

# Alginátové hydrogely na krytí ran

Bc. Barbora Hermanová

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Hermanová**  
Osobní číslo: **T220011**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Alginátové hydrogely na krytí ran**

## Zásady pro vypracování

Alginát je biopolymer používaný v různých biomedicínských aplikacích díky svým příznivým vlastnostem, jako je biokompatibilita a netoxičita. Zvláště atraktivní je jeho využití v aplikacích na hojení ran.

Obvazy na rány připravené z alginátu jsou schopny absorbovat přebytečnou tekutinu z rány, udržovat fyziologicky vlhké prostředí a minimalizovat bakteriální infekce v místě rány.

V rámci teoretické části student vypracuje rešerši týkající se procesu hojení ran se zaměřením na fáze tohoto procesu.

A taktéž se bude věnovat popisu vlastností alginátu.

V praktické části budou pak připraveny alginátové hydrogely s inkorporovanými bioaktivními látkami.

Připravené materiály budou podrobeny jak materiálovému tak biologickému testování.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] DiPietro, L. A., & Burns, A. L. (Eds.). (2003). *Wound healing: methods and protocols* (Vol. 78). Springer Science & Business Media.
- [2] Middleton, J. E. (2011). *Wound Healing: Process, Phases, and Promoting*. Nova Science Publishers.
- [3] Freshney, R. I. (2015). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.
- [4] Aderibigbe, B. A., & Buyana, B. (2018). Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics*, 10(2), 42.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Zdenka Víchová, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **9. února 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky: Barbora Hermanová

.....  
podpis studentky

## **ABSTRAKT**

Výskyt chronických ran v populaci se celosvětově zvyšuje a má silný ekonomický dopad. Proto je nutné vyvíjet efektivní materiály pro jejich léčbu. Cílem této diplomové práce je příprava polypyrrolovo-alginátových hydrogelů určených právě na krytí ran. Alginátové hydrogely jsou poměrně jednoduché, dostupné a levné struktury, které jsou vhodné i jako nosiče aktivních látek. Kryty ran musejí však splňovat různé biologické a fyzikálně-chemické aspekty jako je biokompatibilita, netoxičnost, bioadheze, podpora buněčné migrace, ale také reologické vlastnosti aj. Proto je praktická část této práce zaměřena na testování cytotoxicity pomocí ISO 10 993, scratch assay, ale také reologie a UV-Vis spektrofotometrie.

Klíčová slova: alginát, hydrogel, biokompatibilita, hojení ran

## **ABSTRACT**

The incidence of chronic wounds in the population is increasing worldwide and has a major economic impact. It is therefore necessary to develop effective materials for their treatment. The aim of this thesis is to prepare polypyrrole-alginate hydrogels for use as wound dressings. Alginate hydrogels are relatively simple, affordable, and cheap structures that are also suitable as carriers of active substances. However, wound dressings must fulfil several biological as well as physical-chemical aspects such as biocompatibility, nontoxicity, bioadhesion, the ability to support cell migration, but also rheological properties, etc. Therefore, the practical part of this thesis focuses on cytotoxicity testing using ISO 10 993, scratch assay, but also rheology and UV-Vis spectrophotometry.

Keywords: alginate, hydrogel, biocompatibility, wound healing

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat zejména doc. Zdence Víchové, Ph.D. za konzultace, odborné rady a celkové vedení mé diplomové práce. Vděčnost bych chtěla také vyjádřit prof. Ing. Michalu Sedlačikovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady při reologických měřeních.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>1 KŮŽE JAKO NEJVĚTŠÍ ORGÁN LIDSKÉHO TĚLA.....</b>	<b>11</b>
1.2 ANATOMIE KŮŽE A JEJÍ EMBRYONÁLNÍ PŮVOD .....	12
<b>2 ZRANĚNÍ KŮŽE .....</b>	<b>17</b>
2.2 HOJENÍ RAN.....	18
<b>3 TYPY OBVAZŮ NA KRYTÍ RÁN .....</b>	<b>22</b>
<b>4 HYDROGELY A JEJICH APLIKACE NA KRYTÍ RÁN.....</b>	<b>24</b>
4.1 KLASIFIKACE HYDROGELŮ .....	24
4.2 BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI A APLIKACE V MEDICÍNĚ.....	25
<b>5 TYPY HYDROGELŮ UŽÍVANÝCH NA KRYTÍ RÁN.....</b>	<b>26</b>
5.1 NA BÁZI CHITOSANU .....	26
5.2 NA BÁZI HYALURONANU .....	27
5.3 NA BÁZI ALGINÁTU .....	29
<b>6 MODIFIKACE HYDROGELŮ .....</b>	<b>33</b>
6.1 FYZIKÁLNÍ SÍŤOVÁNÍ.....	33
6.2 CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ .....	33
6.2.1 Interní vs externí síťování alginátových hydrogelů .....	34
6.3 INKORPORACE VODIVÉHO POLYPYRROLU.....	35
<b>7 METODY TESTOVÁNÍ .....</b>	<b>37</b>
7.1 UV-VIS .....	37
7.2 REOLOGIE .....	38
7.3 STANOVENÍ CYTOTOXICITY .....	39
7.4 STANOVENÍ BUNĚČNÉ ADHEZE <i>IN VITRO</i> .....	40
7.5 TEST BUNĚČNÉ MIGRACE.....	41
<b>8 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>43</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>44</b>
<b>9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>45</b>
9.1 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE .....	45
9.2 PŘÍPRAVA KOLOIDNÍHO POLYPYRROLU .....	46
9.3 PŘÍPRAVA ALGINÁTOVÝCH HYDROGELŮ .....	46
9.4 UV-VIS ABSORPCE .....	47
9.5 REOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	47

9.6	PASÁŽOVÁNÍ BUNĚK .....	47
9.7	STANOVENÍ CYTOTOXICITY Z EXTRAKTŮ .....	48
9.7.1	MTT test.....	48
9.8	STANOVENÍ CYTOTOXICITY V PŘÍMÉM KONTAKTU .....	49
9.9	BUNĚČNÉ ADHEZE A PROLIFERACE.....	49
9.9.1	Barvení buněčných jader a cytoskeletu.....	49
9.10	PŘÍPRAVA VZORKŮ NA SCRATCH ASSAY .....	50
<b>10</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>51</b>
10.1	MATERIÁLOVÁ CHARAKTERIZACE ALGINÁTOVÝCH HYDROGELŮ.....	51
10.1.1	UV-Vis .....	51
10.1.2	Reologie .....	52
10.2	BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ .....	54
10.2.1	Buněčná cytotoxicita extraktů.....	55
10.2.2	Buněčná cytotoxicita v přímém kontaktu, adheze a proliferace .....	59
10.2.3	Scratch test .....	63
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>81</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>82</b>



## ÚVOD

Lidské tělo je dynamický systém a dochází v něm k neustálé komunikaci jednotlivých částí mezi sebou, a proto při zkoumání jedné části je často potřeba vzít v důraz i všechny její interakce. Kůže jakožto největší orgán těla není pouze ochrannou bariérou, ale má mnohem komplexnější funkci interagující s vnitřním i vnějším prostředím. Je nutno ji důkladně chránit. V případě jakéhokoliv poranění je v dnešní době již spousta různých biomateriálů, které lze použít k tomu, aby byla chráněná a co nejrychleji zocelená. Tím může být i obyčejná náplast, nicméně tato práce se zajímá o trošku specifickou verzi náplasti, než jakou ji známe, a to konkrétně o hydrogelové krytí. Hydrogely jsou 3D struktury, na které se mohou navázat aktivní farmakologické látky anebo samy o sobě mohou chránit poraněnou kůži před proniknutím mikroorganismů do těla, dalším mechanickým nebo jiným poškozením. Od hydrogelů jsou vyžadovány specifické biologické a fyzikálně-chemické vlastnosti; měly by být biokompatibilní, netoxické, antibakteriální, měly by mít specifické reologické vlastnosti apod. Zejména pro tyto vlastnosti jsou zkoumány hydrogely přírodního původu jako např. chitosanové nebo alginátové. Alginátové hydrogely jsou zkoumány také kvůli tomu, že jsou poměrně levné a jednoduché na přípravu. Často se struktury jako alginát a chitosan také kopolymerují nebo síťují, aby bylo dosaženo lepších fyzikálně – chemických vlastností, popř. biologických. Při zkoumání biologických charakteristik je potřeba zohlednit strukturu kůže a typ poranění v závislosti na daném hydrogelu a jeho vlastnostech. Jedny ze základních biologických testování může být cytotoxicita hodnocená např. pomocí MTT assay, simulace rány a migrace buněk v přítomnosti hydrogelu do místa poškození pomocí scratch assay apod.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 KŮŽE JAKO NEJVĚTŠÍ ORGÁN LIDSKÉHO TĚLA

Kůže je největším orgánem těla a pokrývá celý jeho vnější povrch. Slouží především jako primární bariéra proti okolnímu prostředí. Skládá se z různých molekul, jako jsou lipidy, proteiny, ale také voda, minerály aj. Mezi její funkce patří např. regulace teploty, ochrana před ultrafialovým (UV) zářením, patogeny, mikroorganismy apod. Kůže hraje také roli v imunologickém ohledu, smyslovém vnímání a udržování homeostáze obecně. Je také vysoce adaptabilní, díky čemuž se dokáže přizpůsobovat pohybu a různým tvarům. Zároveň má různou tloušťku v závislosti na místě výskytu. S tím také souvisí její různé specializované funkce, které se liší na různých částech těla. [1, 2]

## 1.1 Funkce kůže

Jak již bylo zmíněno, hlavní funkce kůže pro organismus je ochranná – jako primární bariéra chrání organismus proti mikroorganismům, dehydrataci, UV záření a mechanickému poškození. Dále obsahuje buňky, které umí rozpoznat změnu teploty, dotek, bolest anebo působení tlaku. Podílí se také na pohybu a endokrinních procesech spojených s tvorbou vitamínu D, který je zásadní k absorpci vápníku, který se podílí na tvorbě kostí a chrupavek. Vykazuje exokrinní aktivitu – uvolňování vody, močoviny nebo amoniaku. Dále kůže vylučuje produkty jako kožní maz, feromony a vykonává jiné imunologické funkce vylučování bioaktivních látek jako jsou cytokiny a pomáhá k rozvoji imunitního systému proti patogenům. V neposlední řadě se podílí na termoregulaci uchováváním či uvolňováním tepla a pomáhá udržovat vodní a homeostatickou rovnováhu těla. Po vystavení slunečnímu záření má kůže schopnost syntetizovat vitamín D [1, 2]

