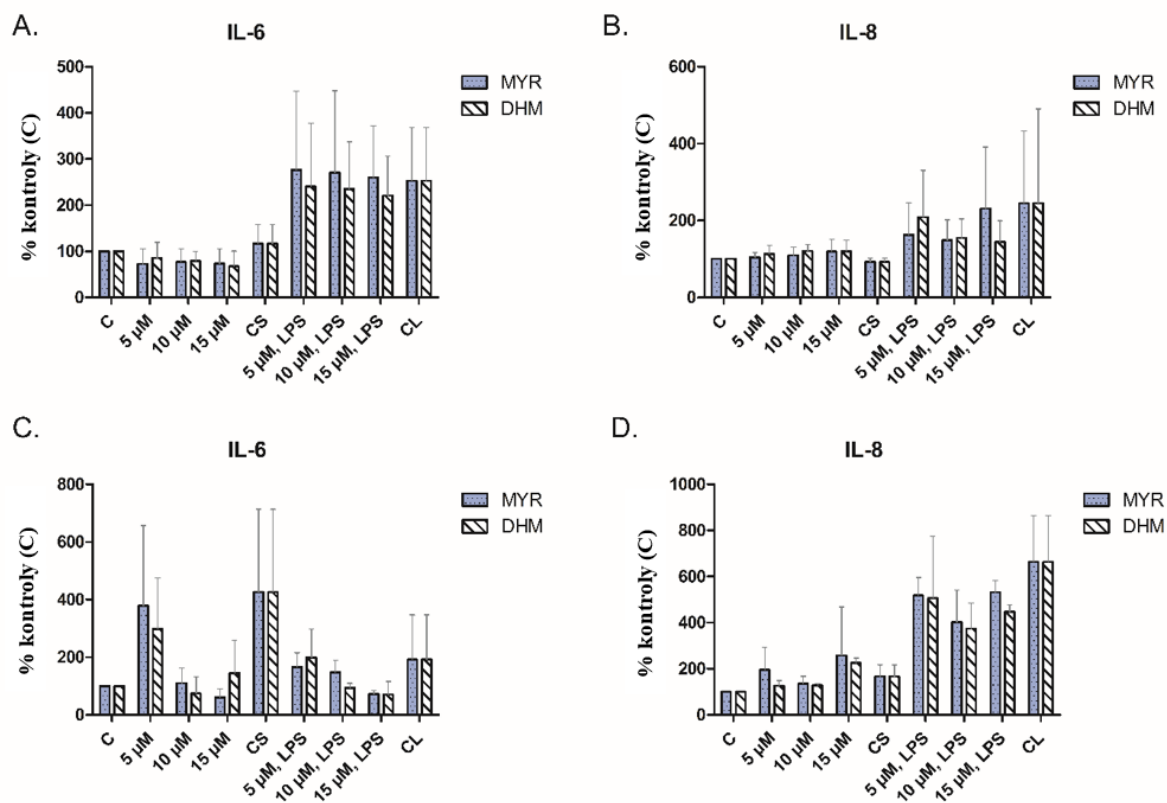
**Obr. 10:** Efekt MYR a DHM na expresi (A) COX-2, (B) Nrf2, (C) NF-kB, (D) MMP-2 stanovené metodou Western blot v buněčném lyzátu NHEK.

Reprezentativní Western blot (E). \*  $P < 0,05$  byly považovány za statisticky významné ve srovnání se škrábnutou kontrolou (CS). Jako kontrola (C) byly NHEK kultivované v médiu pro experimenty. Další kontroly: škrábnuté NHEK inkubované nejprve s LPS a následně pouze s experimentálním médiem (CL) a škrábnuté NHEK kultivované v médiu pro experimenty (CS). Počet měření:  $n = 5$ .

### 5.1.3 STANOVENÍ PROZÁNĚTLIVÝCH INTERLEUKINŮ METODOU ELISA

Zánětlivé cytokiny a chemokiny, které jsou nadměrně exprimovány v případě nehojících se ran, byly stanoveny v buněčném médiu pomocí Human IL-6 ELISA Development Kit a Human IL-8 ELISA Development Kit (PeproTech, Velká Británie). Na modelu škrábnutých NHDF a NHEK infikovaných LPS, byly hodnoceny inhibiční účinky MYR a DHM na produkci IL-6 a IL-8, které uvolňují NHDF a NHEK do kultivačního média.

Hladina IL-6 byla po 24hodinové aplikaci MYR a DHM nižší ve škrábnutých NHDF při srovnání s CS. Oproti tomu byla hladina IL-8 ve srovnání s CS zvýšena. Aplikace MYR a DHM také vedla ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů v LPS infikovaných NHDF (*Obr. 11A, 11B*). Hladina IL-6 se snižovala se zvyšující se koncentrací MYR a DHM ve škrábnutých i LPS infikovaných NHEK. Rovněž MYR a DHM snížily hladinu chemokinu IL-8 v NHEK infikovaných LPS ve srovnání s CL (*Obr. 11C, 11D*).



**Obr. 11:** Efekt MYR a DHM na hladinu IL-6 (A) a IL-8 (B) produkovaných NHDF a na hladinu IL-6 (C) a IL-8 (D) produkovaných NHEK.

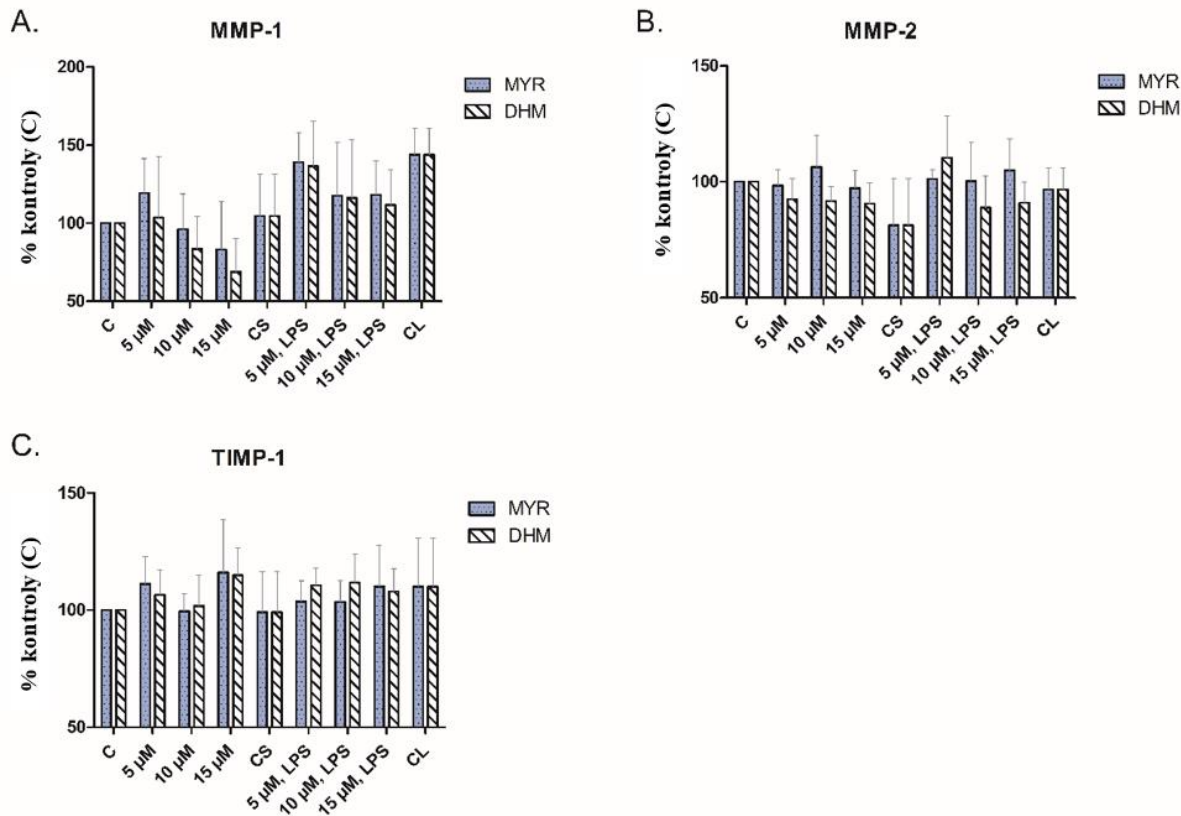
Jako kontrola (C) byly buňky kultivované v médiu pro experimenty. Další kontroly: škrábnuté buňky inkubované nejprve s LPS a následně pouze s experimentálním médiem (CL) a škrábnuté buňky kultivované v médiu pro experimenty (CS). Počet měření:  $n = 5$ .

#### 5.1.4 STANOVENÍ MMP-1, MMP-2 A TIMP-1 METODOU ELISA

MMP jsou skupinou endopeptidáz, které jsou zodpovědné za degradaci mezibuněčné hmoty během fyziologického a patologického hojení ran. V kožních ranách jsou MMP syntetizovány převážně keratinocyty, fibroblasty, makrofágy a endotelovými buňkami a jsou regulovány během několika hodin po poranění. V naší práci jsme analyzovaly MMP-1, MMP-2 a inhibitor TIMP-1 po 24hodinové aplikaci MYR a DHM pomocí ELISA kitů (Human Total MMP-1 DuoSet ELISA, Human Total MMP-2 DuoSet ELISA a Human Total TIMP-1 DuoSet ELISA (R&D Systems, USA)).

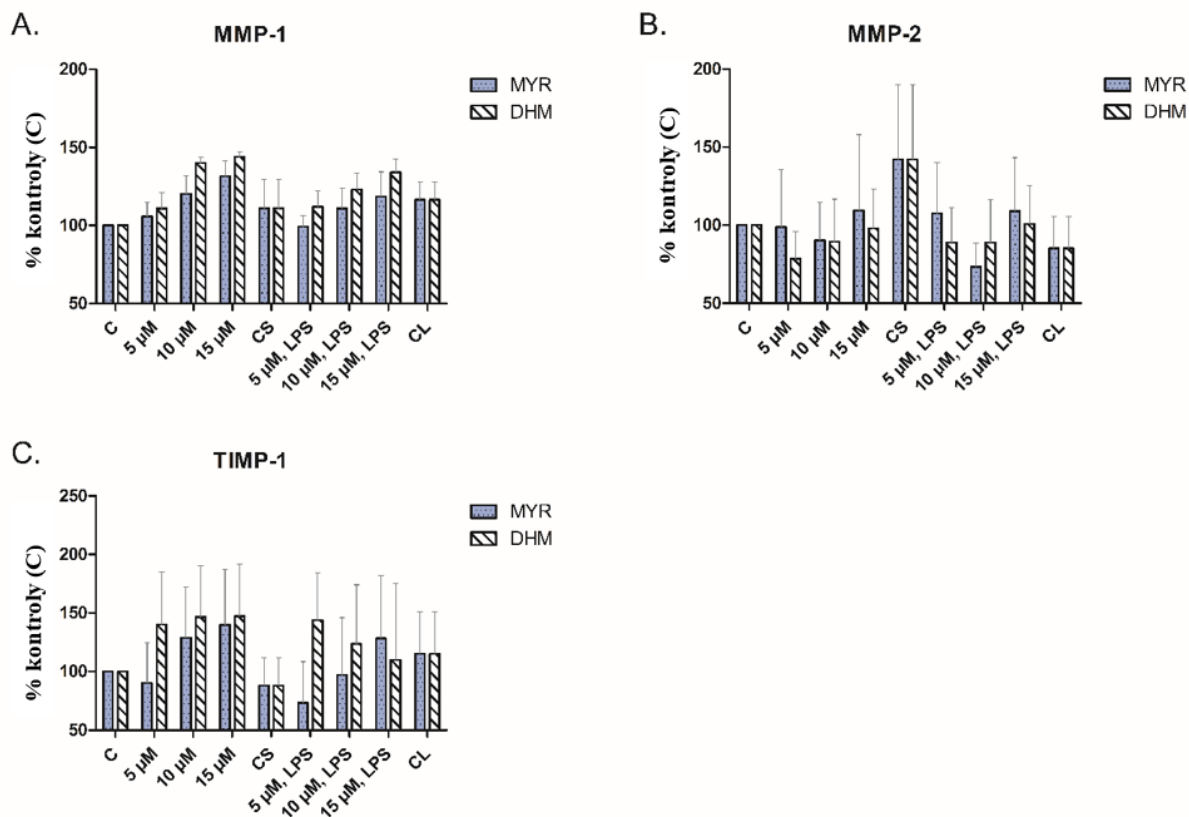
Produkce MMP-1 se snižovala se zvyšující se koncentrací MYR a DHM ve škrábnutých a LPS infikovaných NHDF (**Obr. 12A**). U všech testovaných koncentrací MYR a DHM byla hladina MMP-2 vyšší u škrábnutých NHDF ve srovnání s CS. Stejně jako v LPS infikovaných NHDF, kde doházelo ke zvýšení MMP-2 ve srovnání s CL po aplikaci MYR. Nicméně můžeme pozorovat, že 10 a 15  $\mu\text{M}$  koncentrace DHM snížila hladinu MMP-2 ve srovnání s CL (**Obr. 12B**). Vybrané flavonoidy taktéž ovlivnily produkci inhibitoru TIMP-1. Z grafu můžeme pozorovat, že MYR a DHM v koncentracích 5 a 15  $\mu\text{M}$  zvýšily TIMP-1 ve škrábnutých NHDF ve srovnání s CS a u LPS infikovaných NDHF byla produkce TIMP-1 při všech koncentracích MYR a DHM srovnatelná s CL (**Obr. 12C**).

Kožní buňky produkovaly MMP a TIMP při různé intenzitě. Sekrece kolagenázy-1 (MMP-1) byla vyšší po aplikaci MYR a DHM v NHEK ve srovnání s NHDF. Její hladina narůstala se zvyšujícími se koncentracemi MYR a DHM ve škrábnutých i LPS infikovaných NHEK (**Obr. 13A**). Oproti tomu produkce MMP-2 byla snížena působením MYR a DHM ve škrábnutých NHEK ve srovnání s CS a v LPS infikovaných NHEK byla zvýšena při všech testovaných koncentracích s výjimkou 10  $\mu\text{M}$  MYR ve srovnání s CL (**Obr. 13B**). Hladina TIMP-1 se zvyšovala s rostoucí koncentrací MYR a DHM v poškrábaných NHEK ve srovnání s CS. Hladina TIMP-1 rovněž rostla se zvyšující se koncentrací MYR v NHEK infikovaných LPS a oproti tomu se snižovala se zvyšujícími se koncentracemi DHM v NHEK infikovaných LPS ve srovnání s CL (**Obr. 13C**).



**Obr. 12:** Efekt MYR a DHM na hladinu MMP-1 (A), MMP-2 (B) a TIMP-1 (C) produkovaných NHDF.

Jako kontrola (C) byly NHDF kultivované v médiu pro experimenty. Další kontroly: škrábnuté NHDF inkubované nejprve s LPS a následně pouze s experimentálním médiem (CL) a škrábnuté NHDF kultivované v médiu pro experimenty (CS). Počet měření:  $n = 5$ .

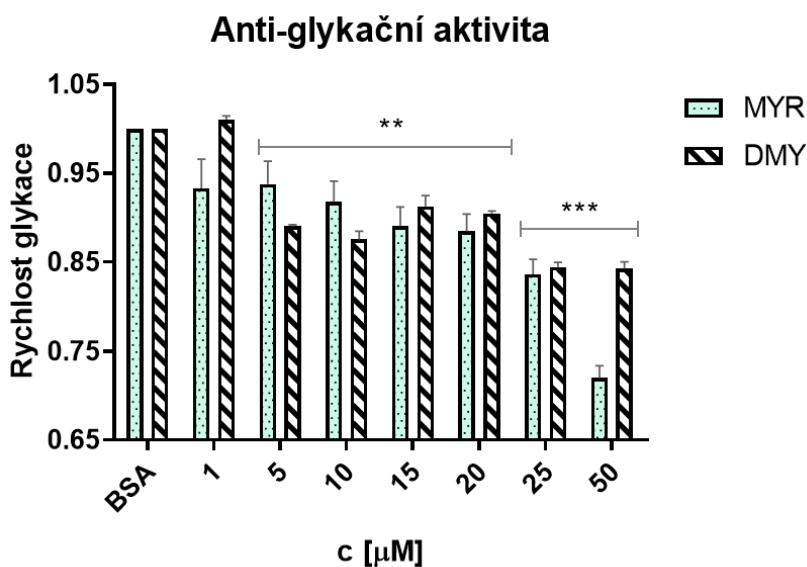


**Obř. 13:** Efekt MYR a DHM na hladinu MMP-1 (A), MMP-2 (B) a TIMP-1 (C) produkovaných NHEK.

Jako kontrola (C) byly NHEK kultivované v médiu pro experimenty. Další kontroly: škrábnuté NHEK inkubované nejprve s LPS a následně pouze s experimentálním médiem (CL) a škrábnuté NHEK kultivované v médiu pro experimenty (CS). Počet měření:  $n = 5$ .

### 5.1.5 Anti-glykační aktivita

Závislost rychlosti glykace BSA na koncentraci MYR a DHM je uvedena na **Obr. 14**. Glykovaný BSA v nepřítomnosti MYR / DHM byl určen jako negativní kontrola. Z výsledků vyplývá, že MYR a DHM signifikantně potlačují glykaci již od 5  $\mu\text{M}$  koncentrace. Při porovnání obou flavonoidů můžeme pozorovat výraznější potlačení glykace u MYR. Specifická fluorescence byla snížena během 48 hod. glykace BSA (zprostředkovanou methylglyoxalem při 37 ° C) v celém koncentračním rozmezí MYR a DHM.



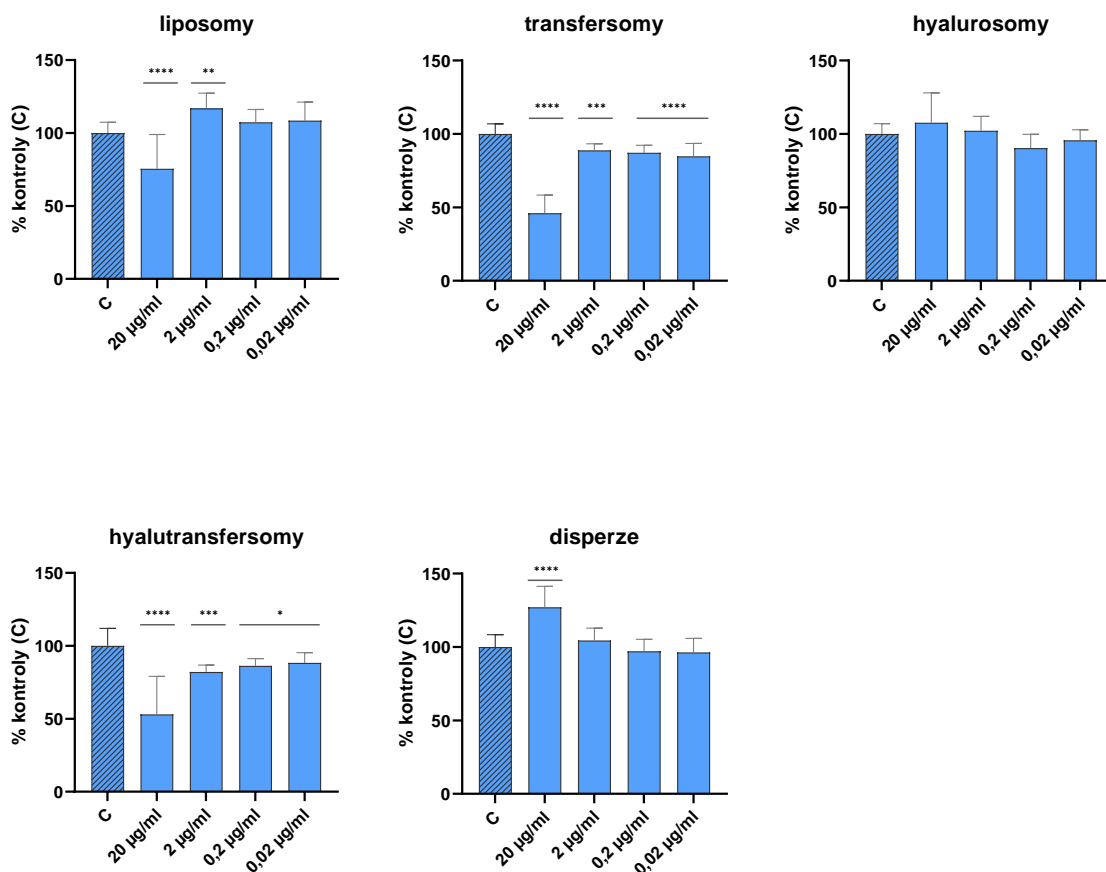
**Obr. 14:** Vliv MYR a DHM na rychlost glykace BSA. \*\*  $P < 0,01$  a \*\*\*  $P < 0,001$  byly považovány za statisticky významné ve srovnání s glykovaným BSA.

## ***5.2 Efekt oleuropeinu a oleje z lentišku na proces hojení ran in vitro***

### **5.2.1 HODNOCENÍ BUNĚČNÉ VIABILITY**

Primární NHDF byly vybrány jako buňky dermis, které jsou vhodné pro hodnocení cytotoxicity fotochemikálií s potenciálem pro topickou aplikaci. Oleuropein a olej z lentišku byl aplikován na NHDF v disperzi nebo inkorporován v liposomech, transfersomech, hyalurozomech a hyalutransfersomech. Toxicita těchto zvolených formulací byla hodnocena pomocí testu MTT. Vyšší koncentrace testovaných látek (20 µg/ml) způsobila snížení životaschopnosti buněk po aplikaci lipozomů (~75 % životaschopnosti), transferzomů (~46 % životaschopnosti) a hyalutransfersomů (~50 % životaschopnosti). Naopak, fytochemikálie v disperzi nebo obsažené v hyalurozomech nevykazovaly žádnou toxicitu. Fytochemikálie v nižších koncentracích (2; 0,2 a 0,02 µg/ml) byly netoxické, protože životaschopnost buněk nepoklesla pod 85 %. Na základě MTT testu byly pro další experimenty vybrány dvě subtoxické koncentrace (0,2 a 2 µg/ml), viz. ***Obr. 15***.





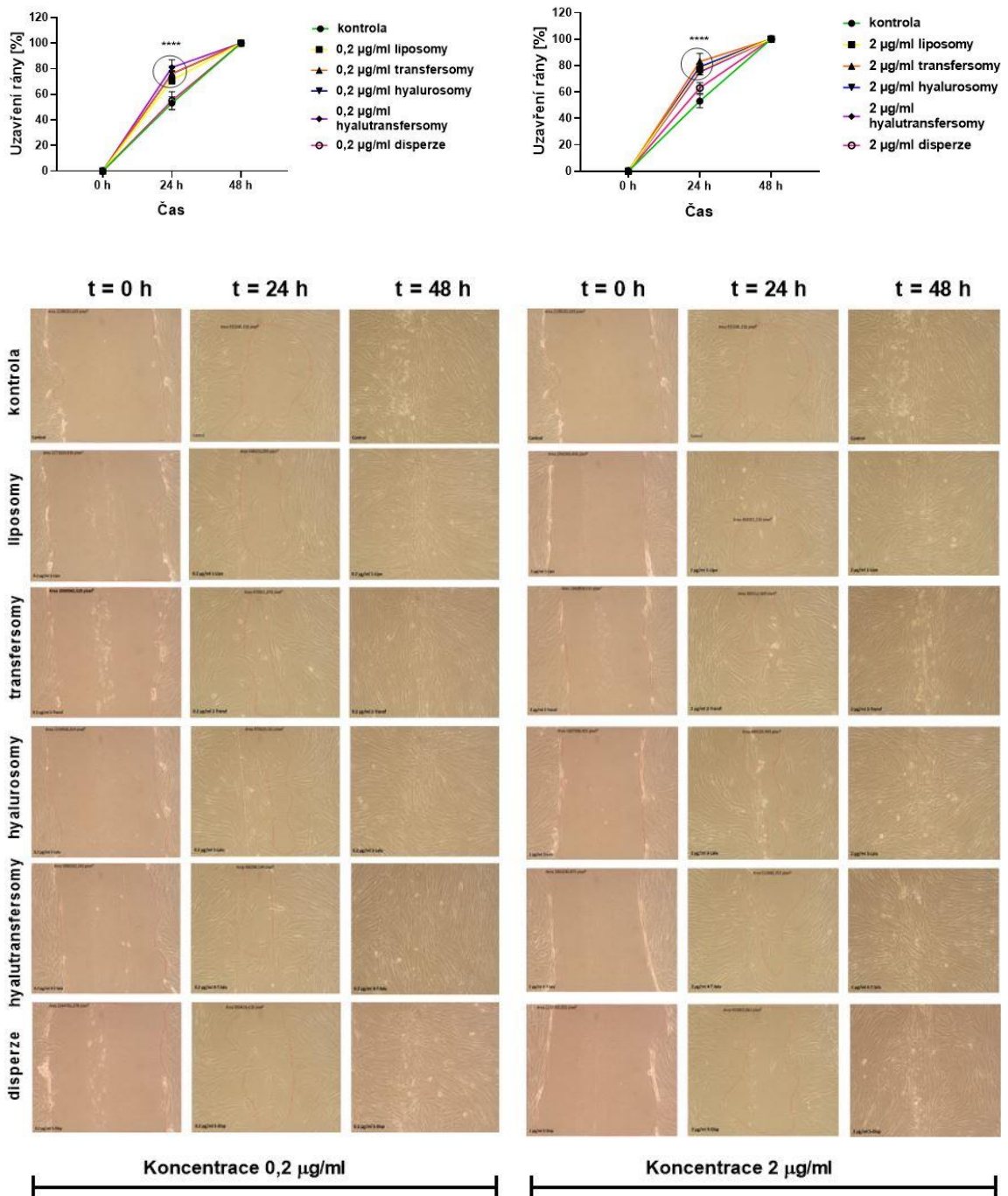
**Obr. 15:** Efekt liposomů, transfersomů, hyalurosomů, hyalutransfersomů a disperze na viabilitu NHDF.

Jako kontrola (C) byly NHDF kultivované v médiu pro experimenty.

Počet měření:  $n = 3$ .  $*P < 0,05$ ;  $***P < 0,001$ ;  $****P < 0,0001$  byly považovány za statisticky významné ve srovnání s kontrolou (C).

## 5.2.2 HODNOCENÍ RYCHLOSTI UZAVÍRÁNÍ RÁNY *IN VITRO*

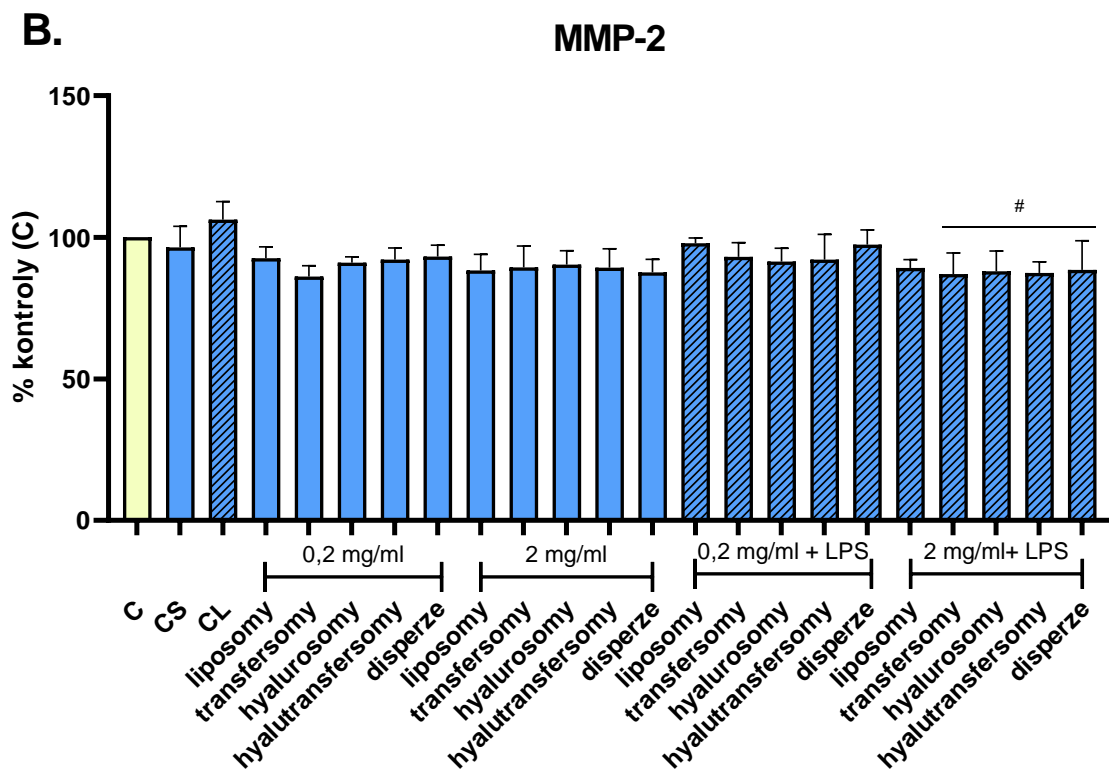
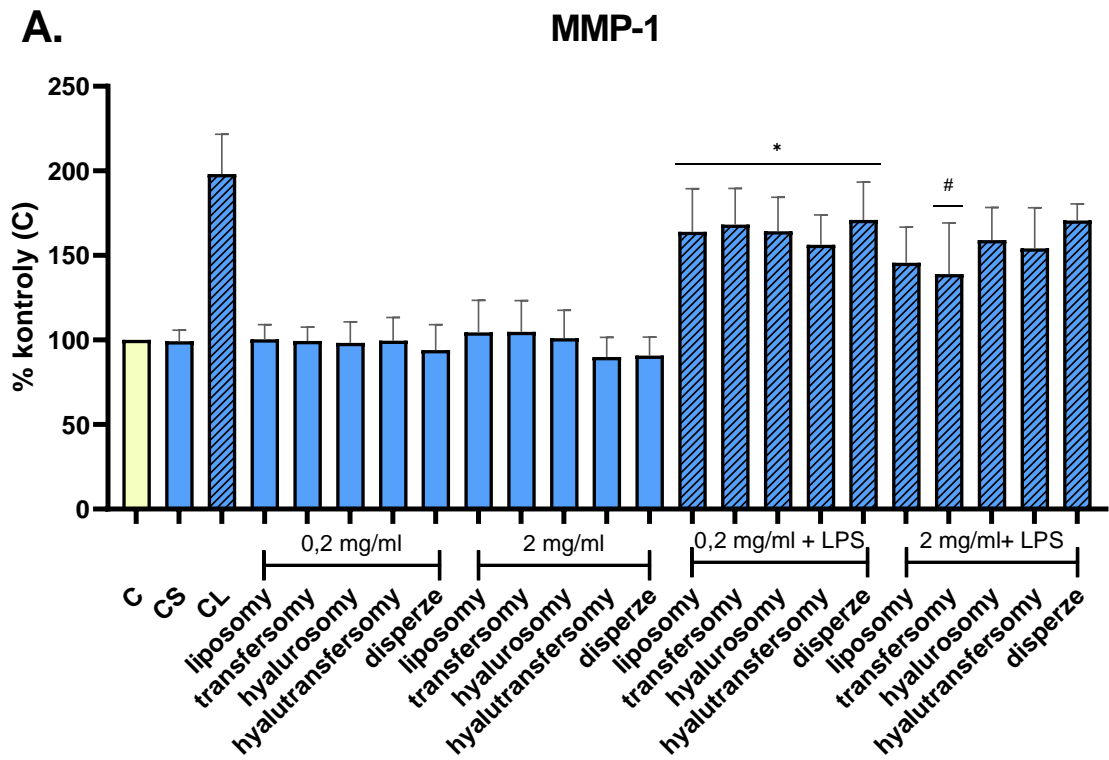
Hodnocení rychlosti uzavírání rány *in vitro* bylo provedeno na buněčné monovrstvě primárních NHDF. Schopnost oleuropeinu a oleje z lentišku (v disperzi nebo obsažených v liposomech, transfersomech, hyalurozomech a hyalutransfersomech) stimulovat buněčnou proliferaci a migraci byla hodnocena ve dvou různých koncentracích (0,2 a 2  $\mu\text{g/ml}$ ). Po 24 hodinách bylo procento uzavření rány u kontrolních buněk asi 50 %. Podobné výsledky byly získány po aplikaci fotochemikálií v disperzi na škrábnutou monovrstvu buněk, kde procento uzavření rány bylo ~55 % bez ohledu na použitou koncentraci (0,2 a 2  $\mu\text{g/ml}$ ). Když byla monovrstva škrábnutých buněk ošetřena nižší koncentrací fytochemikálií (0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) (v lipozomech, transferzomech, hyalurozomech a hyalutransferzomech), uzavření rány bylo asi 74 % za 24 hodin a při použití vyšší koncentrace (2  $\mu\text{g/ml}$ ) zvýšilo až na ~80 %. Po 48 hodinách byla poraněná oblast zcela uzavřena po aplikaci všech testovaných látek, bez ohledu na použitou koncentraci, **Obr. 16**.