### 1.1.1 Syntéza vitamínu D3

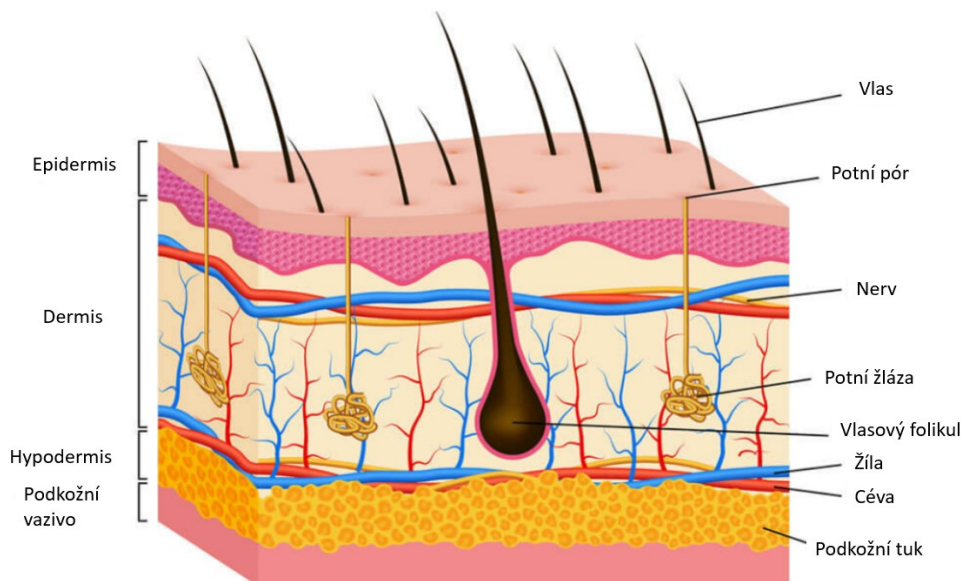
Syntéza vitamínu D je velmi důležitá funkce kůže, a to především kvůli tomu, že jeho nedostatek má mnoho negativních dopadů na náš organismus. Hypovitaminóza vitamínu D zahrnuje problémy, jako jsou deprese, únava, slabost kostí, oslabená imunita a pomalé hojení ran. Při pobytu na slunci se vysokoenergetické UV záření (vlnová délka mezi 290-315 nm) dostává skrz epidermis a fotolyzuje provitamín D3 (7dehydrocholesterol) na previtamín D3. Jakmile je zformován previtamín D3, postoupí termálně indukovanou izomerací na vitamín D3 anebo je fotolyzován na lumisterol a tachysterol. Proces izomerace z previtamínu D3 na vitamín D3 trvá okolo 2 až 3 dnů. Melanin, který je zodpovědný za zbarvení kůže soutěží s provitaminem D3 o UV záření a limituje tedy fotolýzu na previtamín D3. Nicméně není

hlavním faktorem omezení excesivní syntézy vitamínu D3. Druhými produkty previtamínu D3 jsou lumisterol a tachysterol. K jejich tvorbě dochází, jelikož previtamín D3 je fotolabilní, a to je také důvodem, proč se ho netvoří více než 10-20 % z celkové koncentrace provitamínu D3. Faktory jako věk, používání opalovacích krémů, roční období, čas dne a obsah melaninu ovlivňují celkovou syntézu vitamínu D3. [1, 2, 3]

## 1.2 Anatomie kůže a její embryonální původ

Kůže se skládá ze tří základních vrstev – vnější epidermis neboli pokožka, prostřední dermis jinak pojmenovávána jako škára a nejspodnější *Tela subcutanea* – podkožní vazivo zvané také jako hypodermis (obrázek 1). [1]

1. Pokožka neboli **epidermis** je nejsvrchnější vrstvou kůže, která slouží především jako primární bariéra a přispívá k zbarvení kůže. Embryologicky se epidermis vyvíjí z ektodermu. Epidermis se v místech, kde je kůže hrubší jako jsou např. dlaně, dále dělí do 5 vrstev – *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum*, *Stratum lucidum* a *Stratum corneum*. Na jiných místech na těle, kde je kůže méně hrubá se obvykle vyskytují jen 4 vrstvy bez *Stratum lucidum*. Toto rozdělení určuje stupeň keratinizace u nejhodněji zastoupených buněk v pokožce, a to u keratinocytů. Mezi další významné buňky v kůži patří melanocyty – ty produkují pigment melanin, který slouží jako ochrana proti UV záření a mimo jiné zapříčiňují pigmentaci kůže. Obsahuje také Langerhansovy buňky jako součást imunitního systému a Merkelovy neuroendokrinní buňky. [1, 4]
2. **Dermis** – škára, se nachází pod epidermis, od které je oddělená skrze bazální membránu. Vyvinula se z mezodermu a je složena z pojivové tkáně, vlasových folikulů, krevních cév, lymfatických cév a potních žláz. Dermis se na rozdíl od epidermis dělí pouze na dvě další vrstvy – papilární a retikulární dermis. Mezi buněčné typy zastoupené v dermis patří především fibroblasty produkující kolagen a elastin. Dále pak mastocyty, histiocyty či lymfocyty. [1]
3. Nejspodnější vrstvou je podkožní vazivo nebo také **hypodermis**, která je složena z tuku a pojivové tkáně a pochází z ektodermu. Hypodermis umožňuje spojení kůže s podkladem, tedy s hlouběji uloženými tkáněmi jako jsou orgány, svaly nebo kosti. Díky hojnému zastoupení adipocytů - tukových buněk, funguje také jako zásobárna energie. [1]



Obrázek 1 Zjednodušená struktura anatomie kůže

Na plnění funkce kůže se podílejí různé buněčné typy, které náš největší orgán obsahuje. Jejich zastoupení se liší v závislosti na konkrétních vrstvách kůže. Dále jsou popsány nejvíce zastoupené buněčné typy. [1,4]

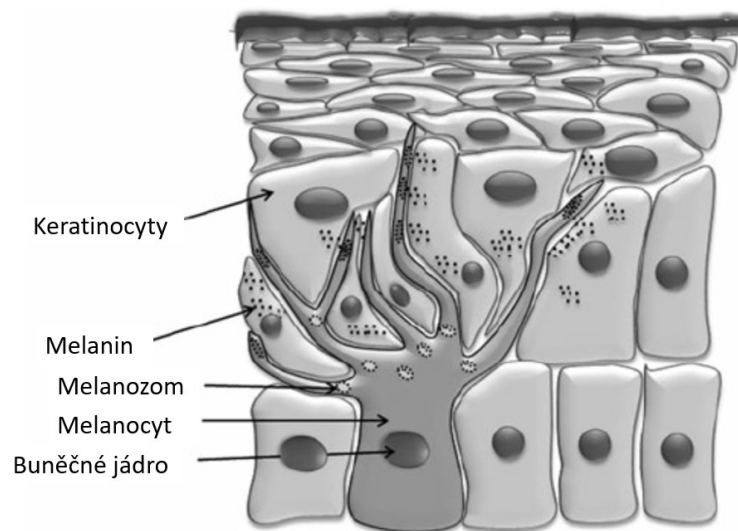
### 1.2.1 Keratinocyty

Minimálně 80 % keratinocytů epidermis jsou vyvinuty z ektodermu. Proces diferenciacce probíhá při migraci buněk ze *Stratum basale* směrem k svrchním vrstvám, jehož důsledkem je keratinizace. Keratinizace je proces během, kterého buňky prochází nejprve syntetickou a následně degradační fází. V syntetické fázi se buňky nabalují cytoplasmickou zásobou keratinu. Keratin je fibrózní protein v alfa-helixovém prostorovém uspořádání, jehož svazky vláken konvergují a končí tvorbou desmozomů – buněčných spojů. Následně během degradační fáze keratinizace se ztrácí obsah buněk a konsoliduje se do směsi vláken a amorfních buněčných obalů. Buňka je nakonec známá jako rohovitá tzv. korneocyt. Keratinocyty mají aktivně propojené cesty s imunitními buňkami během hojení ran, k čemuž napomáhají signální proteiny (cytokiny a chemokiny) a extracelulární vezikuly aj. [4, 9]

### 1.2.2 Melanocyty

Melanocyty jsou dendritické, pigment-syntetizující buňky vyvinuté z neurální lišty (útvary vznikající v průběhu 3. týdne embryonálního vývoje při procesu tvorby nervové trubice). Vyskytují se hlavně v bazální vrstvě. Nicméně, čím výše se vyskytují, tím spíše mohou navázat kontakt s keratinocyty, tvoří s nimi však buněčné spoje (obrázek 2). Melanocyty jsou zodpovědné převážně za tvorbu melaninu a jeho přenosu ke keratinocytům. Melanin je

produkován v kulatých, membránových organelách nazývaných melanozomy skrze řadu receptorově zprostředkovaných, hormonálně stimulovaných a enzymaticky katalyzovaných reakcích. Melanozomy jsou agregovány do membránovitě spojených melanozomových komplexů. U tmavší kůže je tendence rychlejšího uvolňování melanozomů z těchto komplexů směrem ke keratinocytům než u kůže světlejší. Zvýšená expozice UV záření stimuluje melanogenezi, a tedy i zvýšení přenosu melanozomů na keratinocyty. Následkem tohoto procesu je nejen opálení pokožky, ale také zvýšení schopnosti buněk absorbovat světlo a chránit tak genetickou informaci před škodlivým zářením. [4, 5]



Obrázek 2 Propojení mezi melanocyty a keratinocyty

### 1.2.3 Merkelovy buňky

Merkelovy buňky mají oválný tvar, pomalu se přizpůsobující mechanoreceptor typu I., který se nachází v místech s vysokou citlivostí, která je desmozomy spojená k bazálním keratinocytům. Merkelovy buňky se nacházejí v prstech, rtech, v některých částech dutiny ústní a u vnější kořenové pochvy vlasového folikulu. Někdy jsou sestaveny do specializovaných struktur, které jsou známé jako dotykové disky nebo kopule. Relativně malé deformace přilehlých keratinocytů jsou dostatečným podnětem k vyloučení chemických signálů generující akční potenciál v dostředivém neuronu, který přeneše signál do mozku. Vysoká koncentrace Merkelových buněk např. v konečcích prstů má za následek hustěji zaplněná receptivní pole, a tedy i zvýšenou hmatovou citlivost a rozlišení. [4, 6]

#### 1.2.4 Langerhansovy buňky

Langerhansovy buňky jsou zahrnuty v různých procesech imunitních odpovědí T-buněk. Pocházejí z kostní dřeně, odkud migrují do suprabazální pozice v epidermis během začátku embryonálního vývoje a následně pokračují v neustálé cirkulaci a znovu shromažďováním v epidermis. Buňky mají stejně jako melanocyty dendritický tvar a neformují buněčné spoje se sousedními buňkami. Langerhansovy buňky musí rozpoznat a zpracovat rozpustné antigeny nacházející se v epidermis. Pokud je antigen vázán na membránu, je pohlcen endocytózou a vytváří se buněčná granula. Obsah granulí je dále fagocytován v cytoplazmě hydrolytickými enzymy podobnými těm, které se nacházejí u makrofágů. V první fázi života jsou Langerhansovy buňky slabými stimulatory T-buněk, ale jsou schopny přijímat a zpracovávat antigeny. Později, jakmile se buňka stane efektivním aktivátorem T-buněk, tak se aktivace skrze kontakt s antigenem již nespustí fagocytózu, ale buněčnou migraci. [4, 7]

#### 1.2.5 Epidermální přívěsky

Kožní adnexa jsou seskupením ektodermálních přívěsků, včetně ekrinních a apokrinních žláz, kanálků a pilosebaceozních jednotek. Po zranění jsou všechny adnexální struktury schopné reepitelizace prostřednictvím migrace keratinocytů z adnexálního epitelu na povrch pokožky. Zejména pokožka obličeje a hlavy obsahují vyšší množství pilosebaceozních jednotek, a proto v těchto místech dochází k rychlejší reepitelizaci než jiných oblastech. [4, 8]

Typy epidermálních přívěsků:

- a. Ekrinní potní žlázy – termální regulace; nejhojněji zastoupeny jsou na ploškách chodidel a nejméně na zádech.
- b. Apokrinní potní žlázy – termální regulace a vylučování pachu; jsou zejména v podpažních jamkách a na rozdíl od ekrinních potních žláz nevystupují na povrch kůže
- c. Apoekrinní potní žlázy – vyvíjejí se v období puberty a objevují se také u populace se zvýšenou sekrecí potu jinak známou jako hyperhidróza.
- d. Vlasové folikuly – mají mnoho biologických vlastností jako např. ochranná, distribuce potních žláz, psychosomální v rámci společnosti apod. Liší se značně velikostí, tvarem v závislosti na místě výskytu, ale mají společnou základní

strukturu. Již během vývoje plodu je stanoven počet a distribuce pro daný organismus a budoucí fenotyp každého vlasu.

- e. Mazové žlázy – nacházejí se zejména na obličeji a na hlavě, ale jsou přítomny skoro na všech místech lidského těla. Obsahují kapičky lipidů známé jako sebum v cytoplasmě a jsou uspořádány do segmentů u vlasového folikulu.
- f. Nehty – chrání prsty, a tedy i citlivost v konečcích prstů a zároveň umožňují uchopení malých předmětů. Samotný nehet je složen z matrix keratinocytů. Nehty rostou v průměru o 0,1 mm denně, což je zhruba 2x až 3x rychleji než nehty na nohou. [4, 8]



## 2 ZRANĚNÍ KŮŽE

Zranění kůže způsobují rány – biologické poškození tkáně jako je kůže, ale také sliznice či orgánu. Řádné čištění a zajištění rány je nezbytné pro prevenci infekce či dalšího prohloubení poškození. Existuje mnoho typů ran a dle toho mnoho druhů dělení, zde jsou uvedené některé z nich. [9,10]

### 2.1 Typy ran

#### Podle hloubky poranění:

1. Nepenetrující rány: Obvykle jsou výsledkem tupého poranění nebo tření s jinými povrchy; rána neproniká všemi vrstvami kůže, ale jedná se o narušení jenom povrchové vrstvy. Patří sem: oděrky (oškrábání vnější vrstvy kůže), tržné rány (rána podobná slzám), pohmožděniny (oteklé modřiny v důsledku nahromadění krve a odumřelých buněk pod kůží), otřesy mozku (poškození orgánů a tkáně na hlavě bez výrazného vnějšího poranění)
2. Penetrující rány: Vznikají v důsledku traumatu, které prorazí celou tloušťku kůže; sahající až k podkožnímu vazivu a orgánům a zahrnuje: bodná poranění (trauma od ostrých předmětů, jako jsou nože), řezy na kůži, chirurgické rány (úmyslné pořezání kůže za účelem provedení chirurgických zákroků), střelná zranění (rány způsobené střelnými zbraněmi). [9, 10]

#### Podle podnětu zranění:

- a. Tepelná poranění: Extrémní teploty, ať už horké nebo studené, mohou způsobit tepelná poranění (jako jsou popáleniny, spáleniny od slunce a omrzliny)
- b. Chemická poranění: Vznikají v důsledku kontaktu nebo vdechnutí chemických materiálů, které způsobují poškození kůže nebo plic.
- c. Kousnutí a bodnutí: Kousnutí mohou pocházet od lidí, psů, netopýrů, hlodavců, hadů, štírů, pavouků a klíšťat. Při tomto typu ran je vysoké riziko zanesení infekce
- d. Elektrická zranění: Obvykle se vyskytují povrchovými popáleninami nebo bodnutími, které jsou sekundární k průchodu vysokonapěťových elektrických proudů tělem a mohou zahrnovat závažnější vnitřní poškození.
- e. Řezná a tržná zranění: Důsledkem působení externího tělesa a mechanické síly např. ostré předměty, hrany apod. [9, 10]

**Podle původu poranění a délky léčení:**

- a. Akutní: Vzniká náhle na zdravé kůži v důsledku vnějšího vlivu. Např. oděrky, bodné rány, popáleniny, puchýře atd. Za předpokladu správné péče se akutní rány hojí obvykle poměrně rychle, během dnů až týdnů.
- b. Chronická: Sekundárně se hojící rána, která vzniká postupně, a i přes adekvátní terapii nevykazuje po dobu 6–9 týdnů tendenci k hojení. Např. bércové vředy, diabetická noha (tzv. gangréna), proleženiny atd. Takováto rána často souvisí s jiným onemocněním, které narušuje hojivé procesy, může se jednat např. o cukrovku. Taktéž ale mohou chronické rány vznikat zanedbanou péčí o akutní zranění. Chronické rány většinou vyžadují specializovanou léčbu. [10]

**2.2 Hojení ran**

Hojení je opravný proces, který nastává prakticky ihned po vzniku poškození kůže. Jedná se o komplexní systém buněčných reakcí, které se navzájem prolínají. Hojení může být realizováno regenerací a/nebo fibrózou. Regenerace je procesem, kdy probíhá substituce neboli nahrazení patologické nebo poškozené tkáně. Oproti tomu fibróza je nespecifická forma hojení, kdy se poškozená tkáň hojí a vytvoří se jizva. Jelikož může být fibróza považována za nedokonalý pokus obnovení tkáně, lze ji považovat za patologický jev. [9,11]

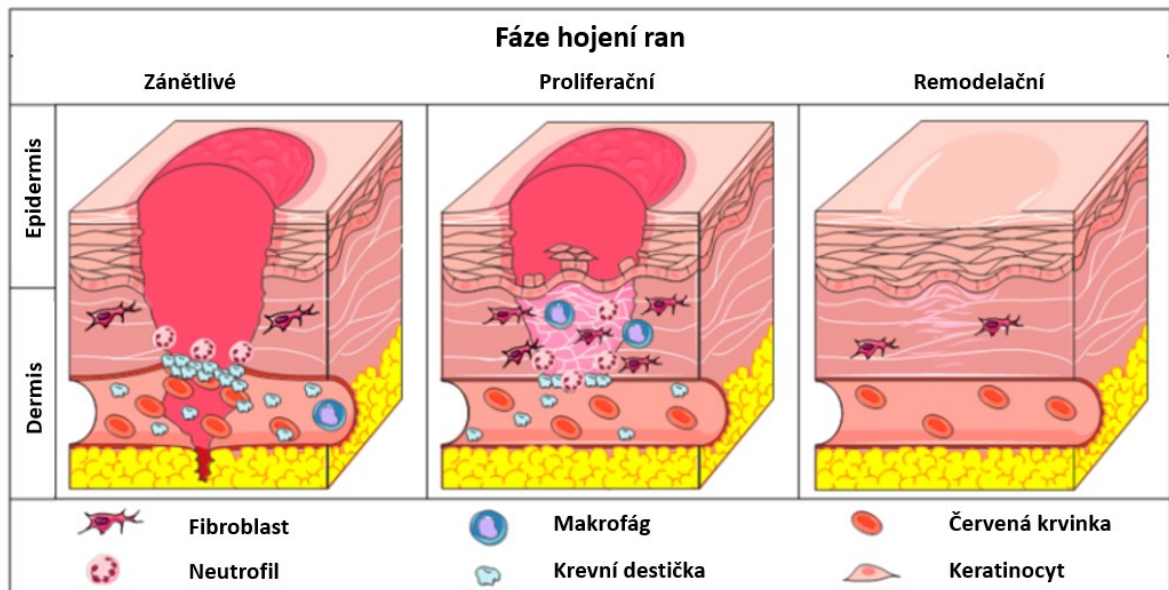
Jak bylo zmíněno výše, hojení ran je komplexní proces sestávající se z několika se prolínajících sledů Podle Stojadinovic A. a spol. Lze rozdělit hojení ran na 4 stádia:

1. Hemostáza a koagulace spojené s tvorbou provizorní matrix.
2. Zánět s nábořem neutrofilů a monocytů.
3. Proliferace a regenerace s tvorbou granulační tkáně a obnovením vaskulární sítě a reepitelizaci – v této fázi je rovněž produkován kolagen III.
4. Remodelace, ke které dochází od 21. dne až do 1 roku po zranění – kolagen III. Je zde nahrazen kolagenem I. [11]

Proces hojení ran lze, ale rozdělit obecněji pouze na 3 stádia (obrázek 3), kdy fáze hemostázy a zánětu bývají spojené v jedno:

1. Zánětlivé stádium, aby se zranění zamezilo a zabránilo infekci.
2. Proliferační stádium charakterizované tvorbou nové tkáně.

## 3. Stádium remodelace s reorganizací extracelulární matrix.



Obrázek 3 Fáze hojení ran

## 2.2.1 Zánětlivé stádium

Tento proces je charakterizován přílivem krevních buněk a vypuštěním cytokinů a mediátorů. Poranění vede k narušení krevních cév a následně k vyplavení červených krvinek a dalších krevních komponentů. V této fázi dochází ke koagulaci, což je proces srážení krve v místě zranění. Jedněmi z nejdůležitějších komponentů krve, které vstupují do procesu hojení a koagulace jsou krevní destičky. Krevní destičky jsou stimulovány lokálně tvořeným trombinem a fibrilárním kolagenem. Prochází aktivací, adhezí a agregací. Aminokyseliny prolin a hydroxyprolin, které jsou součástí kolagenu determinují počátek aktivace krevních destiček. Mimo aktivaci jsou krevní destičky schopné také podmínit spuštění některých mediátorů jako např. ADP (adenosin difosfát), fibrinogen, fibronectin aj. Fibrinogen a fibronectin pak společně s trombospondinem slouží jako ligandy k agregaci krevních destiček. Von Willebrandův faktor dále napomáhá adhezí destiček na fibrilární kolagen. V neposlední řadě vstupuje do reakce ADP a trombin, které spouští migraci dalších krevních destiček směrem k poranění. Všechny tyto reakce pak vedou k agregaci krevních destiček a vytvoření krevní sraženiny. Jsou také podstatné pro sekreci některých růstových faktorů. [12, 13]

Je nutné rovněž zmínit, že proces koagulace je podmíněn dvěma hlavními kaskádami, které vedou k formaci trombinu – enzymu, který má za následek přeměnu rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin. [14]

Další krevní komponenty působící v zánětlivém stádiu jsou leukocyty – bílé krvinky, které jsou rovněž přítomny u raněné tkáně. Neutrofilů, jeden z typů bílých krvinek, jsou první, které se objeví u raněného místa. Neutrofilů společně s monocytami migrují do poškozené oblasti na základě chemotaktických faktorů, které jsou produkovány během koagulačního procesu. Chemotaktické faktory mohou být např. fibrinopeptidy a různé jiné produkty fibrinogenu. Jakmile jsou neutrofilů v místě poranění, tak integriny, které jsou na povrchu neutrofilů pomáhají interakcím buňka-matrix, což také přispívá k imunitní podpoře neutrofilů, tedy k fagocytóze a zabíjení bakterií. [15]

Monocyty jsou dále fenotypově přetvořeny tkání na makrofágy, které také napomáhají vychytávání patologických mikroorganismů a podporují růstové faktory – cytokiny. Ty jsou důležité zejména k stimulaci buněčné migrace a proliferaci. [12]

### 2.2.2 Proliferační stádium

V této fázi dochází především k rekonstrukci kůže jako funkční bariéry. Při poranění nejprve reagují keratinocyty migrací z volného okraje rány. Zhruba po 12 hodinách od poranění se epidermální buňky zplošťují a tvoří výběžky. Mezitím, co epidermální buňky začínají migrovat, proliferační potenciál je potlačen. Matrix, která je tvořena z fibrinu, fibronektinu a kolagenu usnadňuje buněčnou migraci. Pro tu jsou také důležité růstové faktory jako např. TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  je mediátorem, který reguluje buněčnou migraci, stimuluje produkci keratinocytů a inhibuje jejich proliferaci. Během proliferačního stádia dochází k vytvoření granulační tkáně, která je tvořena z nových kapilárních cévek, které se vyvíjí v nově vznikající kolagenní matrix a akumulací fibroblastů. Fibroblasty zde hrají podstatnou roli, jelikož produkují mimo jiné ECM a kolagen. Specializace na daný úkon se přisuzuje fenotypizací danou oblastí. Co se týče migrace, tak jsou fibroblasty schopny v tomto případě produkovat vysoké množství kolagenu, proteoglykanů a elastinu, aby zajistily vznik další matrix. Ohledně proliferace – daří se jim zejména v kyselém, mírně okysličeném prostředí. Mimo jiné je kofaktorem k síťování kolagenu vitamín C, a proto lidé s jeho deficitem mají problém s hojením ran. [12, 16]