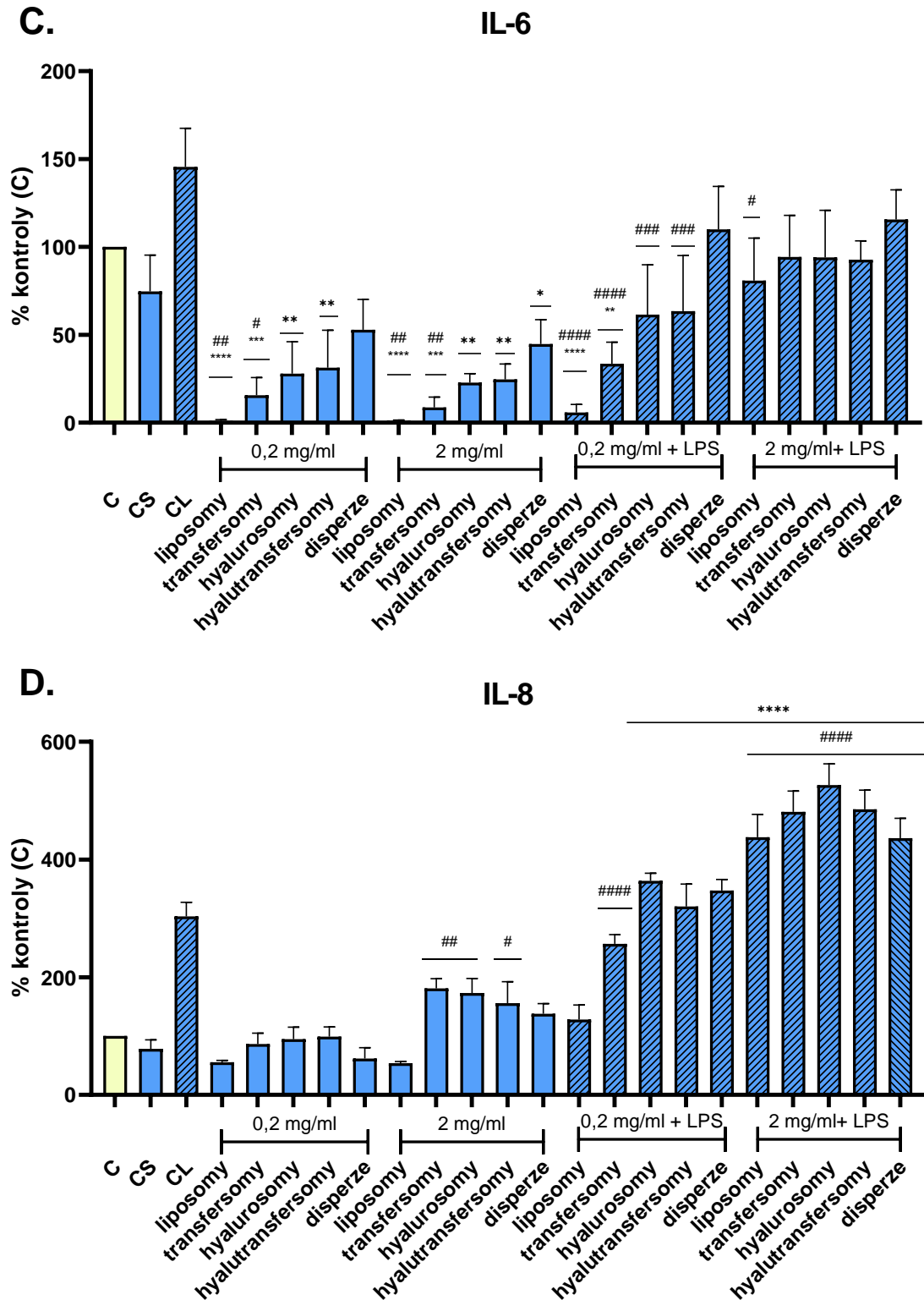


**Obr. 16:** Procento uzavření rány na monovrstvě NHDF. Jako kontrola byly NHDF kultivované v médiu pro experimenty. Liposomy, transfersomy, hyalurosomy, hyalutransfersomy a disperze byly testovány ve dvou koncentracích: 0,2 µg/ml a 2 µg/ml. Repräsentativní snímky uzavírání rány na NHDF jsou uvedeny v časech 0, 24 a 48 h. Počet měření:  $n = 4$ .  $****P < 0,0001$  byly považovány za statisticky významné ve srovnání s kontrolou.

### 5.2.3 STANOVENÍ MMP-1, MMP-2, IL-6 A IL-8 METODOU ELISA

MMP, cytokiny a chemokiny se podílejí na regulaci procesu hojení a hrají důležitou roli v imunitní odpovědi a reparaci tkání. Jak se očekávalo, stimulace buněk pomocí LPS vedla ke zvýšení produkce všech testovaných zánětlivých parametrů (MMP-1, MMP-2, IL-6 a IL-8), (*Obr. 17*). Ošetření škrábnutých buněk, infikovaných LPS, oleuropeinem a lentiškovým olejem v disperzi nebo obsažených v liposomech, transfersomech, hyalurozomech a hyalutransfersomech snižovalo hladinu MMP-1 a IL-6, zatímco jejich účinnost byla nižší u MMP-2 a IL-8. Pouze lipozomy obsahující oleuropein a lentiškový olej byly schopny snižovat produkci IL-8 v škrábnutých NHDF, zatímco jiná vezikulární formulace (transfersomy, hyalurozomy a hyalutransfersomy) způsobila zvýšení tohoto chemokinu.





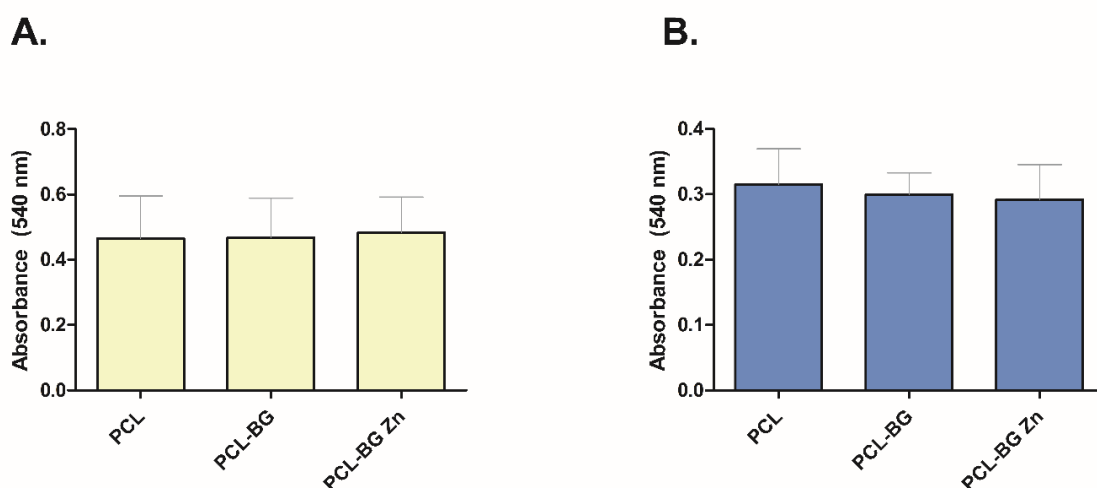
**Obr. 17:** Efekt liposomů, transfersomů, hyalurosomů, hyalutransfersomů a disperze na hladinu MMP-1 (A), MMP-2 (B), IL-6 (C) a IL-8 (D) produkovaných NHDF. Jako kontrola (C) byly NHDF kultivované v médiu pro experimenty. Další kontroly: škrábnuté NHDF inkubované nejprve s LPS a následně pouze s experimentálním médiem (CL) a škrábnuté NHDF kultivované v médiu pro experimenty (CS). Počet měření:  $n = 3$ .

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  byly považovány za statisticky významné ve srovnání s C. # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,01$ ; ### $P < 0,001$ ; #### $P < 0,0001$  byly považovány za statisticky významné ve srovnání s CS resp. CL.

### 5.3 Charakterizace kompozitních PCL membrán

#### 5.3.1 HODNOCENÍ BUNĚČNÉ VIABILITY PCL MEMBRÁN

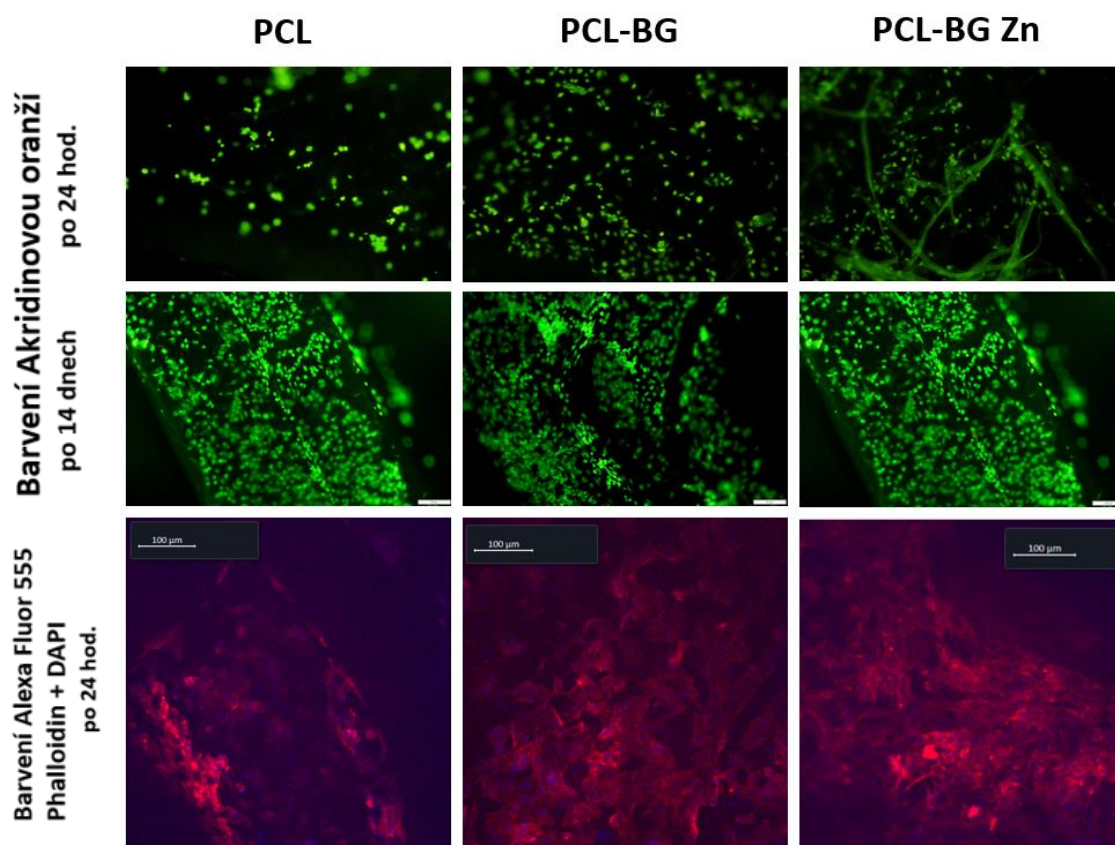
Pro stanovení viability SaOS-2 na PCL kompozitních membránách byl proveden MTT test kdy buňky byly kultivovány na PCL kompozitních membránách. Jako kontrolní materiál byl zvolen samotný PCL. Viabilita buněk byla hodnocena po 24 hodinách a po 7 dnech. Výsledky životaschopnosti buněk nasazených na membránách připravených 3D tiskem neukázaly žádný významný rozdíl mezi testovanými materiály (**Obr.18**).



**Obr. 18:** Viabilita buněk SaOS-2 kultivovaných na jednotlivých materiálech po dobu 24 hodin (A.) a 7 dní (B.). Počet měření:  $n = 9$

### 5.3.2 HODNOCENÍ BIOKOMPATIBILITY PCL MEMBRÁN

Ideální kompozitní materiál pro regeneraci kostní tkáně by měl mít dobrou biokompatibilitu a dostatečnou mechanickou pevnost, aby sloužil jako počáteční strukturální podpora tkáně během hojení. Z výsledků našich *in vitro* experimentů můžeme pozorovat velmi dobrou biokompatibilitu všech testovaných PCL membrán (viz. **Obr. 19**). Výsledky barvení SaOS-2 akridinovou oranží ukazují vysokou viabilitu SaOS-2 kultivovaných na jednotlivých materiálech. I po 14 dnech byly buňky dobře adherované k membránám a stále proliferovaly. Jejich rovnoměrné rozložení bylo ověřeno také fluorescenčním barvením cytoskeletu a jádra (Alexa faloidin 555, DAPI).



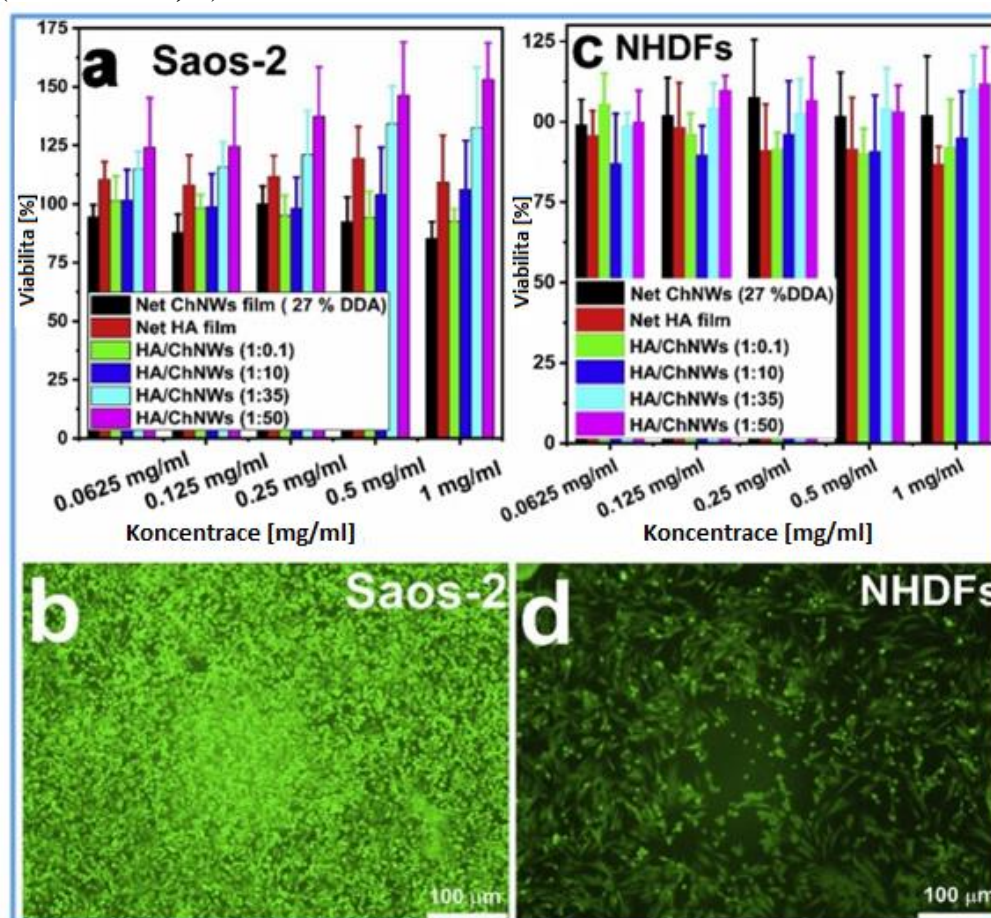
**Obr. 19:** Barvení SaOS-2 akridinovou oranží (zelená barva: živé buňky) po 24 hodinách a po 14 dnech. Výsledky ukázaly, že membrány mají dobrou cytocompatibilitu: mohou podporovat adhezi a proliferaci buněk. Barvení Alexa Fluor 555 faloidinem (červená barva: cytoskelet) a DAPI (modrá barva: jádro) po 24 hodinách.