### 2.2.3 Stádium remodelace

Třetí a poslední stádium buněčné reparace je charakterizováno ukládáním materiálu matrice a jeho následnou změnou v čase. Makromolekuly jako fibronectin, kyselina hyaluronová, proteoglykany a kolagen slouží během regenerace jako scaffold pro buněčnou migraci a podporu tkáně. Uložení a remodelace extracelulární matrix je dynamickým procesem. I dlouho poté, co je rána zahojena se stále dějí procesy, které jsou důsledkem poranění. Např. celkové množství kolagenu se navyšuje v prvních chvílích procesu hojení a nabývá maxima okolo 2-3 týdnů od poranění. Dochází také ke změnám typů kolagenů, kdy kolagen III., který je syntetizován fibroblasty během proliferační fáze, se přibližně po roce mění na kolagen I. Další komponenty jako např. obsah vody a glykosaminoglykanů se v čase snižuje. [12, 17]

Fáze remodelace se může prodloužit až na dobu 1 roku, někdy i více. Během této doby celý proces rozpadu matrice rány matrixovými metaloproteinasy a syntézy nové ECM regulují fibroblasty. Tento pomalý proces zvyšuje pevnost rány v tahu, ale tkáň jizvy nikdy nemá víc jak 80% pevnosti nezraněné tkáně. Občas může během procesu dojít k nerovnováze, což má za následek tvorbu abnormální tvorbu jizev jako jsou hypertrofické nebo keloidní jizvy. [18]

### 3 TYPY OBVAZŮ NA KRYTÍ RÁN

Typ obvazu na krytí ran je vybírán podle typu, hloubky, umístění, rozsahu poranění, dále pak podle objemu výměšku a rozsahu infekce. Tradiční obvaz na krytí ran jako např. bavlníková bandáž nebo obvaz jsou schopny pohltit vlhkost z rány, což vysušuje povrch rány, a následně zpomaluje rychlost hojení a může tak způsobit bolest při oddělování obvazu a odstranění nově vytvořené tkáně. Naproti tomu polymerní filmy, pěny a gely mohou zajistit optimální podmínky pro hojení ran. Aby byl zvolen správný typ obvazu na danou ránu je potřeba definovat, jak by měl ideální obvaz rány vypadat a jaké by měl mít charakteristiky. Mokrý obvaz jsou schopny zrychlit proces hojení rány oproti suchým obvazům. Obnovená kůže bez zánětu a tvorby jizev může probíhat pouze ve vlhkém prostředí. Dále by pak ideální obvaz měl: kontrolovat vlhkost v okolí rány, eliminovat exsudáty (výměšky), regulovat výměnu plynů, být antibakteriální, snižovat povrchovou nekrózu, mechanicky chránit, být snadno vyměnitelný, biokompatibilní, biodegradabilní, elastický, netoxický, napomáhat od bolesti a být cenově přijatelný. [19,20]

Obvazy na krytí ran se klasifikují na tradiční, biomateriálové, bioaktivní a interaktivní.

- a. **Tradiční neboli pasivní** – používají se zejména k ochraně před kontaktem s okolím a zástavě krvácení. Např. bavlníkové obvazy, kompozitní gáza-bavlna obvazy. Jsou charakteristické svojí vysokou absorpční kapacitou. Nicméně může způsobit krvácení, není zde dobrá výměna plynů s okolím a při odstraňování může poškodit nově vznikající epitel. Únik exsudátů může vést k bakteriálním infekcím.
- b. **Obvazy živočišného původu** – např. aloštěpy, tkáňové deriváty.
  - Aloštěpy – dárcovské kožní lyofilizované fragmenty; použití je omezeno možnými imunitními reakcemi recipienta, riziko infekce a přenosu nemocí. Jsou tak poměrně drahé a mají omezenou trvanlivost.
  - Tkáňové deriváty – získávají z kolagenu; omezení rizikem infekce při dlouhodobém užívání.
- c. **Interaktivní** – jsou také obvazy, které aktivně kontrolují mikroprostředí rány a pracují s vlastnostmi rány, jako jsou buňky, exsudáty, či celé tkáně. Mohou také stimulovat aktivitu v léčebné kaskádě a urychlit proces hojení. Jedná se např. o gely, pěny, filmy, spreje, kompozity apod. Jsou připravovány z biopolymerů nebo

syntetických polymerů. Nejčastěji využívanými biopolymery jsou alginát, chitosan, želatina apod.

- d. **Bioaktivní** – jedná se obvazy, které mají terapeutický účinek. Např. přidáním růstových faktorů a antimikrobiálních látek se zlepšuje proces hojení ran. Patří sem již zmiňované biopolymery jako alginát nebo chitosan obohaceny o pátě o látky s léčebnými účinky. [19,21]

## 4 HYDROGELY A JEJICH APLIKACE NA KRYTÍ RAN

Hydrogely jsou hydrofilní 3D síť polymeru, které mají schopnost pojmout velký objem vody a výrazně nabýt na objemu a zároveň si ponechat svou strukturu díky chemickému nebo fyzikálnímu síťování jednotlivých polymerních řetězců. Hydrofilitu zajišťují chemické skupiny jako – NH<sub>2</sub>, -COOH, -OH, -CONH, - CONH<sub>2</sub> -, anebo – SO<sub>3</sub>H. Hydrogely mohou podstoupit signifikantní změnu objemu také nazývanou jako sol-gel přechod také v návaznosti na určitý stimul. Takovýto stimul může být chemický nebo fyzikální. [20,21]

- a. Fyzikální: např. teplota, elektrické nebo magnetické pole, různé typy a intenzity záření apod.
- b. Chemické: např. pH, iontová síla apod.

Nicméně většina takovýchto případů jsou reverzibilní a hydrogely jsou schopny se vrátit do původního stádia. Odpověď hydrogelů vůči danému stimulu je podmíněna typem monomeru, rozložením nábojů na polymerním řetězci, rozvětvení řetězce a stupeň síťování. [19,21,22]

### 4.1 Klasifikace hydrogelů

Hydrogely se dají dělit podle různých aspektů. Podle původu mohou být dělené na přírodní, semisyntetické a syntetické. Jako příklad přírodních je např. alginát, o kterém bude pojednáno blíže v kapitole 5.3. Podle nábojů podél polymerního řetězce je lze dělit na kationické, anionické a amfoterní. Rovněž je lze dělit podle typu síťování. Rozdělení hydrogelů dle různých kritérií je uvedeno na obrázku 4. [20]

Hydrogely					
<u>Příprava</u>	<u>Náboj</u>	<u>Zdroj</u>	<u>Síťování</u>	<u>Odpověď</u>	<u>Fyzikální vlastnosti</u>
Homopolymery	Kationické	Přírodní	Fyzikální	Fyzikální	Chytré
Kopolymery	Anionické	Syntetické	Chemické	Chemické	Konvenční
Interpenetrační	Amfoterní	Semi-syntetické		Biochemické	

Obrázek 4 Přehled klasifikace hydrogelů podle různých kritérií jako příprava, náboj, zdroj, síťování, odpovědi na podměty specifického rázu a fyzikálních vlastností [20]



## 4.2 Biologické vlastnosti a aplikace v medicíně

Kultivace buněčných kultur za pomoci různých 3D matic či scaffoldů umožňuje růst všemi směry, čímž je mimikováno *in vivo* prostředí. 3D buněčné kultury tedy poskytují velmi užitečnou platformu buněčného růstu *in vitro* ve všech směrech. Buněčné chování v 3D systému je pro buňky přirozené, a proto i vhodnější k pozorování oproti 2D systémům. 3D buněčných kultur lze dosáhnout kultivací buněk na tzv. scaffoldech. *In vivo* se buňky pohybují a existují v extracelulární matrix (ECM), která jim poskytuje prostředí a podporu. ECM je velmi důležitým prvkem pro buněčný růst a regulaci buněčného chování. Hydrogely rovněž disponují 3D strukturou a hydrofilní povahou schopnou vázat vodu stejně jako ECM. Proto jsou vhodné na konstruování jemných tekutých 3D struktur, které se podobají ECM a z tohoto důvodu přilákaly svou pozornost v aplikacích scaffoldů ke konstruování 3D buněčných struktur. Hydrogely jsou funkčně výhodné díky jejich biokompatibilitě, biodegradabilitě, adhezním schopnostem, vaskularizačnímu potenciálu, ale také antimikrobiálním, protizánětlivým a pro-angiogenním vlastnostem. Těchto vlastností lze využít při hojení chronických ran. Biokompatibilita je klíčovým požadavkem, aby byla zachována homeostáza v přítomnosti vhodné matrix bez ničení okolní tkáně. [20, 22]

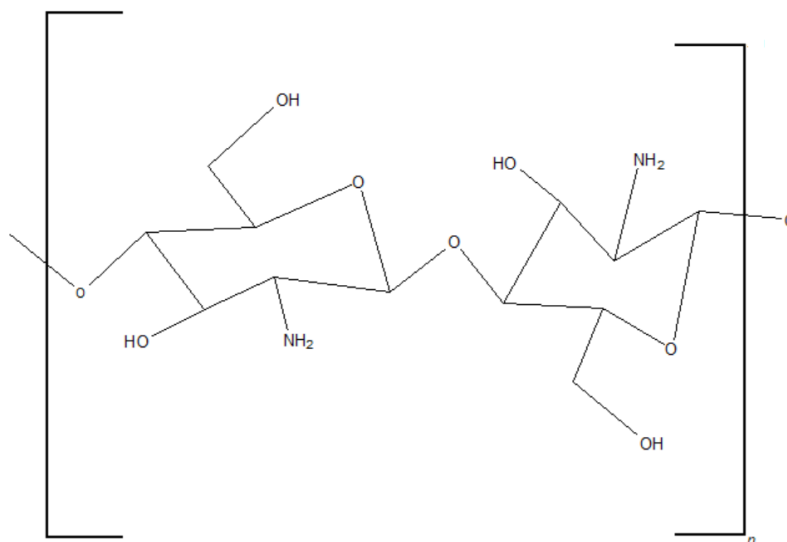
Jelikož hydrogely poskytují dočasnou „šablonu“ během proliferace fibroblastů, reepitelizace, neovaskularizace a remodelace ran, je potřeba, aby byly biodegradabilní a měly určitou rychlost seberozkládání. [23]

Biologická adheze je další vlastností, která je důležitá v dlouhodobé stabilitě hydrogelového „obvazu“ v okolí poranění, jelikož zlepšuje homeostatický efekt, udržuje ránu hydratovanou a absorbuje výměšky z rány. Jelikož je např. chronických ran delší perioda času nutná k zahojení je zde zvýšený risk infekce a je tedy vhodné, aby takovéto hydrogely měly rovněž antimikrobiální vlastnosti. [20,23]

## 5 TYPY HYDROGELŮ UŽÍVANÝCH NA KRYTÍ RAN

### 5.1 Na bázi chitosanu

Chitosan je přírodní lineární polymer patřící do skupiny glukosaminoglykanů. Je složený z glukosaminu a N-acetylglukosaminu (obrázek 5). Získáván je parciální deacetylací chitinu, který je získáván z exoskeletů korýšů, z hub a hmyzu. Chitin má krystalickou strukturu tvořenou vodíkovými vazbami mezi acetamidovými a hydroxylovými vazbami. Kvůli tomu má rigidní strukturu a vysoké množství acetylovaných skupin, což vede k tomu, že je nerozpustný ve vodě a špatně rozpustný ve vodných roztocích. To je také důvod, proč není přímo aplikovatelný a využívá se parciální deacetylací. Tou se sníží počet acetylovaných skupin, zvýší rozpustnost ve vodě, a tedy i biokompatibilita a biodegradabilita. [23]



Obrázek 5 Chitosan

Jelikož patří chitosan do skupiny glukosaminoglykanů je podobný jiným glukosaminoglykanům, které se vyskytují v lidském organismu. Ty se vyskytují zejména v extracelulární matrix společně s proteoglykany, ale také proteiny jako je elastin a kolagen. Glukosaminoglykany přispívají k buněčné proliferaci, adhezi, signalizaci růstového faktoru, imunitním funkcím a udržení kolagenové struktury. [24]

Chitosan a jeho deriváty mohou hrát určitou roli při hojení ran, a to zejména v prvních třech fázích. Nejprve pomáhají zastavit krvácení, tím že podporují agregaci krevních destiček a erytrocytů a inhibují rozpouštění fibrinu ve stádiu hemostázy. Dále pak díky svojí antibakteriální vlastnosti působí v místě rány, aby nebyla dále infikována. V neposlední řadě urychlují také proliferaci při hojení podporou růstu granulační tkáně. [25,26]

Chitosan je často kopolymerován s jinými biopolymery nebo jinými chemickými agenty. Může být užit ve formě kompozitu, hydrogelu, membrán nebo nanočástic. Některé druhy takovýchto biomateriálů jsou však cytotoxické, degradabilní anebo mají špatné mechanické vlastnosti. V takovýchto případech se dá chitosan například zasítovat, aby byly vylepšeny jeho vlastnosti. [27,28]

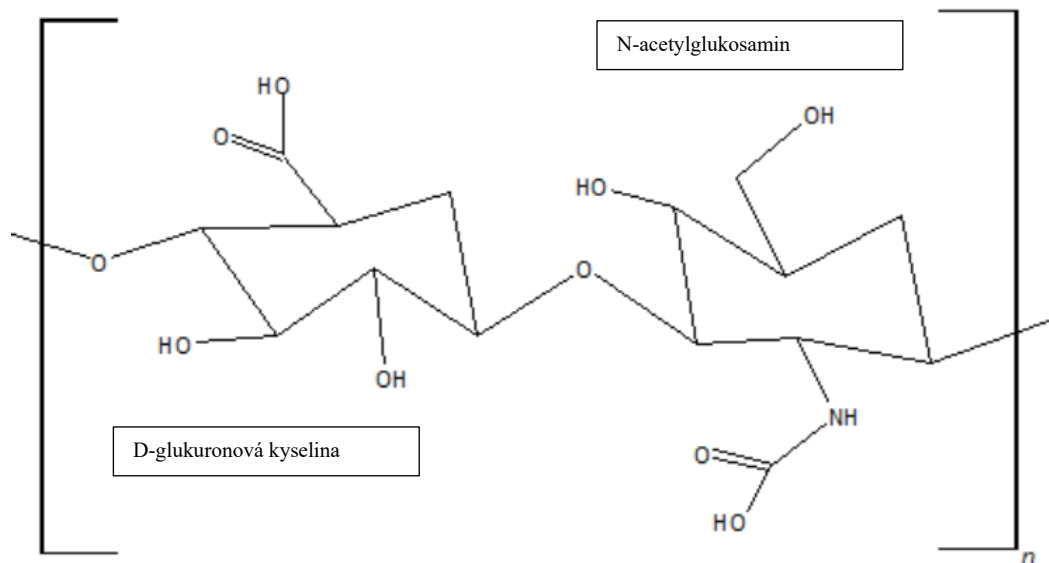
Mezi některými nevýhodami chitosanu je charakterizace distribuce jeho komonomerů. Obecně je považován za biokompatibilní a bezpečný, ovšem v některých případech bylo pozorováno, že při určitém poměru mezi glukosaminem a acetyl-glukosaminem docházelo následně k reakci chitosanu s endotoxiny. Jelikož se získává z exoskeletonů korýšů v některých případech, není vhodný pro alergiky. Srovnání pozitivních a negativních vlastností chitosanu je uvedeno v tabulce 1. [29,30]

Tabulka 1 Pozitivní vs negativní aspekty užití chitosanu jako výchozí látky hydrogelů [31]

Pozitiva chitosanu	Negativa chitosanu
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lineární přírodní polymer z rodiny glukosaminů, který se chová jako polyelektrolyt s pozitivním nábojem</li> <li>• Mezi industriálně použitelnými polymery je jediný vysokomolekulární kationický polyelektrolyt</li> <li>• Často nazýván zkratkou GRAS (generally recognized as safe – obecně uznávám bezpečným) a biokompatibilním</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Těžká charakterizace distribuce komonomerů (poměr mezi glukosaminem a acetyl-glukosaminem)</li> <li>• V některých případech (podle poměrů komonomerů) mohou reagovat s endotoxiny</li> <li>• Může způsobovat alergické reakce, pokud je získáván z korýšů a není tedy vhodný pro všechny</li> </ul>

## 5.2 Na bázi hyaluronanu

Stejně jako chitosan je hyaluronan (HA) přírodní polysacharid, který je velmi často využíván v celé biomedicínské sféře a farmacii. Hyaluronan hraje velmi důležitou roli v lidském těle, jakožto součást extracelulární matric (ECM) a proto je vyhledáván i v aplikacích na krytí ran. Hyaluronan patří do skupiny glykosaminoglykanů a je to polymer, který je biodegradabilní, biokompatibilní a netoxický polymer. [32]



Obrázek 6 Hyaluronan

Tvoří ho jednotky D-glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu (obrázek 6). Podle délky jeho řetězce má různou funkci, obecně řečeno zastávají větší molekuly s delším řetězcem spíše regulační a strukturální funkce oproti menším fragmentům, které se podílí na angiogenezi, zánětu a imunostimulaci. [32]

Skupina, do které patří glykosaminoglykany, které jsou v ECM, mají na starost kontrolu buněčných funkcí, a to buď v přímém kontaktu pomocí vazebných receptorů a signálních molekul anebo nepřímo v závislosti na dostupnosti a bioaktivitě růstových faktorů a cytokinů. Právě nesulfátovaný hyaluronan má silné protizánětlivé vlastnosti a snižuje zánětlivé reakce imunitních buněk včetně makrofágů. [33]

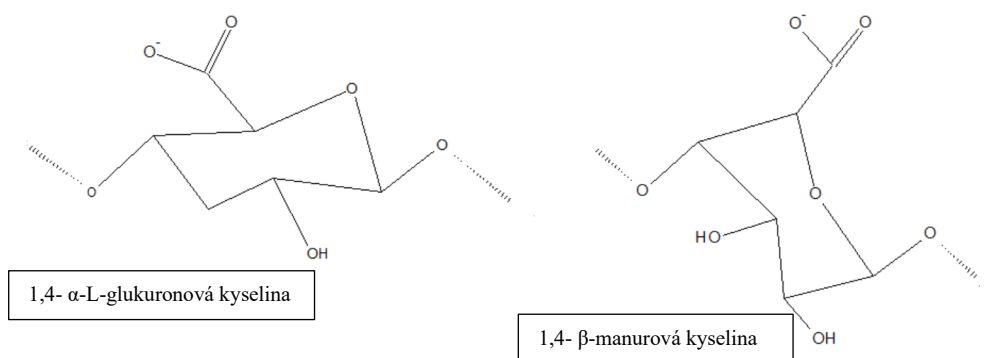
Hyaluronan se stejně jako ostatní přírodní polymery nebo polymery obecně často kopolymeruje s jinými. Např. ve studii Catanzano a spol. kopolymerovali alginát a hyaluronan metodou interního síťování. Bylo zjištěno, že přítomnost HA zpomalila gelační čas alginátu. In vitro scratch assay na různých buněčných liniích dokázal, že přítomnost HA podpořila migraci buněk, aniž by byla snížena buněčná viabilita. [34]

V další studii testovali, zda umožní zainkorporování HA nebo sulfátované HA do hydrogelů reverzibilní vazbu HB-EGF, mediátoru, který podporuje hojení ran aktivací epidermálních keratinocytů a dermálních fibroblastů. Hypotézu testovali *in silico* modelováním trojrozměrné struktury HB-EGF a na strukturální analýze jeho interakce s deriváty HA.

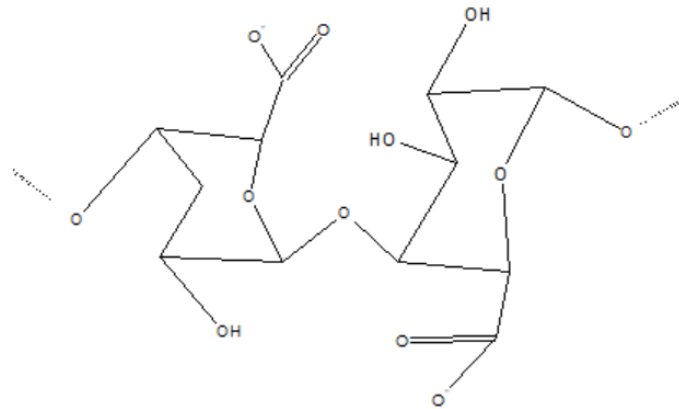
Výsledkem bylo potvrzení, že sulfátovaný HA významně zvyšuje účinnost HB-EGF na cílové buňky. [35]

### 5.3 Na bázi alginátu

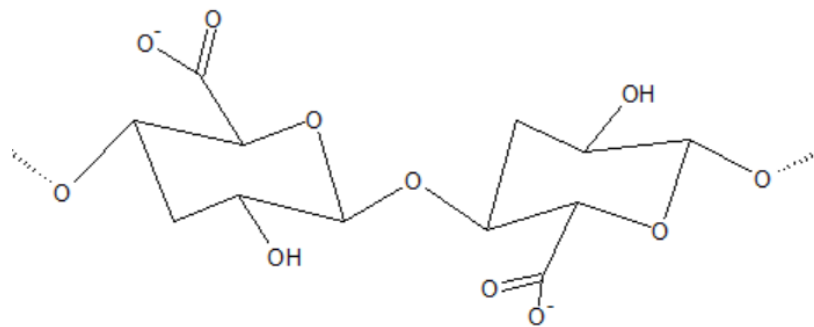
Alginát je přírodní ve vodě rozpustný polymer, který je složen z nesouměrných bloků střídajících  $\beta$ -D-kyselinou manuronovou (M) a 1–4 vázanými zbytky kyseliny  $\alpha$ -L-guluronové (obrázek 7). V polymerním řetězci alginátu se střídají jednotlivé bloky, které jsou buď homogenně (poly G – nebo poly M-) nebo heterogenně strukturované (MG). Jednotlivé bloky jsou znázorněny na obrázcích 7–10. Tyto specifické bloky a způsoby vazeb polymerů mezi oblastmi G-, M– a střídavými oblastmi mají za následek velkou rozmanitost řetězce a závisí na nich fyzikálně chemické vlastnosti a taktéž schopnost gelace. Oblasti G– a molekulová hmotnost polymeru mohou tvořit silnější nebo naopak slabší alginátové gely. [36]



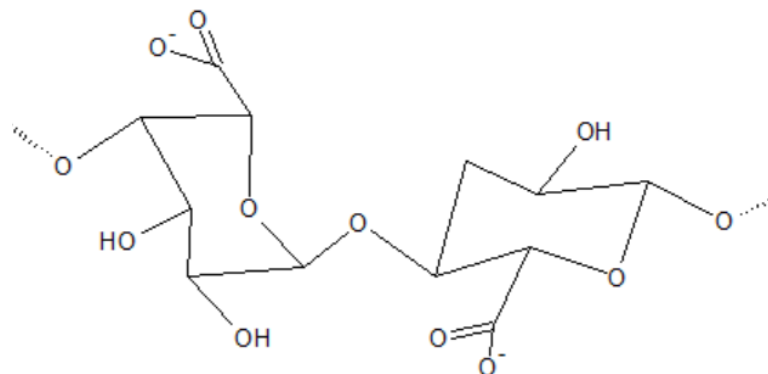
Obrázek 7 1,4-  $\alpha$ -L-glukuronová kyselina (vlevo) a 1,4-  $\beta$ -manurová kyselina (vpravo)