## 5.4 Charakterizace kompozitních biofilmů

### 5.4.1 HODNOCENÍ BUNĚČNÉ VIABILITY A BIOKOMPATIBILITY HYALURONAN-CHITOSANOVÝCH BIOFILMŮ

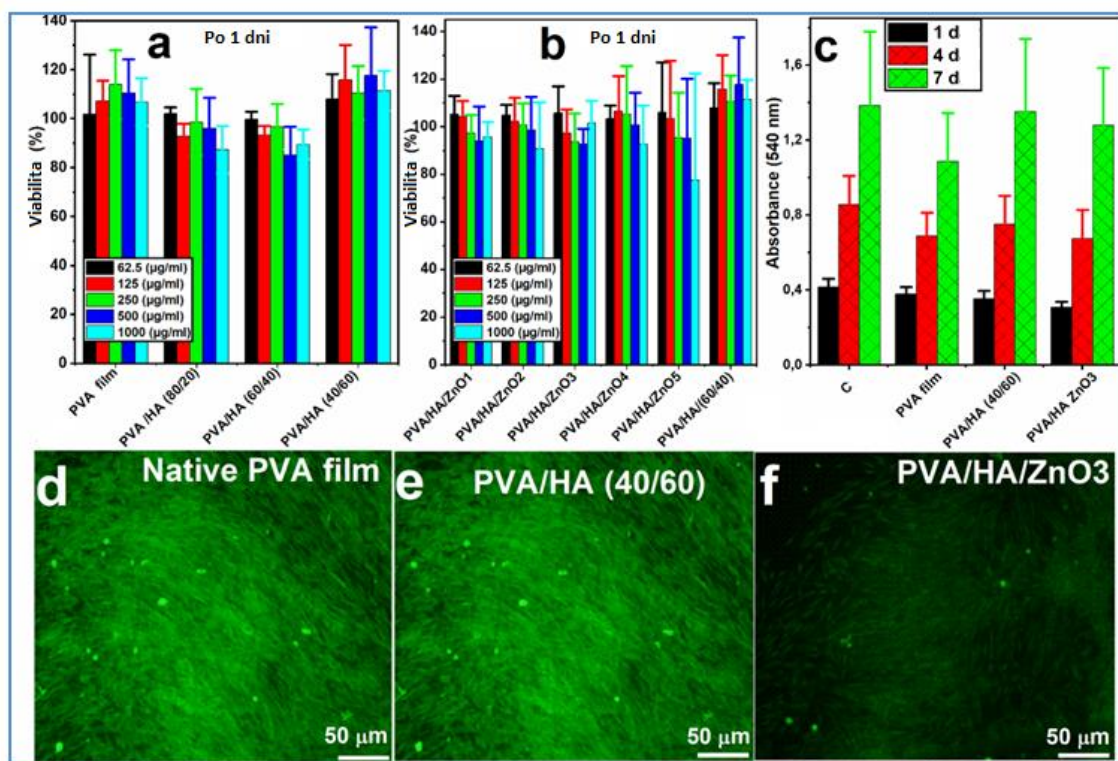
Cytotoxicita a biokompatibilita hyaluronan-chitosanových biofilmů, byla testována na buňkách SaOS-2 a NHDF, které byly zvoleny kvůli možné aplikaci HA/ChNW biofilmů na hojení kostních nebo kožních defektů či jako systém pro transport léčiv. Na základě MTT testu bylo stanoveno, že žádný z připravených nanokompozitních biofilmů ve všech testovaných koncentracích nebyl pro buňky toxický (viabilita byla vyšší než 80 %, *Obr. 20a, c*). Biokompatibilita nanokompozitních biofilmů byla hodnocena pomocí barvení živých/mrtvých buněk a vizualizací fluorescenčním mikroskopem (viz. *Obr. 20b, d*).



*Obr. 20:* Stanovení cytotoxicity a biokompatibility nanokompozitních hyaluronan-chitosanových biofilmů na SaOS-2 (a, b) a NHDF (c, d) (Abdelrahman et al., 2020). Zelená barva fluorescence značí živé buňky.

## 5.4.2 HODNOCENÍ BUNĚČNÉ VIABILITY A BIOKOMPATIBILITY HYALURONANOVÝCH BIOFILMŮ A HYALURONANOVÝCH BIOFILMŮ SE ZINKEM

Cytotoxicita a biokompatibilita HA biofilmů s PVA a HA biofilmů s PVA a nanočásticemi ZnO byla testována na NHDF. Viabilita byla stanovena MTT testem po 1 dni a u vybraných biofilmů byla stanovována růstová křivka (viabilita po 1, 4 a 7 dnech). Po 24hodinách žádný z připravených biofilmů, ve všech testovaných koncentracích, nebyl pro buňky toxický (viabilita byla vyšší než 80 %, *Obr. 21a, b*). Dobrou proliferaci buněk rovněž potvrzuje i růstová křivka NHDF (*Obr. 21c*). Biokompatibilita jednotlivých biofilmů k NHDF byla hodnocena pomocí barvení živých/mrtvých buněk a vizualizace pod fluorescenčním mikroskopem (viz. *Obr. 21d, e, f*, který prokázal živé buňky).



*Obr. 21: Stanovení cytotoxicity a biokompatibility hyaluronanových biofilmů a hyaluronanových biofilmů obsahujícím zinek testovaných na NHDF (Abdel-Rahman et al., 2022). Zelená barva fluorescence značí živé buňky.*

## 6 Diskuze

### 6.1 Efekt myricetinu a dihydromyricetinu na proces hojení ran *in vitro*

Hojení kožní rány je tvořeno kaskádou biochemických procesů, na kterých se podílí celá řada molekul, jako jsou růstové faktory, eikosanoidy, cytokiny a chemokiny, které hrají zásadní roli při opravě poškozené tkáně. Celý proces hojení je charakterizován těmito hlavními fázemi – zástavou krvácení, zánětem, reepitelizací a remodelací tkáně. Nerovnováha a prodloužení zánětlivé fáze procesu hojení ran může vést k rozvoji tzv. nehojící se rány nebo k nadměrné tvorbě jizev (Schreml et al., 2010), (Yasukawa et al., 2020).

V této práci byly analyzovány účinky přírodních flavonoidů, jako jsou MYR a DHM, na *in vitro* model kožní rány. Tyto polyfenoly jsou známé především svým silným antioxidačním účinkem. Některé studie prokázaly, že i přes podobnou strukturu má MYR výraznější antivirové účinky (Zhong et al., 2014). Aplikace DHM má také mnoho výhod. V nedávné *in vivo* studii byl použit k urychlení hojení ran během fáze remodelace (Shevelev et al., 2020). Jedním z hlavních cílů této disertační práce bylo porovnat účinek těchto dvou flavonoidů (MYR a DHM) na regulaci zánětlivé odpovědi *in vitro*.

Abychom zjistily, zda MYR a DHM ovlivňují signální dráhy NF- $\kappa$ B a Nrf2 (Lei et al., 2018) či nikoli, byl na škrábnutých buňkách (NHDF a NHEK) indukován zánět prostřednictvím LPS. Signální dráha NF- $\kappa$ B se aktivuje po kontaktu s LPS, antigeny, zánětlivými cytokiny nebo v odpovědi na oxidační stres (Oeckinghaus et al., 2011), (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Zásadní roli v ochraně před oxidativním stresem a udržováním redoxní rovnováhy v buňkách hraje Nrf2 signální dráha, která NF- $\kappa$ B dráhu negativně reguluje v několika směrech. Například, Nrf2 inhibuje aktivaci NF- $\kappa$ B zprostředkovanou oxidačním stresem snížením intracelulárních hladin ROS (Saha et al., 2020). Bylo publikováno, že po vytvoření rány a aplikaci LPS, byl NF- $\kappa$ B aktivován a translokován do jádra jako fosforylovaný p65 NF- $\kappa$ B, kde se navázal na DNA a aktivoval transkripci prozánětlivých cílových genů (Alvira, 2014), (Ambrozova et al., 2017). Oba flavonoidy, v koncentračním rozmezí od 5 do 15  $\mu$ M, byly účinné při potlačování exprese NF- $\kappa$ B v LPS infikovaných NHDF a NHEK ve srovnání s kontrolou

(CL). Naše výsledky prokázaly, že DHM v koncentraci 10  $\mu$ M signifikantně snížil tento transkripční faktor (NF- $\kappa$ B) v škrábnutých NHDF a NHEK. Skutečnost, že DHM může být potenciálním přirozeným inhibítozem NF- $\kappa$ B, byla diskutována i v článku publikovaném Tang a kol. (Tang et al., 2016), kde prokázali, že DHM snížil translokaci p65 NF- $\kappa$ B do jádra v HeLa buňkách stimulovaných TNF- $\alpha$ . Tato studie je rovněž v souladu s článkem publikovaným Hou a kol. (Hou et al., 2015), kde je uvedeno, že DHM má celou řadu významných biologických účinků, jako je inhibice aktivity NF- $\kappa$ B, potlačení exprese COX-2 a hladiny prozánětlivých cytokinů, např. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ .

Cyklooxygenázy představují enzymy důležité pro přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandiny, které patří mezi hlavní parametry zánětu (Surowiak et al., 2014). Zatímco konstitutivní forma COX-1 je přítomná fyziologicky a reguluje různé buněčné procesy, inducibilní forma COX-2 se výrazně exprimuje během zánětlivé fáze v místě hojení (Chen & Drago, 2013). Přetrvávající exprese COX-2 v místě poranění je třeba regulovat, neboť může vést k tzv. nehojícím se ranám (Müller-Decker et al., 2002), (Shaikh-Kader et al., 2021). Množství inducibilní COX-2 bylo detekováno ve škrábnutých buňkách NHDF a NHEK a také v LPS infikovaných, škrábnutých kožních buňkách ve srovnání s kontrolou. MYR a DHM byly efektivní při potlačení exprese COX-2 v LPS infikovaných NHDF a NHEK. Podle nových studií (Jang et al., 2020), (Jing & Li, 2019) aplikace těchto flavonoidů rovněž snížila sekreci COX-2 v LPS infikovaných mikrogliích BV2.

Jedním z klíčových regulátorů exprese prozánětlivých cytokinů je transkripční faktor Nrf2. Kobayashi a kol. prokázali (Kobayashi et al., 2016), že Nrf2 inhibuje produkci zánětlivých cytokinů (IL-1 $\beta$  a IL-6) na *in vitro* modelu makrofágů (Raw 264.7) indukovaných LPS. Na druhou stranu transkripční faktor Nrf2 je primárně studován, kvůli jeho významnému vlivu na regulaci exprese antioxidantních genů (Ahmed et al., 2017). Nrf2 se skládá ze dvou podjednotek (p45 a Maf) a je regulován proteinem 1 spojeným s Kelch-likeEch (Keap1). Za podmínek vyvážené oxidace a redukce je Keap1 spojen s Nrf2 a lokalizován v cytosolu. Když dojde k vystavení buňky zvýšeným hladinám oxidačního stresu, Keap1 aktivuje Nrf2 a ten se translokuje do

buněčného jádra, kde řídí expresi cílových genů, detoxikačních a antioxidačních enzymů, jako je např. hemoxygenáza-1 (HO-1) (Ma, 2013), (Ryšavá et al., 2020). Vliv MYR na tuto signální dráhu byl nedávno publikován v *in vitro* studii, kde byl MYR testovaný na chondrocytech a byla prokázána schopnost MYR inhibovat signální dráhu NF-κB přes HO-1 zprostředkovanou signální dráhou Nrf2 (Pan et al., 2019). V naší práci byla exprese transkripčního faktoru Nrf2 snížena ve škrábnutých i LPS stimulovaných NHDF a NHEK po aplikaci MYR a DHM ve všech testovaných koncentracích.

Cytokiny, zejména zánětlivé cytokiny (IL-6 a IL 8), se podílejí na regulaci procesu hojení a hrají důležitou roli v imunitní odpovědi a obnově tkáně (Kuhn et al., 2014). Tyto interleukiny přispívají ke zvýšení endoteliální permeability a vazodilatace a usnadňují migraci zánětlivých buněk, hlavně monocytů a neutrofilů do místa zranění. Mimo infiltrace imunitních buněk do rány, podporují tyto interleukiny také proliferaci a migraci kožních buněk (Komi et al., 2020). Na druhou stranu, při jejich dlouhodobě zvýšené produkci dochází ke zpomalení procesu hojení (Iocono et al., 2000). V naší práci jsme potvrdily pokles produkce IL-6 a IL-8 po 24hodinovém působení MYR a DHM na *in vitro* modelech NHDF a NHEK. Pozorovaný inhibiční účinek MYR a DHM na sekreci obou interleukinů byl navíc závislý na koncentraci těchto flavonoidů.

Nadměrná exprese vybraných cytokinů (IL-6 a IL-8) může zahájit produkci MMP-1 a MMP-2, které často přetrvávají ve zvýšeném množství v nehojících se ranách (Patel et al., 2016). MMP jsou skupinou endopeptidáz, které jsou zodpovědné za degradaci mezibuněčné hmoty během fyziologického i patologického hojení. Jsou produkovány celou řadou buněk (granulocyty, makrofágy, endoteliálními buňkami, keratinocyty nebo fibroblasty) během hojení, ale i bezprostředně po zranění. Tyto enzymy jsou regulovány na úrovni transkripce, translace nebo přítomností TIMP. Zvýšené hladiny těchto MMP mohou způsobit prodloužení doby hojení ran a poškození zdravé tkáně (Hayden et al., 2011), (Martins et al., 2013).

Z výsledků je zřejmé, že hladina MMP-1 klesala s rostoucími koncentracemi MYR a DHM ve škrábnutých NHDF ve srovnání s CS. Na druhou stranu jsme opačný trend zaznamenaly u hladiny MMP-1 produkovanou NHEK, kde se zvyšující se koncentrací MYR a DHM rostla i hladina MMP-1. Tento rozpor mezi dvěma vybranými *in vitro*

modely (škrábnuté NHDF a NHEK) lze vysvětlit díky rozdílné biologické odpovědi na poranění a rozdílných bazálních hladinách jednotlivých MMP v NHDF a NHEK, jak publikovali Tandara a Mustoe (Tandara & Mustoe, 2011). Výsledky ELISA testu i Western blotu také ukazují na významné snížení hladiny MMP-2 po aplikaci DHM u škrábnutých NHEK ve srovnání s kontrolou CS. Fakt, že DHM významně inhibuje produkci MMP-2 prokázali i ve studii Wang a kol. (Wang et al., 2021), kde pomocí ELISA testu analyzovali hladinu MMP-2 v buňkách BGC-823 ošetřených DHM. Je zajímavé, že s klesajícími koncentracemi DHM byla inhibice MMP-2 silnější. Oproti tomu byla detekována zvýšená hladina MMP-2 u škrábnutých NHDF po aplikaci MYR a DHM ve srovnání s CS.

V našich experimentech jsme se také zabývaly úlohou, kterou tyto flavonoidy MYR a DHM hrají při udržení rovnováhy MMP/TIMP-1. Ve prospěch MYR, zvyšovat poměr TIMP-1/MMP hovoří i následující studie Wu a kol., která zkoumala účinky aplikace MYR na diabetické NHDF (Wu et al., 2016). V naší práci se hladina inhibitoru TIMP-1 zvyšovala s rostoucími koncentracemi MYR a DHM v poškrábaných NHEK ve srovnání s CS, což bylo v souladu s protizánětlivým potenciálem testovaných flavonoidů.

Součástí předkládané práce bylo rovněž posouzení anti-glykačního účinku MYR a DHM. Glykace je neenzymatická reakce mezi proteiny a redukujícími sacharidy, která vede k tvorbě AGE (Haque et al., 2020). Je zřejmé, že proces anti-glykace je důležitý pro zpomalení buněčného stárnutí a pro fyziologický průběh hojení ran, protože akumulace AGE v extracelulární matrix vede ke snížení elasticity tkání (Hwang et al., 2018), (Yeh et al., 2017). Anti-glykační aktivitou MYR se zabývali Urios a kol. (Urios et al., 2007), kteří zjistili, že MYR byl v regulaci produkce glykovaného pentosidinu účinnější než Quercetin. Účinek MYR byl také popsán i v pozdější studii, která potvrdila, že flavonoidy se 3', 4', 5 a 7-hydroxylovými substituenty vykazují silnější inhibici AGE (Patil et al., 2019). Našimi experimenty jsme potvrdili, že oba flavonoidy vykazují anti-glykační aktivitu. Při porovnání obou látek mezi sebou se zdá, že anti-glykační aktivita MYR je ve vyšších koncentracích účinnější než anti-glykační aktivita DHM.