Obrázek 8 G-blok (spojení dvou guluronových kyselin)



Obrázek 9 M-blok (spojení dvou manurových kyselin)



Obrázek 10 GM-blok (spojení gulonové kyseliny – vpravo a manurové kyseliny-vlevo)

Alginát je získávaný z hnědých mořských řas a je široce využíván v medicíně díky jeho dobré biokompatibilitě, netoxicitě, hydrofilite a hemostatickým vlastnostem. Díky jeho

vysoké rozpustnosti ve vodných roztocích, dochází při styku s vodou k rychlé gelaci. Dá se využívat také k přípravě injektabilních hydrogelů. Alginát je solí kyseliny alginátové, která je nerozpustná ve vodě a organických rozpouštědlech, oproti tomu monovalentní alginátové soli jsou rozpustné ve vodě a tvoří stabilní roztoky. Při snížení pKa na hodnotu mezi 3,38 a 3,65 dochází k precipitaci alginátového biopolymeru. Iontová síla rovněž ovlivňuje rozpustnost gelů. Další fyzikálně-chemické vlastnosti jako viskozita a absorpce vody alginátových hydrogelů jsou závislé, jak již bylo řečeno především na poměru a obsahu G-, M- a střídavých bloků, molekulární hmotnosti. Viskozita se zvyšuje s klesajícím pH díky vyšší protonaci karboxylových skupin, které následně přitahují vodíkové vazby. Molekulovaná hmotnost polymeru pohybuje v široké škále a typicky v rozmezí 10 000 – 600 000 g/mol. Hodnota molekulové váhy má vliv především na mechanické vlastnosti výsledného hydrogelu. Tudíž v závislosti na molekulové váze se mohou tvořit silnější nebo naopak slabší alginátové gely. Čím vyšší je molekulová hmotnost, tím více jsou ovlivněny fyzikálně-chemické vlastnosti výsledného gelu (čím vyšší je molekulová hmotnost, tím se zvyšuje viskozita). [36,37]

Alginát sodný je vhodný také jako pomocná látka ve farmacii, protože je bezpečný, netoxický a nehromadí se v těle. Má schopnost chelatace, díky které je schopen vázat těžké kovy a chránit před jejich působením. Enzymatická degradace není možná u savců kvůli nepřítomnosti enzymu alginázy, který by byl schopen štěpit alginátový řetězec. [37]

Alginátové hydrogely mají díky jejich struktuře dělené na G a M bloky spoustu reakčních skupin. Proto existuje mnoho způsobů, jak připravit jejich hydrogely. Síťování může být buď chemického, nebo fyzikálního rázu. [38, 39]

Alginát je mimo jiné využíván jako biomateriál při hemostázi. Poměr mezi G a M bloky významně ovlivňuje charakterizaci daného hydrogelu a jeho funkčnost je dána karboxylovými a hydroxylovými skupinami. Aby bylo dosaženo hemostáze je důležité, aby došlo k rychlému vytvoření krevní sraženiny, rychlé absorpci a hojení. Algináty jsou pro ještě další zvýšení těchto vlastností často kopolymerovány například s anorganickými sloučeninami jako je zeolit nebo kaolin. Dalšími anorganickými sloučeninami může být oxid vápenatý, oxid křemičitý, oxid sodný nebo pentoxid fosforečný. [40]

Alginát však bývá mimo anorganické sloučeniny kopolymerován i s jinými sloučeninami např. jinými polymery. Ve studii Saleem a spol. byl zkoumán alginát kopolymerovaný s okragelem ve formě hydrogelových filmů v poměrech w/v 95:05; 85:15 a 75:05. Tyto poměry byly evaluovány ohledně jejich hemolytické a antioxidační aktivity, s tím že

všechny se prokázaly netoxické. Poměr 85:15 měl nejvýraznější výsledky a také absorboval více vody s nabobtnáním o 250 % po 10 týdnech. U in-vitro testů degradace ukázal naopak poměrně vysokou ztrátu vody již v prvním týdnu, ale oproti ostatním poměrům tento trend klesal v následujících týdnech. [41]

Jiné kompozity jsou využívány také jako scaffoldy, které mohou být vytisklé pomocí 3D tisku. Tyto se využívají v oblasti reparací kostních defektů. Ve studii Bahadoran a spol. kopolymerovali alginát s PVA a zkoumali, jaký poměr mezi alginátem a PVA je nejhodnější. Dívali se zejména na prostorovou strukturu, mechanické vlastnosti a rychlost prostupu páry hydrogelovým substrátem. Poté smísili směs s PCL mikrokuličkami potaženými fibroblastovým růstovým faktorem (H-bFGF) připraveným odpařením rozpouštědla s hydrogelem. Výsledný produkt měl dobrou mechanickou pevnost a enkapsulace růstových faktorů mikrosférami účinně redukovala náhlé uvolňování růstových faktorů a inhibovala růst *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Experimentální výsledky modelu hojení ran u krys ukazovaly, že kompozitní hydrogel mikrokuliček naplněný růstovým faktorem může účinně inhibovat vznik zánětu, a tak lépe podporovat regeneraci kožní tkáně. [42,43]



## 6 MODIFIKACE HYDROGELŮ

Jak již bylo zmíněno v úvodu a v předešlé kapitole, přírodní hydrogely mají i svá negativa, která se však dají obejít jejich modifikací. Tou může být například fyzikální či chemické síťování (příklady jsou uvedeny na obrázku 11), ale také například příměs aktivní látky zvyšující jeho vlastnosti jako např. zvýšení protizánětlivých a antibakteriálních vlastností u příměsi s polyvinylpyrrolidonem. U chemického síťování může docházet k tzv. internímu nebo externímu síťování, které také ovlivňuje jeho vlastnosti a chování.[44]



Obrázek 11 Příklady metod fyzikálního a chemického síťování alginátu

### 6.1 Fyzikální síťování

Fyzikální síťování je nejčastěji formováno na nekovalentních vazbách. Mezi těmito vazbami vznikají elektrostatické interakce, vodíkové vazby, propletení řetězců, makromolekulární elektrostatické interakce mezi polyanionickým alginátem a polykationtem apod. Mezi elektrostatické interakce je řazeno i ionické síťování, které je nejčastěji používanou metodou pro získávání alginátových hydrogelů. Jelikož obsahuje alginát vysoké množství karboxylových skupin má schopnost chelátovat divalentní kovové ionty jako například vápník, což vede k vytvoření hydrogelu. Jeden z postupů je přidání alginátu do roztoku soli, ve kterém je alginát rozpustná jako je roztok chloridu vápenatého a následného přidavku kovových iontu, které budou vnikat do strukturu „zvenčí“. Typy kovů ovlivní fyzikálně – chemické, popř. biologické vlastnosti vytvořeného gelu. [39,44]

### 6.2 Chemické síťování

Mezi chemické síťování patří např. radikálová polymerace. Ve studii Kapishon a spol. Se podařilo získat alginátový amfoterní kopolymer syntetizovaný transferem jednoho

elektronu, který vedl k radikálové polymeraci. Ačkoliv nechtěně, radikálová polymerace zde vedla k interakcím mědi s karboxylovými skupinami řetězce, což vedlo ke gelaci, která byla potvrzená TEM (transmisním elektronovým mikroskopem). [44]

Příkladem modifikace přípravy a modifikace hydrogelů může být studie od Chalitangkoon a spol. V této studii vyvinuli hydrogelový obvaz z hydroxyethylakrylického chitosanu a alginátu sodného síťováním vápenatými ionty. Tento obvaz byl nadále ponořen do roztoku nitrátu stříbrného, což následovala chemická reakce *in situ*. Výsledkem byl hydrogelový obvaz s navázanými stříbrnými nanočásticemi s dobrou antibakteriální aktivitou. Rovněž byla zvýšen stupeň bobtnání, pevnost v tahu a tažnost. Obvaz byl také méně toxický na testované Vero buňky a měl s nimi lepší kompatibilitu. Antibakteriální aktivita byla testována na *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* a byla prokázána. [45]

Některé alginátové hydrogely jakožto typy obvazů jsou již komerčně dostupné a to například:

- Algicell<sup>TM</sup>, který je kompozitem alginátu sodného a 1,4% stříbra a aplikován např. u diabetických vředů, bércových vředů a operačních ran. [46]
- Vivamel alginát, který je kombinací alginátu vápenatého a manuckého medu a je doporučen zejména u ran, které vylučují exsudáty. [47]

### 6.2.1 Interní vs externí síťování alginátových hydrogelů

Interní síťování funguje na principu disperze nerozpustné formy vápníku ve vodném roztoku alginátu (může být i přídavek nějakého konzervantu jako je EDTA tedy EDTA-Ca nebo roztok uhličitanu vápenatého). K takovému roztoku se následně přidá slabá kyselina, která pomalu uvolňuje vápenaté ionty do vodné fáze, přičemž dochází ke gelaci. Tento proces je poměrně pomalý a obvykle tvoří homogenní 3D síť. Externí síťování se provádí za pomoci rozpustné formy vápníku, jako je chlorid vápenatý, kdy dochází ve vodném roztoku alginátu k výměně sodných iontů za ionty vápenaté. Dochází zde k rychlé gelaci, ale roztok nebývá tak homogenní jako je tomu u interního síťování. [48,49]

Ve studii Shu a spol. sledovali rozdíly mezi gely, které byly zasíťovány interně a externě. Porovnávali zejména strukturu, texturu, distribuci vody a schopnost zadržovat a udržovat vodu. Bylo ukázáno, že u externě síťovaných gelů byl hrubší povrch, méně tvarovatelný, byl měkčí a o něco hůře zadržoval vodu oproti těm interně zesíťovaným. Tento jev byl přisouzen faktu, že tento mechanismus s ve vodě rozpustnou formou vápníku způsobila

nerovnoměrnou gelaci. U biologických testování, kde byly simulovány gastrointestinální účinky *in-vitro*, bylo pozorováno, že retence a uvolňování lykopenu jako biologicky aktivní látky z daných vzorků gelů byla vyšší u těch, které byly zasítovány interně, což bylo přisouzeno rovnoměrnější 3D struktuře. [50]

Rozdíly mezi externím a interním síťováním byly popsány experimenty také ve studii Chan a spol., nicméně popisovaly rozdíl u povrchových filmů. V této studii projevovaly externě zesítované alginátové matrice vyšší pevnost oproti interně síťovaným. Ty se ukázaly méně propustnými pro paracetamol, tudíž by mohly najít uplatnění jako povrchové filmy na léky na paracetamolové bázi. [51]

### 6.3 Inkorporace vodivého polypyrrolu

Mimo chemické a fyzikální síťování je rovněž možností modifikace vytvoření kompozitu z alginátu a jiné látky k alginátu za určitým cílem. Vodivé polymery jsou jedněmi z takových látek vyhledávány v biomedicínských aplikacích zejména kvůli vodivým vlastnostem. Konkrétně polypyrrol má dostatečnou vodivost za fyziologických podmínek a dá se chemicky konjugovat k jiným biomakromolekulám. V tkáňovém inženýrství se používá často za účelem vytvoření scaffoldů, nicméně díky jeho vlastnostem může být využit i v jiných aplikacích. Monomer polypyrrolu pyrrol je heterocyklická bioaktivní látka široce využívaná ve farmacii. Heterocyklické sloučeniny jsou cyklické sloučeniny obsahující alespoň dva různé prvky. Heterocyklické sloučeniny mohou být organické nebo anorganické a obsahují jeden uhlíkový atom a jeden nebo více atomů jiných prvků jako je síra, kyslík, dusík atd. Jednoduché N – heterocykly získaly pozornost zejména díky jejím důležitým biologickým vlastnostem. Pyrrolové podjednotky mají různé aplikace v terapeuticky aktivních sloučeninách jako jsou fungicidy, antibiotika, protizánětlivé léky, léky ke snížení cholesterolu, protinádorových léčiv a mnoha dalších. [52]