## 6.2 Efekt oleuropeinu a oleje z lentišku na proces hojení ran *in vitro*

Dalšími testovanými přírodními látkami rostlinného původu byly oleuropein a lentiškový olej. Oleuropein je nejhojněji zastoupenou fenolickou sloučeninou obsaženou v olivovníku. V přírodním léčení se používá k ošetření kožních onemocnění, zejména těch spojených se zánětem (El-Gogary et al., 2021), (Allaw et al., 2021). Podobně je tomu u látek obsažených v lentiškovém oleji, u kterých se prokázal pozitivní účinek na udržení homeostázy kůže (Poljšak et al., 2020), (Allaw et al., 2021). Ke zvýšení stability a hojivého účinku na kůži byly tyto bioaktivní látky začleněny do specificky formulovaných nanonosičů. Jako kontrola byly tyto látky testovány v disperzi. V našich experimentech se jako nejvhodnější ukázaly fosfolipidové vezikuly. Ty byly dle předchozích studií připraveny ve formě liposomů, trasfersomů, hyalurosomů (Allaw et al., 2021), (Manca et al., 2021), (Allaw et al., 2021), (Firoznejhad et al., 2022) a nově i hyalutransfersomů, u kterých se očekává, že budou ideálním nosičem schopným procházet kůží.

Biologické vlastnosti vezikulárních formulací byly hodnoceny na primárních NHDF. Byla hodnocena toxicita, ochranný účinek proti poškození vyvolaném LPS a jejich potenciál při hojení ran (rýhový test), (Sklenarova et al., 2023).

Sub-toxické koncentrace oleuropeinu a oleje z lentišku (0,2 a 2  $\mu\text{g/ml}$ ) byly aplikovány na *in vitro* model rány a jak se předpokládalo kvůli lepšímu transdermálnímu transportu, pouze vezikuly byly schopny podpořit uzavření poškrábané oblasti již po 24 hodinách, zatímco disperze umožnily uzavření rány až po 48 hodinách. Pozitivní vliv oleuropeinu na hojení ran byl také prokázán v *in vivo* studii Mehraein F. a kol., kde podávali intradermální injekce (s dávkou 50 mg/kg) oleuropeinu myším Balb/c, které měli na zádech vytvořenou řeznou ránu, a pozorovali urychlení reepitelizace a tvorby kolagenních vláken (Mehraein et al., 2014).

Připravený *in vitro* model rány byl také indukovan pomocí LPS, pro simulaci infekce v ráně a tvorbu prozánětlivých markerů buňkami. Během studie byly stanoveny hladiny MMP-1, MMP-2, IL-6 a IL-8 (Sklenářová et al., 2021). Prozánětlivé mediátory stimulují infiltraci a aktivaci neutrofilů a dalších fagocytárních buněk do rány, čímž indukují zánět

a tvorbu volných radikálů spolu s aktivací MMPs, které se podílejí na remodelaci dermis prostřednictvím degradace kolagenu a dalších proteinů extracelulární matrix (Nissinen & Kähäri, 2014). Za fyziologických podmínek je množství MMP v kůži velmi nízké, protože jsou udržovány v neaktivní formě díky jejich vazbě na endogenní inhibitory (Visse, 2003), (Cabral-Pacheco et al., 2020). Stimulace nebo prodloužení zánětlivého procesu vede ke zvýšené produkci velkého množství MMP (např. MMP-1, MMP-2) (Brennan et al., 2003).

V naší práci jsme potvrdily, že všechny testované vezikulární formulace (liposomy, transfersomy, hyalurosomy a hyalutransfersomy) byly v subtoxických koncentracích schopné inhibovat produkci MMP-1, která byla indukovaná pomocí LPS. Aktivita bioaktivních látek (oleuropeinu a lentiškového oleje) je tedy schopna zabránit degradaci kolagenu I. Zvýšenou produkci kolagenu pozorovali rovněž Khedir a kol. v *in vivo* studii po aplikaci lentiškového oleje na hojení popálenin způsobených laserem u potkanů (Khedir et al., 2017). Což je v souladu se studií provedenou na králících s laserovými dermálními popáleninami, která prokázala, že lentiškový olej stimuluje kontrakci rány a zkracuje dobu reepitelizace (Djerrou et al., 2013). Rovněž oleuropein je schopný potlačovat expresi kolagenázy I, jak ukazuje *in vitro* studie Castejón ML a kol. prováděná na buněčné linii lidského synoviálního sarkomu, kde oleuropein (50 a 100  $\mu$ M) snižoval expresi nejen MMP-1 ale také MMP-3 a zánětlivých markerů, jako jsou TNF- $\alpha$  a IL-6 (Castejón et al., 2017).

Hladina IL-6, která byla v *in vitro* modelu indukovaná pomocí LPS, byla účinně inhibována po aplikaci testovaných formulací, zejména s použitím nižší koncentrace (0,2  $\mu$ g/ml). Toto zjištění je nejen v souladu s předchozí studií Castejón ML a kol., ale také s *in vivo* studií na myších, kterým byla vyvolána sepse pomocí LPS a po injekčním podáním oleuropeinu došlo k potlačení stanovovaných zánětlivých markerů (IL-6, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ ) (Alsharif et al., 2020). Také požití lentiškového oleje pro snížení IL-6 u LPS indukovaných lidských mononukleárních buněk periferní krve bylo již publikováno (Di Pierro et al., 2021).

Inhibice produkce chemokinů IL-8 byla méně účinná a byla zřejmá pouze v případě, když byly LPS stimulované NHDF ošetřeny liposomy a transferomy v nižší koncentraci



(0,2 µg/ml). Navzdory neúčinné inhibici IL-8 jsou získané výsledky povzbudivé, protože IL-6 se většinou podílí na kontrole produkce IL-8 (Romano et al., 1997), (Wang et al., 2009).

Celkové výsledky prokázaly, že začlenění bioaktivních látek (oleuropeinu a těch obsažených v oleji lentišku) do fosfolipidových vezikul zvýšilo jejich aktivitu proti zánětlivým procesům a urychlilo proces uzavírání rány *in vitro*.

### **6.3 Charakterizace kompozitních PCL membrán**

V předkládané práci byly charakterizovány kompozitní PCL membrány, které mají tvořit součást vrstveného implantátu pro rekonstrukci nosní přepážky. Tyto materiály pro osteochondrální reparace jsou navrhovány jak pro podporu hojení chrupavky, tak i kostní tkáň (Rajzer et al., 2023). PCL je v klinických studiích jedním z nově používaných materiálů pro rhinoplastiku, a to především díky svým vlastnostem jako je biokompatibilita, biologická rozložitelnost a dobrým mechanickým vlastnostem. PCL vykazuje lepší mechanickou pevnost než jiné biologicky resorbovatelné polymerní materiály a zároveň, doba degradace tohoto materiálu je dostatečná k integraci s životaschopnou hostitelskou tkání (Park et al., 2019), (Rajzer et al., 2017). Dalším materiálem, který byl úspěšně použit při rekonstrukci nosu, je biosklo (BG; obvykle složené ze  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$  a  $\text{Na}_2\text{O}$ ), což je typ bioaktivního keramického materiálu rozšířeného v tkáňovém inženýrství, který má vynikající biologickou aktivitu a podporuje osteogenezi (Vale et al., 2019). Kromě toho také indukuje angiogenezi a proliferaci buněk (Baino et al., 2018).

V této práci byly testovány tři typy membrán: PCL, PCL s biosklem (PCL-BG) a PCL s biosklem s přídavkem Zn (PCL-BG Zn) vyrobené metodou elektrostatického zvlákňování. Začlenění iontů zinku do nosních implantátů by mohlo potenciálně

poskytnout antibakteriální vlastnosti pro snížení nebo odstranění bakteriálních infekcí a následných chirurgických komplikací (Rajzer et al., 2019), (Rajzer et al., 2023).

U provedených *in vitro* experimentů můžeme pozorovat velmi dobrou biokompatibilitu všech testovaných PCL membránám k SaOs-2 buněčné linii, a to jak po 24 hodinách, tak po 14 dnech kultivace SaOS-2 na těchto biomateriálech. Výsledky ukazují, že materiály popsané v této práci vykazují stimulaci adheze, proliferace, migrace a diferenciaci buněk. Urychlují tak procesy kostní regenerace a mohou být využity jako tkáňové náhrady. Tyto výsledky biokompatibility PLC membrán se shodují s již dříve publikovanou biokompatibilitou PLC membrán obohacených o hydroxyapatit a polyanilin PLC obohacené o oktalcalcium fosfát. (Heydari et al., 2017) nebo PCL obohacené o grafen (Dias et al., 2021) testovaných na lidských osteoblastech a (Rajzer et al., 2021), .

3D materiály na bázi PCL mají velkou budoucnost v tkáňovém inženýrství a již nyní je publikována řada studií, ve kterých vědci usilují o modifikaci tohoto materiálu pro zlepšení jeho biologických vlastností. Například ve studii publikované Świętek a kol. zjistili, že začlenění uhlíkových nanotrubic a magnetických nanočástic oxidu železa do PCL, stimulovalo buněčnou adhezi a metabolickou aktivitu SaOS-2 v porovnání se samotným PCL (Świętek et al., 2019). To je v souladu také se studií Mancuso a kol. kteří potvrdili, že kompozitní materiály PCL s keramickými částicemi BaTiO<sub>3</sub> vykazovaly vyšší adhezi SaOS-2, také vyšší mineralizaci (aktivitu ALP) a ukládání kostní extracelulární matrix (osteokalcinu a kolagenu I) oproti samotnému PCL (Mancuso et al., 2021).

## 6.4 Charakterizace kompozitních biofilmů

V rámci předkládané disertační práce byly charakterizovány nanokompozitní materiály na bázi přírodních polymerů. Těmto materiálům se v současné době věnuje velká pozornost, a to především díky jejich vlastnostem, jako je snadná extrakce a výborná biokompatibilita. Nicméně jednotlivým přírodním polymerům, jako je škrob, celulóza, chitosan, chitin a kyselina hyaluronová, chybí některé vlastnosti syntetických materiálů, například nízký modul pružnosti, mechanická, chemická i tepelná stabilita a rychlá degradace. Proto by zejména kombinace polymerních látek z přírodních materiálů spolu s nanočásticemi mohla zvýšit jejich mechanickou pevnost a zlepšit vlastnosti degradace (Abdelrahman et al., 2020), (Abdel-Rahman et al., 2022).

Základní složkou testovaných kompozitních biofilmů byl HA. Je to glykosaminoglykan, tvořený disacharidovými jednotkami kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosaminem (Almond, 2007). Význam hyaluronanu v jednotlivých fázích procesu hojení je různorodý, což má vliv na migraci a proliferaci buněk, modifikaci zánětlivé odpovědi a na angiogenezi (King & Sorooshian, 2020).

V současné době je HA široce používán díky svým jedinečným vlastnostem jako je biokompatibilita, netoxičnost, vysoká biologická rozložitelnost, hydrofilnost a schopnost urychlit hojivý proces. Může být připraven v různých formách, jako jsou hydrogely (Burdick & Prestwich, 2011), (Yazdani et al., 2019), vlákna (Abdel-Mohsen et al., 2017), (Abdel-Mohsen et al., 2012) nebo biofilmy (Zhai et al., 2020). Hyaluronan vykazuje špatnou mechanickou stabilitu a sám nemá antimikrobiální vlastnosti, což může zapříčinit časté kontaminace tohoto materiálu a prodloužení doby hojení. Proto byl v naší práci testován připravený spolu s částečně deacetylovanými chitinovými nanovláknky (ChNWs) nebo v kombinaci s PVA a nanočásticemi ZnO. Chitin a jeho částečně deacetylovaná forma chitosan, mají výbornou biokompatibilitu, nízkou hustotu, dobrou mechanickou pevnost a lze je převést na nanovláknka (Abdel-Rahman et al., 2015).

V předložené práci byla hodnocena cytotoxicita a biokompatibilita nanokompozitních biofilmů HA/ChNWs, na buňkách SaOS-2 tak i na NHDF. Tyto buňky byly vybrány s ohledem na budoucí aplikaci nanokompozitních biofilmů jako krytí na kožní rány, kostní defekty nebo systém pro transport léčiv. Na základě testu MTT bylo stanoveno,

že žádný z připravených nanokompozitních biofilmů není pro buňky toxický. Podobné výsledky byly publikovány i ve studii Hassan a kol. při testování chitosanu s HA, kde tento materiál testovali jak *in vitro* na myších fibroblastech, tak *in vivo* na myších (myši Wister), a zjistili výbornou biokompatibilitu, zmenšení oblasti rány a zvýšenou reepitelizaci tkáně (Hassan et al., 2021).

V naší práci byl HA rovněž testován i v kombinaci s PVA a nanočásticemi ZnO, které vykazují antimikrobiální aktivitu proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím (Kumar, et al., 2017). Nanočástice ZnO také zlepšují proces regenerace tkání a neovaskularizaci (Manuja et al., 2020). Cytotoxicita a biokompatibilita těchto biofilmů byla testována na buňkách NHDF. Viabilita byla stanovena MTT testem a bylo prokázáno že po 24hodinách žádný z připravených biofilmů nebyl pro buňky toxický (viabilita byla vyšší než 80 %). A zároveň NHDF na jednotlivých biofilmech velmi dobře proliferovaly. Výsledky biokompatibility materiálů jsou v souladu s novou studií El-Aassara a kol. (El-Aassar et al., 2021), kteří testovali nanovláknitý materiál připravený kombinací HA, PVA a polyethylenoxidu doplněný o kombinaci ZnO nanočástic a skořicový esenciální olej. V této studii potvrdily jejich výbornou biokompatibilitu, dobrou hydrofilnost, pevnost v tahu a antimikrobiální vlastnosti (inhibici růstu *S. aureus*).

## 7 Závěr

Ze získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry:

### ***7.1 Efekt myricetinu a dihydromyricetinu na proces hojení ran in vitro***

Flavonoidy MYR a DHM potlačovaly zánětlivou reakci vyvolanou škrábnutím a přidavkem LPS v primárních kulturách NHDF a NHEK. Oba flavonoidy, v koncentračním rozmezí od 5 do 15  $\mu\text{M}$ , byly účinné při potlačování exprese transkripčních faktorů NF- $\kappa\text{B}$  a Nrf2, dále také COX-2 v LPS infikovaných NHDF a NHEK. Rovněž jsme potvrdily pokles produkce IL-6 a IL-8 po 24hodinovém působení MYR a DHM. Oba testované flavonoidy vykazovaly anti-glykační aktivitu.

### ***7.2 Efekt oleuropeinu a oleje z lentišku na proces hojení ran in vitro***

V naší práci jsme potvrdily, že všechny testované vezikulární formulace obsahující oleuropein a olej z lentišku (liposomy, transfersomy, hyalurosomy a hyalutransfersomy) byly schopny podpořit uzavření poškrábané oblasti již po 24 hodinách, zatímco jejich disperze umožnila uzavření rány *in vitro* až po 48 hodinách. Dále byly v subtoxických koncentracích schopné inhibovat produkci MMP-1 a IL-6, které byly indukovány pomocí LPS.

### ***7.3 Charakterizace kompozitních PCL membrán***

V této práci byly testovány tři typy membrán: PCL, PCL s biosklem (PCL-BG) a PCL s biosklem doplněným Zn (PCL-BG Zn) vyrobené metodou elektrostatického zvláknování. Testované materiály nevykazovaly cytotoxicitu a všechny vykazovaly dobrou biokompatibilitu k SaOS-2 buňkám to jak po 24 hodinách, tak po 14denní kultivaci na těchto biomateriálech.

#### ***7.4 Charakterizace kompozitních biofilmů***

Testované nanokompozitní biofilmy připravené v různých poměrech HA a ChNWs, nebyly cytotoxické a měly srovnatelné výsledky biokompatibility jak při testování na buňkách SaOS-2 tak na NHDF. V naší práci byl HA rovněž testován i v kombinaci s PVA a nanočásticemi ZnO, které mají antimikrobiální aktivitu. Cytotoxicita a biokompatibilita těchto biofilmů byla testována na buňkách NHDF a po 24hodinách žádný z připravených biofilmů nebyl pro buňky toxický. NHDF na jednotlivých biofilmech i velmi dobře proliferovaly.