Polypyrrol může být ve formě prášku, koloidní suspenze nebo filmů. Nicméně jeho aplikace jsou omezené kvůli špatné rozpustnosti a zpracovatelnosti. Polypyrrolový prášek vykazuje vysokou polydisperzitu a širokou distribuci částic. Filmy jsou těžké na přípravu a jsou použitelné pouze na povrchové koutování. Ve studii Káčerová a spol. zjišťovali biokompatibilitu a potenciální využití koloidní formy polypyrrolu stabilizovaného polyvinylpyrrolidonem (PVP). Bylo zjištěno, že připravené roztoky koloidního polypyrrolu a PVP (1, 2 a 4 hm. %) prokazovaly nízkou cytotoxicitu, vykazovaly silné antioxidační účinky související s imunomodulační aktivitou založenou na vychytávání volných radikálů

neutrofilů atd. Nejlepší antioxidační aktivita byla pozorována u roztoku polypyrrolu s PVP (2 hm. %), kde byla minimální inhibiční koncentrace 234 µg/ml na *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Studie naznačovala, že koloidní forma polypyrrolu má potenciál také pro kompozity na bázi hydrogelu pro krytí ran. [53,54]

## 7 METODY TESTOVÁNÍ

### 7.1 UV-Vis

UV-Vis spektrofotometrie je široce užívaná metoda, která se používá při testování koncentrací a charakterizaci kinetiky reakcí a chemických procesů. Může být použita velmi jednoduše např. s viditelnými pH indikátory, ale také ve složitějších užitích jako jsou různé typy chromatografie. Aplikace této metody může být např. vyhodnocení obsahu farmaceutických složek v různých formulacích, jejich stabilita, reakční kinetika, rovnováha, vazby kovu nebo ligandu a kvantitativní analýzy. UV-Vis spektrofotometrie funguje na principu excitace elektronů. Elektron přechází při absorpci fotonu ze základního stavu do excitovaného. Při absorpci fotonu dochází k přechodu energie, který způsobí excitaci. K tomuto jevu dojde pouze, pokud má vlnová délka dopadající paprsku dostatek energie k excitaci elektronu. Tento přechod do excitovaného stavu je měřitelný pomocí absorbance, jelikož má elektron v tomto stavu vyšší potenciální energii v excitovaném stavu. V moment, kdy světlo projde monochromátorem, dopadá dále na vzorek s určitou vlnovou délkou a odpovídající energií. Poměr počáteční intenzity tohoto světla a konečné intenzity se měří a zaznamenává jako absorbance. Absorbance, která se takto změní při různých vlnových délkách, pak tvoří spektrum, které je specifické pro každou chemickou sloučeninu. Kromě absorpce energie vzorkem dojde také k dalším jevům jako je odraz světla, rozptyl, fluorescence/ fosforescence nebo jiné fotochemické procesy (např. i rozpad vazby). Podstatnou roli u spektrofotometrii hrají také rozpouštědla, a to zejména u UV-VIS. Stejně tak jako zkoumané vzorky, také rozpouštědla tvořící pozadí mají své spektra a pohlcují světelnou energii při určité vlnové délce. Pokud by taková vlnová délka interferovala s nějakými skupinami, které tvoří zkoumaný vzorek, není pak jasné říci, jestli pohlcuje záření nějaká skupina ve vzorku anebo jestli to je rozpouštědlo. [55,56]

Při UV-VIS spektrofotometrii je typicky vzorek měřen při rozpětí vlnových délek od 190 do 800 nm. Některé spektrofotometry mají rozpětí vlnových délek ještě rozšířené o NIR, oblast již v infračerveném spektru, a to v rozmezí vlnové délky 800-3200 nm. Z výsledného spektra se dají identifikovat vzorky pevné nebo kapalné, determinovat koncentrace určité molekuly v roztoku, charakterizovat absorbanci nebo transmitanci při různých vlnových délkách, zkoumat vlastnosti reflektance povrchu nebo měřit barvu materiálu a v neposlední řadě studovat chemické reakce a biologické procesy. Jako světelný vzor se využívají často deuteriové obloukové lampy, xenonové nebo různé typy halogenových lamp jako je např.

Tungsten-halogenová lampa. Dále přístroj disponuje monochromátorem, který propouští světlo jen při určité vlnové délce. Dále je zde místo pro vzorek a referenci. Při měření se používají podle vzorku různé typy kompartmentů jako jsou např. kyvety apod. Jako detektory bývají pak fotonásobiče, křemíkové diody, indium-gallium-arsenidové fotodiody aj. [57]

## 7.2 Reologie

Reologie je vědní disciplínou zkoumající deformaci a tok materiálů. Ty jsou velice úzce spojené s pojmem viskozita. Viskozita je vnitřní odpor kapaliny, který je způsobem vnitřním třením způsobeným pohybem kapaliny, který nutí jednotlivé molekuly uvnitř klouzat navzájem po sobě. Ty pak vyvíjejí průtokový odpor, který je způsobem vnitřním třením. [57]

Jelikož jsou hydrogely 3D polymerní sítě, tak obvykle drží dobře svůj tvar. Jejich viskoelastické chování charakterizováno zejména komplexní viskozitou, elastickým a ztrátovým modulem pak ovlivňuje jejich aplikace a interakce s okolím. Je několik reologických parametrů, které potřeba definovat. [58,59]

**Komplexní viskozita  $\eta^*$**  lze být popsána jako funkce úhlové rychlosti ( $\omega$ ) oscilačním poli vyjadřující celkový odpor toku popsáný v rovnici 1. [58]

$$\eta^* = G^* / \omega \quad (1)$$

Rovnice 1 komplexní viskozita a její vztah ke komplexnímu modulu a úhlové rychlosti

**Komplexní modul pružnosti  $G^*$** , který lze definovat jako vztah mezi smykovým napětím  $\tau$  a smykovou deformací  $\gamma$  (rovnice 2) a zároveň jako poměr mezi dynamickou ( $\eta'$ ) a ztrátovou viskozitou  $\eta''$  (rovnice 3). Popisuje celé viskoelastické chování vzorku a obdobně jako komplexní viskozita je složen z viskózní a elastické složky, přičemž viskózní složku reprezentuje ztrátový modul  $G''$  a elastickou elastický modul  $G'$  (rovnice 4). [58]

$$\eta^* = \eta' + i\eta'' \quad (2)$$

Rovnice 2 vztah mezi komplexní, dynamickou a ztrátovou viskozitou

$$G^* = \tau A \gamma A \quad (3)$$

Rovnice 3 komplexní modul jako vyjádření vztahu mezi smykovým napětím a smykovou deformací

$$G^* = G' + iG'' \quad (4)$$

Rovnice 4 komplexní modul jako vztah mezi elastickým a ztrátovým modulem

**Ztrátový faktor  $\tan(\delta)$**  popisuje poměr mezi viskózní a elastickou formou daného vzorku, tedy poměr mezi elastickým a ztrátovým modulem viz rovnice 5.

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (5)$$

Rovnice 5 komplexní modul jako vztah mezi elastickým a ztrátovým modulem

Pokud je tedy látka ideálně elastická, pak je  $\delta$  rovná  $0^\circ$ . Nemá tedy žádnou část, která by byla viskózní tedy,

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} = 0$$

Pokud však je látka ideálně viskózní, a tedy nemá žádnou elastickou část, znamená to že  $\delta$  rovná  $90^\circ$  a  $\tan(\delta)$  je hodnota blížící se nekonečnu. [59,60]

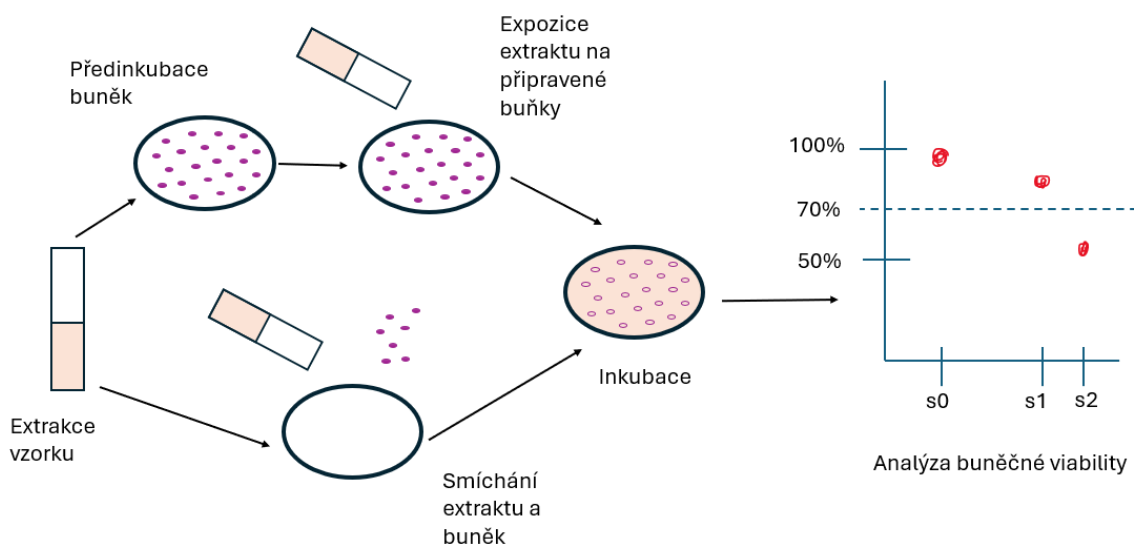
### 7.3 Stanovení cytotoxicity

Cytotoxicita je schopnost látky poškozovat buňku nebo způsobit její smrt. Buňky vystavené cytotoxickým sloučeninám mohou podstoupit nekrózu, apoptózu, autofagii nebo přestat aktivně růst a dělit se, čímž je snížena buněčná proliferace. [66]

Nekróza je forma předčasného odumření tkáně, který není programovaná jako je tomu v případě apoptózy. Obvykle je způsobená důsledkem poranění, záření nebo působením chemických látek. Naproti tomu apoptóza je tzv. programovaná buněčná smrt, kdy se buňky začnou postupně zmenšovat, aniž by jejich obsah pronikal do okolních tkání. Na jejich povrchu se začnou tvořit puchýřky a jádro se smršťuje. Buňka se následně oddělí od ostatních a zakulatí se a následně je fagocytována. V neposlední řadě, autofagie je proces transportu cytoplazmatických složek do lysozomu (degradační organela eukaryotických buněk). [67, 68, 69]

*In-vitro* testování cytotoxicity je často v případě zdravotnických potřeb zprostředkováno pomocí extraktů. V takovém případě se místo konečného zdravotnického prostředku, který

by se testoval přímo, používá jeho extrakt. Výsledný extrakt je vystaven na vrstvu předem inkubované buněčné vrstvy. Extrakt a buněčná vrstva se pak společně inkubují po daný čas a následně se vyhodnocuje buněčná viabilita. Schéma takového testování je zobrazeno na obrázku 13. Mimo testování extraktů je možné stanovit cytotoxicitu i v přímém kontaktu, kdy se na buněčnou vrstvu aplikuje přímo testovaný materiál. Buněčná viabilita se může sledovat mikroskopicky a/nebo kolorimetricky. Pokud je při kvantitativním vyhodnocení snížení buněčné viability vzorku oproti kontrole (buňky kultivované v čistém kultivačním médiu bez vzorku) o více jak 30 %, pak je materiál považován za cytotoxický. Specifikace pro *in vitro* testování cytotoxicity je popsán směrnici ISO 10993 v části 5. [70, 72]