## 8 Seznam prací vztahujících se k disertaci

### Publikace:

**Sklenářová, R.**, Allaw M., Perra M., Castangia I., Franková J., Pedraz JL., Manca ML, Manconi M. Co-delivering of oleuropein and lentisk oil in phospholipid vesicles as an effective approach to modulate oxidative stress, cytokine secretion and promote skin regeneration. *Eur J Pharm and Biopharm.* 2023, 185, 23, 126-136. doi:10.1016/j.ejpb.2023.02.018

**Novotná, R.**, Škařupová, D., Hanyk, J., Ulrichová, J., Křen, V., Bojarová, P., Brodsky, K., Vostálová, J., Franková, J. Hesperidin, Hesperetin, Rutinose, and Rhamnose Act as Skin Anti-Aging Agents. *Molecules* 2023, 28, 1728. doi: 10.3390/molecules28041728

Rajzer, I., Kurowska, A., Franková, J., **Sklenářová, R.**, Nikodem, A., Dziadek, M., Jabłoński, A., Janusz, J., Szczygieł, P., Ziábka, M. 3D-Printed Polycaprolactone Implants Modified with Bioglass and Zn-Doped Bioglass. *Materials* 2023, 16, 1061. doi: 10.3390/ma16031061

**Sklenářová, R.**, Akla, N., Latorre, M.J., Ulrichová, J., Franková, J. Collagen as a Biomaterial for Skin and Corneal Wound Healing. *J. Funct. Biomater.* 2022, 13, 249. doi: 10.3390/jfb13040249

Abdel-rahman, R. M., J. Franková, **R. Sklenářová**, L. Kapralková, I. Kelnar, A. M. Abdel-mohsen. Hyaluronan/Zinc Oxide Nanocomposite-Based Membrane: Preparation, Characterization, and *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation. *ACS Applied Polymer Materials.* 2022, 4(10), 7723-7738. ISSN 2637-6105. doi:10.1021/acsapm.2c01296

**Sklenářová, R.**, Svrčková, M., Hodek, P., Ulrichová, J., Franková, J. Effect of the natural flavonoids myricetin and dihydromyricetin on the wound healing process *in vitro*. *J Appl Biomed* 2021, 19(3), 149-158. doi: 10.32725/jab.2021.017

Abdel-rahman, R. M., Abdel-Mohsen, A. M., Zboncak, M., Franková, J., Lepcio, P., Kobera, L., Steinhart, M., Pavlinak, D., Spotaz, Z., **Sklenářová, R.**, Brus, J., Jančář, J. Hyaluronan biofilms reinforced with partially deacetylated chitin nanowhiskers:

Extraction, fabrication, in-vitro and antibacterial properties of advanced nanocomposites. Carbohydrate polymers 2020, 235, 115951. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115951

**Prezentace na konferencích:**

**Sklenářová R.**, Franková J., Ulrichová J. Effect of natural flavonoids – myricetin and dihydromyricetin on the wound healing process *in vitro*. The 43rd FEBS Congress Biochemistry forever 2018, Praha, Česká Republika, 7.-12.7. 2018, FEBS Open Bio, Vol.8 (Suppl.1), doi: 10.1002/2211-5463.12453

**Sklenářová R.**, Ulrichová J., Franková J. Roles of myricetin and dihydromyricetin on regulation inflammatory response *in vitro*. The 44rd FEBS Congress 2019, Krakow, Poland, 6.-11.7. 2019, FEBS Open Bio, Vol.9 (Suppl.1), doi: 10.1002/2211-5463.12675

Franková J., Abdel-rahman R.M., **Sklenářová R.**, Abdel-Mohsen A.M., Ulrichová J., Jančář J. The toxicity and biocompatibility of the film based on natural polymers (chitosan-hyaluronic acid). 71. Zjazd chemikov, Vysoké Tatry, Horný Smokovec, Slovenská Republika, 9.-13.9. 2019, ChemZi 15/1 (2019)

**Sklenářová R.**, Allaw M., Manca M.L., Manconi M., Franková J. Vliv přírodních látek – Oleuropeinu a oleje z Lentišku na proces hojení ran *in vitro*. 18. Vedecko-pedagogická konferencia učiteľov biochemických odborov lekárskech fakúlt v SR a ČR, Malá hora, Martin, Slovenská Republika, 16.-19.6. 2022

**Sklenářová R.**, Škařupová D., Hanyk J., Ulrichová J., Křen V., Bojarová P., Brodsky K., Vostálová J., Franková J. Effect of hesperidin, hesperetin, rutinose, and rhamnose on skin aging. The Biochemistry Global Summit, Lisbon, Portugal, 9.-14.7. 2022, FEBS Open Bio, Vol.12 (Suppl.1), doi: 10.1002/2211-5463.13440

Škařupová D., **Sklenářová R.**, Hanyk J., Ulrichová J., Křen V., Bojarová P., Brodsky K., Franková J., Vostálová J. Collagenase, Elastase, Hyaluronidase inhibition by hesperidin and its structural part hesperetin, rutinose, and rhamnose. The Biochemistry Global



Summit, Lisbon, Portugal, 9.-14.7. 2022, FEBS Open Bio, Vol.12 (Suppl.1), doi: 10.1002/2211-5463.13440

Škařupová D., **Sklenářová R.**, Hanyk J., Ulrichová J., Křen V., Bojarová P., Brodsky K., Franková J., Vostálová J. Effect of hesperidin and its structural part hesperetin, rutinose and rhamnose on collagen I and matrix metalloproteinase 1 production in the normal dermal human fibroblasts. 13th Annual Meeting on Skin Ageing & Challenges, Lisbon, Portugal, 16.-18.11. 2022

**Sklenářová R.**, Škařupová D., Hanyk J., Ulrichová J., Křen V., Bojarová P., Brodsky K., Vostálová J., Franková J. Skin aging. The 19th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Králové, Czech Republic, November 24-25. 2022

## 9 Literatura

- Abatangelo, G., Vindigni, V., Avruscio, G., Pandis, L., & Brun, P. (2020). Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*, 9(7), 1743. <https://doi.org/10.3390/cells9071743>
- Abdel-Mohsen, A., Hrdina, R., Burgert, L., Krylová, G., Abdel-Rahman, R., Krejčová, A., Steinhart, M., & Beneš, L. (2012). Green synthesis of hyaluronan fibers with silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 411-422. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.022>
- Abdel-Mohsen, A., Jancar, J., Abdel-Rahman, R., Vojtek, L., Hyršl, P., Dušková, M., & Nejezchlebová, H. (2017). A novel in situ silver/hyaluronan bio-nanocomposite fabrics for wound and chronic ulcer dressing: *In vitro* and *in vivo* evaluations. *International Journal of Pharmaceutics*, 520(1-2), 241-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.003>
- Abdel-Rahman, R., Frankova, J., Sklenarova, R., Kapralkova, L., Kelnar, I., & Abdel-Mohsen, A. (2022). Hyaluronan/Zinc Oxide Nanocomposite-Based Membrane: Preparation, Characterization, and *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation. *ACS Applied Polymer Materials*, 4(10), 7723-7738. <https://doi.org/10.1021/acsapm.2c01296>
- Abdel-Rahman, R., Abdel-Mohsen, A., Zboncak, M., Frankova, J., Lepcio, P., Kobera, L., Steinhart, M., Pavlinak, D., Spotaz, Z., Sklenářová, R., Brus, J., & Jancar, J. (2020). Hyaluronan biofilms reinforced with partially deacetylated chitin nanowhiskers: Extraction, fabrication, *in-vitro* and antibacterial properties of advanced nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 235, 115951. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115951>
- Abdel-Rahman, R., Hrdina, R., Abdel-Mohsen, A., Fouda, M., Soliman, A., Mohamed, F., Mohsin, K., & Pinto, T. (2015). Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 107-120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.027>
- Agrawal, P., Pramanik, K., & Bissoyi, A. (2018). Novel Blowspun Nanobioactive Glass Doped Polycaprolactone/Silk Fibroin Composite Nanofibrous Scaffold with Enhanced Osteogenic Property for Bone Tissue Engineering. *Fibers and Polymers*, 19(12), 2465-2477. <https://doi.org/10.1007/s12221-018-8601-5>
- Ahamad, J., Toufееq, I., Khan, M., Ameen, M., Anwer, E., Uthirapathy, S., Mir, S., & Ahmad, J. (2019). Oleuropein: A natural antioxidant molecule in the treatment of metabolic syndrome. *Phytotherapy Research*, 33(12), 3112-3128. <https://doi.org/10.1002/ptr.6511>

- Ahmed, S., Luo, L., Namani, A., Wang, X., & Tang, X. (2017). Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1863*(2), 585-597. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed). Garland Science. ISBN:0-8153-3218-1.
- Allaw, M., Manca, M., Gómez-Fernández, J., Pedraz, J., Terencio, M., Sales, O., Nacher, A., & Manconi, M. (2021). Oleuropein multicompartiment nanovesicles enriched with collagen as a natural strategy for the treatment of skin wounds connected with oxidative stress. *Nanomedicine*, *16*(26), 2363-2376. <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0197>
- Allaw, M., Manconi, M., Caboni, P., Bacchetta, G., Escribano-Ferrer, E., Peris, J., Nacher, A., Diez-Sales, O., & Manca, M. (2021). Formulation of liposomes loading lentisk oil to ameliorate topical delivery, attenuate oxidative stress damage and improve cell migration in scratch assay. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *144*, 112351. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112351>
- Almond, A. (2007). Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(13), 1591-1596. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7032-z>
- Alsharif, K., Almalki, A., Al-Amer, O., Mufti, A., Theyab, A., Lokman, M., Ramadan, S., Almeer, R., Hafez, M., Kassab, R., & Abdel Moneim, A. (2020). Oleuropein protects against lipopolysaccharide-induced sepsis and alleviates inflammatory responses in mice. *IUBMB Life*, *72*(10), 2121-2132. <https://doi.org/10.1002/iub.2347>
- Alvira, C. (2014). Nuclear factor-kappa-B signaling in lung development and disease: One pathway, numerous functions. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, *100*(3), 202-216. <https://doi.org/10.1002/bdra.23233>
- Ambrozova, N., Ulrichova, J., & Galandakova, A. (2017). Models for the study of skin wound healing. The role of Nrf2 and NF- $\kappa$ B. *Biomedical Papers*, *161*(1), 1-13. <https://doi.org/10.5507/bp.2016.063>
- Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, *32*(1), 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>
- Armiento, A., Stoddart, M., Alini, M., & Eglin, D. (2018). Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta Biomaterialia*, *65*, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.021>
- Aya, K., & Stern, R. (2014). Hyaluronan in wound healing: Rediscovering a major player. *Wound Repair and Regeneration*, *22*(5), 579-593. <https://doi.org/10.1111/wrr.12214>

- Baino, F., Hamzehlou, S., & Kargozar, S. (2018). Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going?. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(1), 25. <https://doi.org/10.3390/jfb9010025>
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), 585-601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>
- Benhammou, N., Atik Bekkara, F., & Kadifkova Panovska, T. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2), 022-028. <https://doi.org/10.5897/AJPP.9000056>
- Blair, M., Jones, J., Woessner, A., & Quinn, K. (2020). Skin Structure–Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging. *Advances in Wound Care*, 9(3), 127-143. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1021>
- Bonewald, L. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), 229-238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
- Bouwstra, J., & Ponc, M. (2006). The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(12), 2080-2095. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.06.021>
- Brennan, M., Bhatti, H., Nerusu, K., Bhagavathula, N., Kang, S., Fisher, G., Varani, J., & Voorhees, J. (2003). Matrix Metalloproteinase-1 is the Major Collagenolytic Enzyme Responsible for Collagen Damage in UV-irradiated Human Skin. *Photochemistry and Photobiology*, 78(1), 43-48. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0780043MMITMC2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780043MMITMC2.0.CO2)
- Burdick, J., & Prestwich, G. (2011). Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials*, 23(12), H41-H56. <https://doi.org/10.1002/adma.201003963>
- Cabral-Pacheco, G., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuña, J., Perez-Romero, B., Guerrero-Rodriguez, J., Martinez-Avila, N., & Martinez-Fierro, M. (2020). The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>
- Castejón, M., Rosillo, M., Montoya, T., González-Benjumea, A., Fernández-Bolaños, J., & Alarcón-de-la-Lastra, C. (2017). Oleuropein down-regulated IL-1 $\beta$ -induced inflammation and oxidative stress in human synovial fibroblast cell line SW982. *Food & function*, 8(5), 1890-1898. <https://doi.org/10.1039/C7FO00210F>

Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(3), S131-S139. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>

Congiu, R., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A., & Porcedda, S. (2002). Extraction and isolation of Pistacia lentiscus L. essential oil by supercritical CO<sub>2</sub>. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(4), 239-244. <https://doi.org/10.1002/ffj.1095>

Cristiano, M., Froiio, F., Mancuso, A., Cosco, D., Dini, L., Di Marzio, L., Fresta, M., & Paolino, D. (2021). Oleuropein-Laded Ufasomes Improve the Nutraceutical Efficacy. *Nanomaterials*, 11(1), 105. <https://doi.org/10.3390/nano11010105>

Cui, N., Hu, M., & Khalil, R. (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Matrix Metalloproteinases and Tissue Remodeling in Health and Disease: Cardiovascular Remodeling*, (147), 1-73. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>

De Pessemier, B., Grine, L., Debaere, M., Maes, A., Paetzold, B., & Callewaert, C. (2021). Gut–Skin Axis: Current Knowledge of the Interrelationship between Microbial Dysbiosis and Skin Conditions. *Microorganisms*, 9(2), 353. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020353>

Demling, R. (2009). Nutrition, anabolism, and the wound healing process: an overview. *Eplasty*, (9), e9.

Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Lafont, J., Denoix, J., Audigié, F., Mallein-Gerin, F., Legendre, F., & Galera, P. (2014). Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), 2414-2440. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.030>

Di Pierro, F., Sagheddu, V., Galletti, S., Forti, M., Elli, M., Bertuccioli, A., & Gaeta, S. (2021). Antibacterial Activity of a Fractionated Pistacia lentiscus Oil Against Pharyngeal and Ear Pathogens, Alone or in Combination With Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 12, 686942. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.686942>

Dias, D., Vale, A., Cunha, E., Paiva, M., Reis, R., Vaquette, C., & Alves, N. (2021). 3D -printed cryomilled poly( $\epsilon$ -caprolactone)/graphene composite scaffolds for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(7), 961-972. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34761>

DiPietro, L. (2016). Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(5), 979-984. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0316-102R>

Djerrou, Z., Bensari, C., Bachtarzi, K., Djaalab, H., Riachi, F., Maameri, Z., & Hamdi Pacha, Y. (2013). Safety and efficacy of Pistacia lentiscus L. fruit's fatty oil for the

treatment of dermal burns: A synthesis report. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 3, 464-469.

Douissa, F., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A., & Dijoux-Franca, M. (2005). New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(4), 410-414. <https://doi.org/10.1002/ffj.1445>

Dréno, B., Araviiskaia, E., Berardesca, E., Gontijo, G., Sanchez Viera, M., Xiang, L., Martin, R., & Bieber, T. (2016). Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(12), 2038-2047. <https://doi.org/10.1111/jdv.13965>

Eftekhari, H., Jahandideh, A., Asghari, A., Akbarzadeh, A., & Hesarakhi, S. (2016). Assessment of polycaprolacton (PCL) nanocomposite scaffold compared with hydroxyapatite (HA) on healing of segmental femur bone defect in rabbits. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(5), 961-968. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1198360>

El-Aassar, M., El-Beheri, N., Agwa, M., Eltaher, H., Alseqely, M., Sadik, W., & El-Khordagui, L. (2021). Antibiotic-free combinational hyaluronic acid blend nanofibers for wound healing enhancement. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1552-1563. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.109>

El-Gogary, R., Ragai, M., Moftah, N., & Nasr, M. (2021). Oleuropein as a novel topical antipsoriatic nutraceutical: formulation in microemulsion nanocarrier and exploratory clinical appraisal. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 18(10), 1523-1532. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1932813>

Ellis, S., Nguyen, M., Vaughn, A., Notay, M., Burney, W., Sandhu, S., & Sivamani, R. (2019). The Skin and Gut Microbiome and Its Role in Common Dermatologic Conditions. *Microorganisms*, 7(11), 550. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110550>

Eming, S., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr6-265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>

Fadaie, M., Mirzaei, E., Geramizadeh, B., & Asvar, Z. (2018). Incorporation of nanofibrillated chitosan into electrospun PCL nanofibers makes scaffolds with enhanced mechanical and biological properties. *Carbohydrate Polymers*, 199, 628-640. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.061>

Farndale, R., Sixma, J., Barnes, M., & De Groot, P. (2004). The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(4), 561-573. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00665.x>

- Firoznezhad, M., Castangia, I., Tuberoso, C., Cottiglia, F., Marongiu, F., Porceddu, M., Usach, I., Escribano-Ferrer, E., Manca, M., & Manconi, M. (2022). Formulation and *In Vitro* Efficacy Assessment of Teucrium marum Extract Loading Hyalurosomes Enriched with Tween 80 and Glycerol. *Nanomaterials*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/nano12071096>
- Frangogiannis, N. (2016). Fibroblast—Extracellular Matrix Interactions in Tissue Fibrosis. *Current Pathobiology Reports*, 4(1), 11-18. <https://doi.org/10.1007/s40139-016-0099-1>
- Franková, J., Pivodová, V., Vágnerová, H., Juránová, J., & Ulrichová, J. (2016). Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 14(2), 0-0. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000268>
- Fuchs, E., & Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19(4), 1033-1042. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90094-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90094-X)
- Ganesh Yerra, V., Negi, G., Sharma, S., & Kumar, A. (2013). Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathways in diabetic neuropathy. *Redox Biology*, 1(1), 394-397. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.005>
- Gao, W., Lee, S., Li, J., & Lee, J. (2015). Development of Improved Process with Treatment of Cellulase for Isolation of Ampelopsin from Dried Fruits of Ampelopsis grossedentata. *BioResources*, 11(1), 2712-2722. <https://doi.org/10.15376/biores.11.1.2712-2722>
- Gartner, L. (2020). *Textbook of Histology* (5th Edition). Elsevier. ISBN: 9780323672726.
- Golebiewska, E., & Poole, A. (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews*, 29(3), 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>
- Graça, M., Miguel, S., Cabral, C., & Correia, I. (2020). Hyaluronic acid—Based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 241, 116364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116364>
- Han, Y., Tuan, T., Wu, H., Hughes, M., & Garner, W. (2001). TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *Journal of Cell Science*, 114(1), 131-139. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.1.131>
- Haque, E., Kamil, M., Hasan, A., Irfan, S., Sheikh, S., Khatoon, A., Nazir, A., & Mir, S. (2020). Advanced glycation end products (AGEs), protein aggregation and their cross

talk: new insight in tumorigenesis. *Glycobiology*, 30(1), 2-18. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz073>

Haris Omar, S. (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78(2), 133-154. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-18>

Harris-Tryon, T., & Grice, E. (2022). Microbiota and maintenance of skin barrier function. *Science*, 376(6596), 940-945. <https://doi.org/10.1126/science.abo0693>

Hassan, M., Tamer, T., Valachová, K., Omer, A., El-Shafeey, M., Mohy Eldin, M., & Šoltés, L. (2021). Antioxidant and antibacterial polyelectrolyte wound dressing based on chitosan/hyaluronan/phosphatidylcholine dihydroquercetin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 18-31. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.119>

Hayden, D., Forsyth, C., & Keshavarzian, A. (2011). The Role of Matrix Metalloproteinases in Intestinal Epithelial Wound Healing During Normal and Inflammatory States. *Journal of Surgical Research*, 168(2), 315-324. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.03.002>

Heydari, Z., Mohebbi-Kalhari, D., & Afarani, M. (2017). Engineered electrospun polycaprolactone (PCL)/octacalcium phosphate (OCP) scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 81, 127-132. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.041>

Hiep, N., & Lee, B. (2010). Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(6), 1969-1978. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4048-y>

Hirano, T. (2021). IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *International Immunology*, 33(3), 127-148. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa078>

Hou, X., Tong, Q., Wang, W., Shi, C., Xiong, W., Chen, J., Liu, X., & Fang, J. (2015). Suppression of Inflammatory Responses by Dihydromyricetin, a Flavonoid from *Ampelopsis grossedentata*, via Inhibiting the Activation of NF- $\kappa$ B and MAPK Signaling Pathways. *Journal of Natural Products*, 78(7), 1689-1696. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00275>

Hu, T., Yuan, X., Wei, G., Luo, H., Lee, H., & Jin, W. (2018). Myricetin-induced brown adipose tissue activation prevents obesity and insulin resistance in db/db mice. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 391-403. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1433-z>

Hwang, S., Kim, H., Zuo, G., Wang, Z., Lee, J., & Lim, S. (2018). Anti-glycation, Carbonyl Trapping and Anti-inflammatory Activities of Chrysin Derivatives. *Molecules*, 23(7), 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules23071752>



- Chehoud, C., Rafail, S., Tyldsley, A., Seykora, J., Lambris, J., & Grice, E. (2013). Complement modulates the cutaneous microbiome and inflammatory milieu. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(37), 15061-15066. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307855110>
- Chen, M., & Dragoo, J. (2013). The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on tissue healing. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *21*(3), 540-549. <https://doi.org/10.1007/s00167-012-2095-2>
- Chen, Y., Fischbach, M., & Belkaid, Y. (2018). Skin microbiota–host interactions. *Nature*, *553*(7689), 427-436. <https://doi.org/10.1038/nature25177>
- Imran, M., Saeed, F., Hussain, G., Imran, A., Mehmood, Z., Gondal, T., El-Ghorab, A., Ahmad, I., Pezzani, R., Arshad, M., Bacha, U., Shariarti, M., Rauf, A., Muhammad, N., Shah, Z., Zengin, G., & Islam, S. (2021). Myricetin: A comprehensive review on its biological potentials. *Food science & nutrition*, *9*(10), 5854-5868. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2513>
- Iocono, J., Colleran, K., Remick, D., Gillespie, B., Ehrlich, H., & Garner, W. (2000). Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds. *Wound Repair and Regeneration*, *8*(3), 216-225. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2000.00216.x>
- Jang, J., Lee, S., Jung, K., Yoo, H., & Park, G. (2020). Inhibitory Effects of Myricetin on Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation. *Brain Sciences*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/brainsci10010032>
- Jiang, S., Tang, X., Chen, M., He, J., Su, S., Liu, L., He, M., & Xue, W. (2019). Design, synthesis and antibacterial activities against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* and *Ralstonia solanacearum* of novel myricetin derivatives containing sulfonamide moiety. *Pest Management Science*, *76*(3), 853-860. <https://doi.org/10.1002/ps.5587>
- Jing, N., & Li, X. (2019). Dihydromyricetin attenuates inflammation through TLR4/NF-kappaB pathway. *Open Medicine*, *14*(1), 719-725. <https://doi.org/10.1515/med-2019-0083>
- Johnson, T., Gómez, B., McIntyre, M., Dubick, M., Christy, R., Nicholson, S., & Burmeister, D. (2018). The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets to Promote Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2699. <https://doi.org/10.3390/ijms19092699>
- Junqueira, C. (2002). *Základy histologie* (1. Vydání). H&H. ISBN: 8085787377.
- Juráňová, J., Aury-Landas, J., Boumediene, K., Baugé, C., Biedermann, D., Ulrichová, J., & Franková, J. (2019). Modulation of Skin Inflammatory Response by Active

Components of Silymarin. *Molecules*, 24(1), 123. <https://doi.org/10.3390/molecules24010123>

Kan, X., Liu, B., Guo, W., Wei, L., Lin, Y., Guo, Y., Gong, Q., Li, Y., Xu, D., Cao, Y., Huang, B., Dong, A., Ma, H., Fu, S., & Liu, J. (2019). Myricetin relieves LPS-induced mastitis by inhibiting inflammatory response and repairing the blood–milk barrier. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 16252-16262. <https://doi.org/10.1002/jcp.28288>

Khedir, S., Bardaa, S., Chabchoub, N., Moalla, D., Sahnoun, Z., & Rebai, T. (2017). The healing effect of Pistacia lentiscus fruit oil on laser burn. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1407-1414. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1233569>

King, I., & Sorooshian, P. (2020). Hyaluronan in skin wound healing: therapeutic applications. *Journal of Wound Care*, 29(12), 782-787. <https://doi.org/10.12968/jowc.2020.29.12.782>

Kobayashi, E., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., & Yamamoto, M. (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Communications*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/ncomms11624>

Komi, D., Khomtchouk, K., & Santa Maria, P. (2020). A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 58(3), 298-312. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08729-w>

Kuhn, K., Manieri, N., Liu, T., Stappenbeck, T., & Karhausen, J. (2014). IL-6 Stimulates Intestinal Epithelial Proliferation and Repair after Injury. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114195>

Kumar, R., Umar, A., Kumar, G., & Nalwa, H. (2017). Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceramics International*, 43(5), 3940-3961. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.12.062>

Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A., Wu, Z., Hooper, L., Schmidt, R., von Aulock, S., Radek, K., Huang, C., Ryan, A., & Gallo, R. (2009). Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3–dependent inflammation after skin injury. *Nature Medicine*, 15(12), 1377-1382. <https://doi.org/10.1038/nm.2062>

Lambert, S., Jolma, A., Campitelli, L., Das, P., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T., & Weirauch, M. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell*, 172(4), 650-665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>

Lauer, G., Sollberg, S., Cole, M., Krieg, T., Eming, S., Flamme, I., Stürzebecher, J., & Mann, K. (2000). Expression and Proteolysis of Vascular Endothelial Growth Factor is

Increased in Chronic Wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(1), 12-18. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00036.x>

Lee, D., & Lee, C. (2016). Flavonoid myricetin inhibits TNF- $\alpha$ -stimulated production of inflammatory mediators by suppressing the Akt, mTOR and NF- $\kappa$ B pathways in human keratinocytes. *European Journal of Pharmacology*, 2016(784), 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.05.025>

Lee, K., Kang, N., Han, J., Lee, K., & Lee, H. (2007). Myricetin Down-Regulates Phorbol Ester-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in Mouse Epidermal Cells by Blocking Activation of Nuclear Factor Kappa B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9678-9684. <https://doi.org/10.1021/jf0717945>

Lei, J., Wei, Y., Song, P., Li, Y., Zhang, T., Feng, Q., & Xu, G. (2018). Cordycepin inhibits LPS-induced acute lung injury by inhibiting inflammation and oxidative stress. *European Journal of Pharmacology*, 818, 110-114. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.029>

Lesage, C., Lafont, M., Guihard, P., Weiss, P., Guicheux, J., & Delplace, V. (2022). Material-Assisted Strategies for Osteochondral Defect Repair. *Advanced Science*, 9(16), e2200050. <https://doi.org/10.1002/advs.202200050>

Li, H., Li, Q., Liu, Z., Yang, K., Chen, Z., Cheng, Q., & Wu, L. (2017). The Versatile Effects of Dihydromyricetin in Health. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2017/1053617>

Li, M., Hou, Q., Zhong, L., Zhao, Y., & Fu, X. (2021). Macrophage Related Chronic Inflammation in Non-Healing Wounds. *Frontiers in Immunology*, 12, 681710. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.681710>

Linehan, J., Harrison, O., Han, S., Byrd, A., Vujkovic-Cvijin, I., Villarino, A., Sen, S., Shaik, J., Smelkinson, M., Tamoutounour, S., Collins, N., Bouladoux, N., Dzutsev, A., Rosshart, S., Arbuckle, J., Wang, C., Kristie, T., Rehmann, B., Trinchieri, G. et al. (2018). Non-classical Immunity Controls Microbiota Impact on Skin Immunity and Tissue Repair. *Cell*, 172(4), 784-796.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.033>

Litwiniuk, M., Krejner, A., Speyrer, M., Gauto, A., & Grzela, T. (2016). Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds*, 28(3), 78-88.

Liu, D., Mao, Y., Ding, L., & Zeng, X. (2019). Dihydromyricetin: A review on identification and quantification methods, biological activities, chemical stability, metabolism and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 586-597. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.038>

- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Loesche, M., Gardner, S., Kalan, L., Horwinski, J., Zheng, Q., Hodkinson, B., Tyldsley, A., Franciscus, C., Hillis, S., Mehta, S., Margolis, D., & Grice, E. (2017). Temporal Stability in Chronic Wound Microbiota Is Associated With Poor Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(1), 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.08.009>
- Ma, H., Zhu, L., Ren, J., Rao, B., Sha, M., Kuang, Y., Shen, W., & Xu, Z. (2019). Myricetin inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma MHCC97H cell line by inhibiting the EMT process. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10998>
- Manca, M., Manconi, M., Meloni, M., Marongiu, F., Allaw, M., Usach, I., Peris, J., Escribano-Ferrer, E., Tuberoso, C., Gutierrez, G., Matos, M., & Ghavam, M. (2021). Nanotechnology for Natural Medicine: Formulation of Neem Oil Loaded Phospholipid Vesicles Modified with Argan Oil as a Strategy to Protect the Skin from Oxidative Stress and Promote Wound Healing. *Antioxidants*, 10(5), 670. <https://doi.org/10.3390/antiox10050670>
- Mancuso, E., Shah, L., Jindal, S., Serenelli, C., Tsikriteas, Z., Khanbareh, H., & Tirella, A. (2021). Additively manufactured BaTiO<sub>3</sub> composite scaffolds: A novel strategy for load bearing bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 126, 112192. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112192>
- Manuja, A., Raguvaran, R., Kumar, B., Kalia, A., & Tripathi, B. (2020). Accelerated healing of full thickness excised skin wound in rabbits using single application of alginate/acacia based nanocomposites of ZnO nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 823-833. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.221>
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53(1), 401-426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- Marsell, R., & Einhorn, T. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 551-555. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>
- Martins, V., Caley, M., & O'Toole, E. (2013). Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and Tissue Research*, 351(2), 255-268. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1410-z>
- Mehraein, F., Sarbishegi, M., & Aslani, A. (2014). Evaluation of Effect of Oleuropein on Skin Wound Healing in Aged Male Balb/c Mice. *Cell journal*, 16(1), 25-30.

- Mine, S., Fortunel, N., Pigeon, H., Asselineau, D., & Sullivan, B. (2008). Aging Alters Functionally Human Dermal Papillary Fibroblasts but Not Reticular Fibroblasts: A New View of Skin Morphogenesis and Aging. *PLoS ONE*, 3(12), e4066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004066>
- Miyoshi, S., Yamazaki, S., Uchiumi, A., & Katagata, Y. (2012). The Hsp90 inhibitor 17-AAG represses calcium-induced cytokeratin 1 and 10 expression in HaCaT keratinocytes. *FEBS Open Bio*, 2(1), 47-50. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2012.03.002>
- Moreci, R., & Lechler, T. (2020). Epidermal structure and differentiation. *Current Biology*, 30(4), R144-R149. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.004>
- Müller-Decker, K., Hirschner, W., Marks, F., & Fürstenberger, G. (2002). The Effects of Cyclooxygenase Isozyme Inhibition on Incisional Wound Healing in Mouse Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(5), 1189-1195. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.19501.x>
- Murphy, G., Flynn, T., Rice, R., & Pinkus, G. (1984). Involucrin Expression in Normal and Neoplastic Human Skin: A Marker for Keratinocyte Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 82(5), 453-457. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260945>
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), 562-573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>
- Nakatsuji, T., Chen, T., Narala, S., Chun, K., Two, A., Yun, T., Shafiq, F., Kotol, P., Bouslimani, A., Melnik, A., Latif, H., Kim, J., Lockhart, A., Artis, K., David, G., Taylor, P., Streib, J., Dorrestein, P., Grier, A. et al. (2017). Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Science Translational Medicine*, 9(378), eaah4680. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4680>
- Nediani, C., Ruzzolini, J., Romani, A., & Calorini, L. (2019). Oleuropein, a Bioactive Compound from *Olea europaea* L., as a Potential Preventive and Therapeutic Agent in Non-Communicable Diseases. *Antioxidants*, 8(12), 578. <https://doi.org/10.3390/antiox8120578>
- Nissinen, L., & Kähäri, V. (2014). Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), 2571-2580. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.007>
- Norlén, L., & Al-Amoudi, A. (2004). Stratum Corneum Keratin Structure, Function, and Formation: The Cubic Rod-Packing and Membrane Templating Model. *Journal of Investigative Dermatology*, 123(4), 715-732. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23213.x>

- Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(4), a000034. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>
- Oeckinghaus, A., Hayden, M., & Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nature Immunology*, 12(8), 695-708. <https://doi.org/10.1038/ni.2065>
- Oprita, E., Iosageanu, A., & Craciunescu, O. (2022). Progress in Composite Hydrogels and Scaffolds Enriched with Icariin for Osteochondral Defect Healing. *Gels*, 8(10), 648. <https://doi.org/10.3390/gels8100648>
- Pan, X., Chen, T., Zhang, Z., Chen, X., Chen, C., Chen, L., Wang, X., & Ying, X. (2019). Activation of Nrf2/HO-1 signal with Myricetin for attenuating ECM degradation in human chondrocytes and ameliorating the murine osteoarthritis. *International Immunopharmacology*, 75, 105742. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105742>
- Park, Y., Cha, J., Bang, S., & Kim, S. (2019). Clinical Application of Three-Dimensionally Printed Biomaterial Polycaprolactone (PCL) in Augmentation Rhinoplasty. *Aesthetic Plastic Surgery*, 43(2), 437-446. <https://doi.org/10.1007/s00266-018-1280-1>
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N., Ramirez, H., Nusbaum, A., Sawaya, A., Patel, S., Khalid, L., Isseroff, R., & Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care*, 3(7), 445-464. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0473>
- Patel, S., Maheshwari, A., & Chandra, A. (2016). Biomarkers for wound healing and their evaluation. *Journal of Wound Care*, 25(1), 46-55. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.1.46>
- Patil, K., Meshram, R., Barage, S., & Gacche, R. (2019). Dietary flavonoids inhibit the glycation of lens proteins: implications in the management of diabetic cataract. *3 Biotech*, 9(2), 47. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1581-3>
- Pivodova, V., Frankova, J., Dolezel, P., & Ulrichova, J. (2013). The Response of Osteoblast-Like SaOS-2 Cells to Modified Titanium Surfaces. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 28(5), 1386-1394. <https://doi.org/10.11607/jomi.3039>
- Poljšak, N., Kreft, S., & Kočevar Glavač, N. (2020). Vegetable butters and oils in skin wound healing: Scientific evidence for new opportunities in dermatology. *Phytotherapy Research*, 34(2), 254-269. <https://doi.org/10.1002/ptr.6524>
- Przekora, A. (2020). A Concise Review on Tissue Engineered Artificial Skin Grafts for Chronic Wound Treatment: Can We Reconstruct Functional Skin Tissue *In Vitro*?. *Cells*, 9(7), 1622. <https://doi.org/10.3390/cells9071622>

- Rajnochová Svobodová, A. (2012). *Poškození kůže působením slunečního záření, možnosti ochrany a prevence* (1. vydání). Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN: 978-80-244-3183-3.
- Rajzer, I., Dziadek, M., Kurowska, A., Cholewa-Kowalska, K., Ziábka, M., Menaszek, E., & Douglas, T. (2019). Electrospun polycaprolactone membranes with Zn-doped bioglass for nasal tissues treatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(7), 80. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6280-4>
- Rajzer, I., Kurowska, A., Frankova, J., Sklenářová, R., Nikodem, A., Dziadek, M., Jabłoński, A., Janusz, J., Szczygieł, P., & Ziábka, M. (2023). 3D-Printed Polycaprolactone Implants Modified with Bioglass and Zn-Doped Bioglass. *Materials*, 16(3), 1061. <https://doi.org/10.3390/ma16031061>
- Rajzer, I., Menaszek, E., & Castano, O. (2017). Electrospun polymer scaffolds modified with drugs for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.306>
- Rajzer, I., Rom, M., Menaszek, E., Fabia, J., & Kwiatkowski, R. (2021). Conductive Polyaniline Patterns on Electrospun Polycaprolactone/Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*, 14(17), 4837. <https://doi.org/10.3390/ma14174837>
- Ralston, S. (2021). Bone structure and metabolism. *Medicine*, 49(9), 567-571. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.06.009>
- Ramasastry, S. (2005). Acute Wounds. *Clinics in Plastic Surgery*, 32(2), 195-208. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2004.12.001>
- Rauter, A., Ennis, M., Hellwich, K., Herold, B., Horton, D., Moss, G., & Schomburg, I. (2018). Nomenclature of flavonoids (IUPAC Recommendations 2017). *Pure and Applied Chemistry*, 90(9), 1429-1486. <https://doi.org/10.1515/pac-2013-0919>
- Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., & Saparov, A. (2021). Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*, 11(5), 700. <https://doi.org/10.3390/biom11050700>
- Reinke, J., & Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35-43. <https://doi.org/10.1159/000339613>
- Reyes, R., Delgado, A., Sánchez, E., Fernández, A., Hernández, A., & Evora, C. (2012). Repair of an osteochondral defect by sustained delivery of BMP-2 or TGFβ1 from a bilayered alginate-PLGA scaffold. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(7), 521–533. <https://doi.org/10.1002/term.1549>
- Rippa, A., Kalabusheva, E., & Vorotelyak, E. (2019). Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells*, 8(6), 607. <https://doi.org/10.3390/cells8060607>

- Roger, M., Fullard, N., Costello, L., Bradbury, S., Markiewicz, E., O'Reilly, S., Darling, N., Ritchie, P., Määttä, A., Karakesisoglou, I., Nelson, G., von Zglinicki, T., Dicolandrea, T., Isfort, R., Bascom, C., & Przyborski, S. (2019). Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of Anatomy*, 234(4), 438-455. <https://doi.org/10.1111/joa.12942>
- Romani, A., Ieri, F., Urciuoli, S., Noce, A., Marrone, G., Nediani, C., & Bernini, R. (2019). Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*, 11(8), 1776. <https://doi.org/10.3390/nu11081776>
- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G., & Mantovani, A. (1997). Role of IL-6 and Its Soluble Receptor in Induction of Chemokines and Leukocyte Recruitment. *Immunity*, 6(3), 315-325. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80334-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80334-9)
- Roseti, L., Desando, G., Cavallo, C., Petretta, M., & Grigolo, B. (2019). Articular Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. *Cells*, 8(11), 1305. <https://doi.org/10.3390/cells8111305>
- Ryšavá, A., Čížková, K., Franková, J., Roubalová, L., Ulrichová, J., Vostálová, J., Vrba, J., Zálešák, B., & Rajnochová Svobodová, A. (2020). Effect of UVA radiation on the Nrf2 signalling pathway in human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209, 111948. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111948>
- Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E., & Saso, L. (2020). An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*, 25(22), 5474. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>
- Shaikh-Kader, A., Houreld, N., Rajendran, N., Abrahamse, H., & Prates, R. (2021). Levels of Cyclooxygenase 2, Interleukin-6, and Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  in Fibroblast Cell Culture Models after Photobiomodulation at 660 nm. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2021/6667812>
- Shamshoum, H., Vlacheski, F., & Tsiani, E. (2017). Anticancer effects of oleuropein. *BioFactors*, 43(4), 517-528. <https://doi.org/10.1002/biof.1366>
- Shevelev, A., La Porta, N., Isakova, E., Martens, S., Biryukova, Y., Belous, A., Sivokhin, D., Trubnikova, E., Zylkova, M., Belyakova, A., Smirnova, M., & Deryabina, Y. (2020). *In Vivo* Antimicrobial and Wound-Healing Activity of Resveratrol, Dihydroquercetin, and Dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. *Pathogens*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens9040296>
- Schilrreff, P., & Alexiev, U. (2022). Chronic Inflammation in Non-Healing Skin Wounds and Promising Natural Bioactive Compounds Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4928. <https://doi.org/10.3390/ijms23094928>



- Schreml, S., Szeimies, R., Prantl, L., Landthaler, M., & Babilas, P. (2010). Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *63*(5), 866-881. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.10.048>
- Siano, F., Cutignano, A., Moccia, S., Russo, G., Volpe, M., & Picariello, G. (2020). Phytochemical Characterization and Effects on Cell Proliferation of Lentisk (*Pistacia lentiscus*) Berry Oil: a Revalued Source of Phenolics. *Plant Foods for Human Nutrition*, *75*(4), 487-494. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00835-x>
- Siddiqui, N., Kishori, B., Rao, S., Anjum, M., Hemanth, V., Das, S., & Jabbari, E. (2021). Electropsun Polycaprolactone Fibres in Bone Tissue Engineering: A Review. *Molecular Biotechnology*, *63*(5), 363-388. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00311-0>
- Sklenarova, R., Allaw, M., Perra, M., Castangia, I., Frankova, J., Luis Pedraz, J., Letizia Manca, M., & Manconi, M. (2023). Co-delivering of oleuropein and lentisk oil in phospholipid vesicles as an effective approach to modulate oxidative stress, cytokine secretion and promote skin regeneration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *185*(23), 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.02.018>
- Sklenářová, R., Akla, N., Latorre, M., Ulrichová, J., & Franková, J. (2022). Collagen as a Biomaterial for Skin and Corneal Wound Healing. *Journal of Functional Biomaterials*, *13*(4), 249. <https://doi.org/10.3390/jfb13040249>
- Sklenářová, R., Svrčková, M., Hodek, P., Ulrichová, J., & Franková, J. (2021). Effect of the natural flavonoids myricetin and dihydromyricetin on the wound healing process *in vitro*. *Journal of Applied Biomedicine*, *19*(3), 149-158. <https://doi.org/10.32725/jab.2021.017>
- Soares, M., Seldon, M., Gregoire, I., Vassilevskaia, T., Berberat, P., Yu, J., Tsui, T., & Bach, F. (2004). Heme Oxygenase-1 Modulates the Expression of Adhesion Molecules Associated with Endothelial Cell Activation. *The Journal of Immunology*, *172*(6), 3553-3563. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3553>
- Song, X., Tan, L., Wang, M., Ren, C., Guo, C., Yang, B., Ren, Y., Cao, Z., Li, Y., & Pei, J. (2021). Myricetin: A review of the most recent research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *134*(111017). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111017>
- Surowiak, P., Gansukh, T., Donizy, P., Halon, A., & Rybak, Z. (2014). Increase in cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in keratinocytes and dermal fibroblasts in photoaged skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *13*(3), 195-201. <https://doi.org/10.1111/jocd.12103>
- Świątek, M., Brož, A., Tarasiuk, J., Wroński, S., Tokarz, W., Koziel, A., Błażewicz, M., & Bačáková, L. (2019). Carbon nanotube/iron oxide hybrid particles and their PCL-based 3D composites for potential bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, *104*, 109913. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109913>

- Tandara, A., & Mustoe, T. (2011). MMP- and TIMP-secretion by human cutaneous keratinocytes and fibroblasts – impact of coculture and hydration. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, 64(1), 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2010.03.051>
- Tang, N., Ma, J., Wang, K., Mi, C., Lv, Y., Piao, L., Xu, G., Li, X., Lee, J., & Jin, X. (2016). Dihydromyricetin suppresses TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and target gene expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 422(1-2), 11-20. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2799-6>
- Tomic-Canic, M., Burgess, J., O'Neill, K., Strbo, N., & Pastar, I. (2020). Skin Microbiota and its Interplay with Wound Healing. *American Journal of Clinical Dermatology*, 21(1), 36-43. <https://doi.org/10.1007/s40257-020-00536-w>
- Twardowski, T., Fertala, A., Orgel, J., & San Antonio, J. (2007). Type I Collagen and Collagen Mimetics as Angiogenesis Promoting Superpolymers. *Current Pharmaceutical Design*, 13(35), 3608-3621. <https://doi.org/10.2174/138161207782794176>
- Urios, P., Grigorova-Borsos, A., & Sternberg, M. (2007). Flavonoids inhibit the formation of the cross-linking AGE pentosidine in collagen incubated with glucose, according to their structure. *European Journal of Nutrition*, 46(3), 139-146. <https://doi.org/10.1007/s00394-007-0644-0>
- Usui, K., Kadono, N., Furuichi, Y., Shiraga, K., Saitou, T., Kawasaki, H., Toyooka, K., Tamura, H., Kubo, A., Amagai, M., & Matsui, T. (2019). 3D *in vivo* imaging of the keratin filament network in the mouse stratum granulosum reveals profilaggrin-dependent regulation of keratin bundling. *Journal of Dermatological Science*, 94(3), 346-349. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.04.006>
- Vale, A., Pereira, P., Barbosa, A., Torrado, E., & Alves, N. (2019). Optimization of silver-containing bioglass nanoparticles envisaging biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 94, 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.027>
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Visse, R. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), 827-839. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
- Wang, B., Xiao, Y., Yang, X., He, Y., Jing, T., Wang, W., Zhang, J., & Lin, R. (2018). Protective effect of dihydromyricetin on LPS-induced acute lung injury. *Journal of Leukocyte Biology*, 103(6), 1241-1249. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0317-101RRR>

- Wang, L., Wu, H., Yang, F., & Dong, W. (2019). The Protective Effects of Myricetin against Cardiovascular Disease. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *65*(6), 470-476. <https://doi.org/10.3177/jnsv.65.470>
- Wang, P., Huang, B., Horng, H., Yeh, C., & Chen, Y. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, *81*(2), 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
- Wang, S., Ge, F., Cai, T., Qi, S., & Qi, Z. (2021). [Dihydromyricetin inhibits proliferation and migration of gastric cancer cells through regulating Akt/STAT3 signaling pathways and HMGB1 expression]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*, *41*(1), 87-92. <https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2021.01.12>
- Wang, X., Hamza, M., Wu, T., & Dionne, R. (2009). Upregulation of IL-6, IL-8 and CCL2 gene expression after acute inflammation: Correlation to clinical pain. *Pain*, *142*(3), 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.02.001>
- Wei, S., Jian, C., Xu, F., Bao, T., Lan, S., Wu, G., Qi, B., Bai, Z., & Yu, A. (2017). Vancomycin-impregnated electrospun polycaprolactone (PCL) membrane for the treatment of infected bone defects: An animal study. *Journal of Biomaterials Applications*, *32*(9), 1187-1196. <https://doi.org/10.1177/0885328218754462>
- Wei, W., & Dai, H. (2021). Articular cartilage and osteochondral tissue engineering techniques: Recent advances and challenges. *Bioactive Materials*, *6*(12), 4830-4855. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.011>
- Wilkinson, H., & Hardman, M. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, *10*(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
- Wissal, D., Nahida, J., Emna, C., Maroua, B., Saloua, F., Semia, O., & Wissem, M. (2013). Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. *African Journal of Agricultural Research*, *8*(16), 1395-1400. <https://doi.org/10.5897/AJAR11.1837>
- Wu, Z., Zheng, X., Gong, M., & Li, Y. (2016). Myricetin, a potent natural agent for treatment of diabetic skin damage by modulating TIMP/MMPs balance and oxidative stress. *Oncotarget*, *7*(44), 71754-71760. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12330>
- Xanthis, V., Fitsiou, E., Voulgaridou, G., Bogadakis, A., Chlichlia, K., Galanis, A., & Pappa, A. (2021). Antioxidant and Cytoprotective Potential of the Essential Oil *Pistacia lentiscus* var. *chia* and Its Major Components Myrcene and  $\alpha$ -Pinene. *Antioxidants*, *10*(1), 127. <https://doi.org/10.3390/antiox10010127>
- Xiao, T., Wei, Y., Cui, M., Li, X., Ruan, H., Zhang, L., Bao, J., Ren, S., Gao, D., Wang, M., Sun, R., Li, M., Lin, J., Li, D., Yang, C., & Zhou, H. (2021). Effect of

dihydromyricetin on SARS-CoV-2 viral replication and pulmonary inflammation and fibrosis. *Phytomedicine*, 91, 153704. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153704>

Xu, F., Zhang, C., & Graves, D. (2013). Abnormal Cell Responses and Role of TNF-  $\alpha$  in Impaired Diabetic Wound Healing. *BioMed Research International*, 2013, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2013/754802>

Yanagisawa, K., Makita, Z., Shiroshita, K., Ueda, T., Fusegawa, T., Kuwajima, S., Takeuchi, M., & Koike, T. (1998). Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism*, 47(11), 1348-1353. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(98\)90303-1](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(98)90303-1)

Yasukawa, K., Okuno, T., & Yokomizo, T. (2020). Eicosanoids in Skin Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228435>

Yazdani, M., Shahdadfar, A., Jackson, C., & Utheim, T. (2019). Hyaluronan-Based Hydrogel Scaffolds for Limbal Stem Cell Transplantation: A Review. *Cells*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/cells8030245>

Yeh, W., Hsia, S., Lee, W., & Wu, C. (2017). Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.017>

Yousef, H., Alhadj, M., & Sharma, S. (2021). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>

Yu, L., Cavelier, S., Hannon, B., & Wei, M. (2023). Recent development in multizonal scaffolds for osteochondral regeneration. *Bioactive Materials*, 25, 122-159. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.01.012>

Zhai, P., Peng, X., Li, B., Liu, Y., Sun, H., & Li, X. (2020). The application of hyaluronic acid in bone regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 1224-1239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.169>

Zhang, N., Feng, H., Liao, H., Chen, S., Yang, Z., Deng, W., & Tang, Q. (2018). Myricetin attenuated LPS induced cardiac injury *in vivo* and *in vitro*. *Phytotherapy Research*, 32(3), 459-470. <https://doi.org/10.1002/ptr.5989>

Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., & Xue, M. (2016). Inflammation in Chronic Wounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2085. <https://doi.org/10.3390/ijms17122085>

Zhong, S., Kong, Y., Zhou, L., Zhou, C., Zhang, X., & Wang, Y. (2014). Efficient conversion of myricetin from *Ampelopsis grossedentata* extracts and its purification by

MIP-SPE. *Journal of Chromatography B*, 2014(15), 39-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.11.036>

Zhou, L., GJVM, V., Malda, J., Stoddart, M., Lai, Y., Richards, R., Ki-wai Ho, K., & Qin, L. (2020). Innovative Tissue-Engineered Strategies for Osteochondral Defect Repair and Regeneration: Current Progress and Challenges. *Advanced Healthcare Materials*, 9(23), e2001008. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001008>

Żylińska, B., Sobczyńska-Rak, A., Lisiecka, U., Stodolak-Zych, E., Jarosz, Ł., & Szponder, T. (2021). Structure and Pathologies of Articular Cartilage. *In Vivo*, 35(3), 1355-1363. <https://doi.org/10.21873/invivo.12388>