Obrázek 12 Schéma postupu při testování cytotoxicity

#### 7.4 Stanovení buněčné adheze *in vitro*

Buněčná adheze je zásadní pro buněčnou komunikaci a regulaci a je to základní schopnost buněk tvořit a udržovat tkáňové struktury. Mechanické interakce mezi jednotlivými buňkami a extracelulární matrix (ECM) může ovlivnit a kontrolovat buněčné chování a funkci. Buňky jsou přenášeny extracelulární nebo intracelulární síly prostřednictvím lokalizovaných míst, na kterých jsou adherovány k jiným buňkám nebo ECM. Adhezní místa jsou tvořena transmembránovými proteiny zvanými integriny, které ukotvují buňku k matici nebo adhezní molekuly k jiným buňkám. Jak integriny, tak adhezní molekuly jsou spojeny s aktinovými filamenti. Cytoskelet tvořený filamenti drží jádro buňky a její tvar. Pasivní *in vitro* buněčná adheze je proces při statických podmínkách v médiu tedy např. v Petriho misce nebo v kultivačních láhvích. Během statické adheze *in vitro* buňky prochází

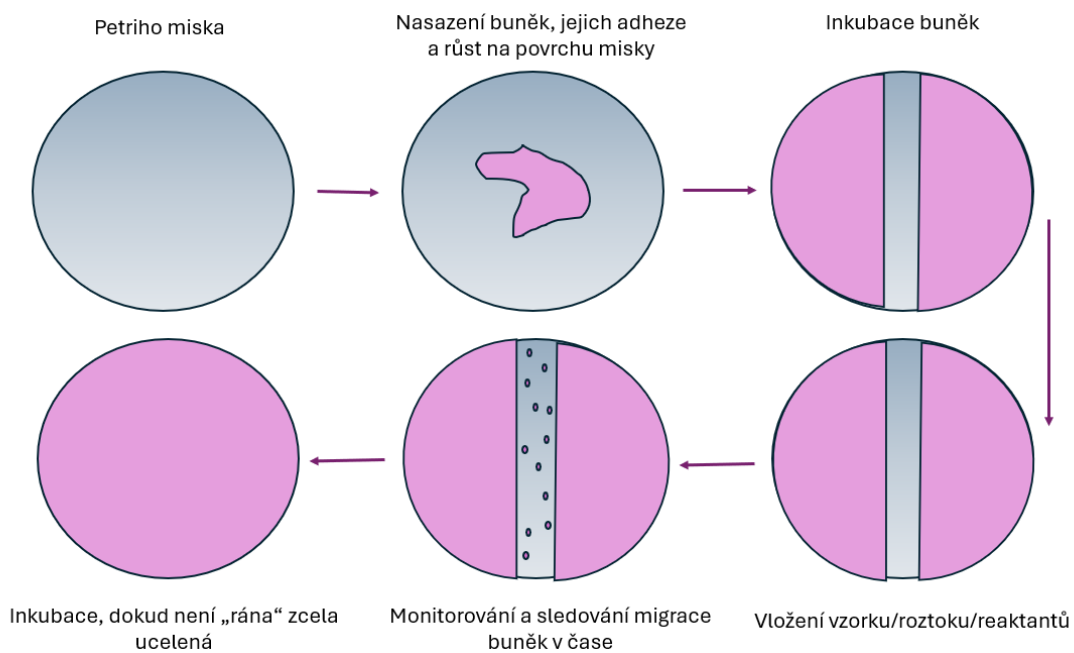


morfoložickými změny poháněnými pasivní deformací a aktivní reorganizací cytoskeletu. Integrinové receptory a další transmembránové proteiny hrají centrální roli u buněčné adheze a jejich rozšiřování. Proces je rozdělen do tří fází: připojení buněčné struktury na substrát, zploštění a rozprostření těla buňky a organizace cytoskeletu s tvorbou fokální adheze mezi buňkou a jejím substrátem. [64,65]

## 7.5 Test buněčné migrace

Scratch test neboli ve volném překladu test zacelování rýhy je jednoduchá, reprodukovatelná metoda běžně užívaná k měření parametrů buněčné migrace jako např. rychlost, vytrvalost a polarita. Při této metodě se buňky nechají narůst přirozeně do konfluentní monovrstvy. Konfluentní monovrstva vzniká, když adhezivní buňky pokryjí rovnoměrně povrch kultivační nádoby. Při kultivaci adherentních buněk je rychlost buněčného růstu stanovena na základě poměru kultivovaných buněk pokrývajících adhezivní povrch kultivační nádoby. V případě, že je 70-80 % adhezivního povrchu kultivační nádoby pokryto buňkami, tedy stále existuje i určitý prostor, který není pokryt, nazývá se takováto vrstva subkonfluentní. Pokud je však povrch pokryt celý, vrstva se nazývá konfluentní. V případě, že se vytvořila tedy konfluentní vrstva, tak se udělá tenká rýha seškrábnutím pipetovací špičkou, čím se nasimuluje rána. Buňky se na okraji rýhy polarizují a migrují směrem dovnitř, což je pravidelně monitorováno. Schéma postupu při scratch assay je znázorněna na obrázku 12. Výhoda této metody je, že není potřeba žádných specifických chemoatraktantů nebo gradientových komor a je možno dosáhnout silné směrové migrační odezvy i u buněčných typů, které nevykazují robustní odezvy v jiných migračních testech. Nejspolehlivěji se analyzuje při použití časosběrného zobrazování, které může také poskytnout cenné informace o buněčné morfologii nebo lokalizaci proteinu. [61,62]

*In-vitro* scratch assay je velmi často využívána právě při počátečním biologickém testování u materiálů, které jsou určeny na krytí ran. Např. ve studii Phonrachom a spol. zkoumali potencionální využití propolisem plněných kvarternizovaných hydrogelových filmů z chitosanu/pektinu, kde rovněž studovali buněčnou migraci do středu imitované rány na vzorcích. Čisté pektinové hydrogely kvůli desintegraci ve vodném prostředí nezkoumali, nicméně u jiných vzorků zjistili, že v jejich přítomnosti se oblast rány zmenšovala a buňky tedy migrovali do středu a spolu s dalšími testy jako antibakterialita, test adhezivity a reologie zjistili, že vzorky mají potenciál být prospěšné jako materiály pro krytí ran. [63]



Obrázek 13 schéma postupu scratch assay

## 8 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je příprava, charakterizace a biologické testování alginátových hydrogelů s příměsí koloidního polypyrrolu stabilizovaného polyvinylpyrrolidonem za účelem jejich aplikací v oblasti krytí ran.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 9.1 Materiály a přístroje

Pro experiment byl použit alginát sodný PRONATAL LF 200 S o  $M_w=298\,000$  g/mol (Novamatrix, Sandvika). Na přípravu koloidního polypyrrolu (PPy) byl použit pyrrol (Sigma-Aldrich Co.), chlorid železnatý (Sigma-Aldrich Co.), poly(vinylpyrrolidone) (PVP, Fluka, K90) o  $M_w=360\,000$  g/mol, kyselina chlorovodíková (Penta) a dialyzační membrána (Spectra-Por, MWCO=7000 g/mol). Dále byl pro syntézu alginátových hydrogelů použit dihydrát chloridu vápenatého (Sigma-Aldrich Co.) o  $M_w=147,01$  g/mol a dialyzační membrána schopná zachytit látky o molární hmotnosti nad 14 000 g/mol (z ang. „Molecular Weight Cut Off“) (Sigma-Aldrich Co.). Na biologické testování bylo využito Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco), fyziologický roztok pufovaný fosfátem (PBS, Biosera), trypsin (Biosera), 3-(4,5-dimethylthiazol-1-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromide (MTT, Duchefa Biochemie B.V.), ActinRed™ 555 (Thermo Fisher Scientific), Hoechst 33258 (Sigma Aldrich Co.), formaldehyd 36-38% (Penta), Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.) a dimethylsulfoxid (DMSO, Penta). Biologické testování bylo provedeno *in-vitro* na buněčné linii myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL-1658). Kultivační médium bylo připraveno za použití DMEM s přidavkem 10 % calf serum (BioSera) a 1 % Penicillin/Steptomycin (BioSera). Buněčná linie byla kultivována v kultivačních nádobách T-75 (TPP) za stálých podmínek 37 °C s řízenou atmosférou 5 % CO<sub>2</sub> a relativní vlhkosti 90 % v inkubátoru Heracell 150i (ThermoScientific). Na testování byly využity mikrotitrační destičky pro tkáňové kultury (TPP) 12, 24 a 96 jamkové. Buňky byly sledovány pod invertním mikroskopem Olympus IX51 s fázovým kontrastem, pod kterým byly rovněž pořízeny všechny fotografie. Manipulace s buňkami byla prováděna ve flowboxu Alpina. Reologie byla měřena na rheometru Anton Paar H-PTD200 a UV-Vis spektrofotometrie na spektrometru Lambda 1050 (Perkin-Elmer) a absorbance na multifunkčním readru Infinite M200 (Tecan).

Všechny chemikálie byly analytické úrovně a byly použity bez další úpravy. Pro experimenty byla využívána UPW (z ang. Ultra Pure Water) z vodivosti menší než 0,1  $\mu\text{S/cm}$ .

## 9.2 Příprava koloidního polypyrrolu

Roztok koloidního PPy byl připraven a stabilizován pomocí PVP. Nejprve byl připraven 2 hm. % roztok PVP rozpuštěním v 25 ml UPW. Dále byl připraven 5 mmol roztok pyrrolu a to rozpuštěním 0,335 g PPy v UPW. Do připraveného roztoku PPy byl přidán 2 hm. % roztok PVP. Nový roztok PPy/PVP byl sonifikován po dobu 30 minut k dosažení homogenity. Následovně bylo 50 ml připraveného oxidačního činidla o koncentraci 5 mmol vodného roztoku chloridu železnatého přidáno k PPy/PVP. Roztok se nechal polymerovat při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Následně byl připravený koloid PPy/PVP nadávkován do dialyzační membrány (MWCO=7000 g/mol) a byl dialyzován proti 0,2 M roztoku HCl, aby došlo k vyčištění od nezreagovaných monomerů a oxidačních iontů.

## 9.3 Příprava alginátových hydrogelů

Byly rozpuštěny dva typy alginátu: oxidovaný a neoxidovaný. Každého z alginátu bylo připraveno 10 ml o koncentraci  $c = 1,8\%$ . Z oxidovaného alginátu byl namíchán poměr 1:1 s neoxidovaným a tyto vzorky, následně ještě modifikované, byly označeny jako ONA. Rovněž byl dále modifikován samotný neoxidovaný alginát, jehož vzorky byly pojmenovány jako NA.

Dále bylo rozpuštěno 84,8 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  ve 100 ml UPW.

Byly připraveny dvě série vzorků hydrogelů, jedna vždy obsahovala 3 ml směsi 1:1 oxidovaného a neoxidovaného alginátu (ONA) a druhá vždy 3 ml neoxidovaného (NA) alginátu. Ke každé sérii bylo dále přidáno 0  $\mu\text{l}$ , 124  $\mu\text{l}$  a 248  $\mu\text{l}$  koloidního polypyrrolu. Vzorky s přídatkem 0  $\mu\text{l}$  byly označeny jako ONA0/NA0, vzorky s 124  $\mu\text{l}$  jako ONA1/NA1 a vzorky s 248  $\mu\text{l}$  byly označeny jako ONA2/NA2. Pro přehlednost je značení vzorků uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2 Značení vzorků

Poměr Neoxidovaný: Oxidovaný alginát	Množství PPy ( $\mu$ l)	Značení vzorků
1:0	0	NA0
	124	NA1
	248	NA2
1:1	0	ONA0
	124	ONA1
	248	ONA2

#### 9.4 UV-Vis absorpce

Měření UV-Vis spektra všech vzorků probíhalo na přístroji Lambda 1050 (Perkin-Elmer). Rozsah měření byl nastavení v rozmezí 250-800 nm. Zároveň probíhalo i měření referenčního vzorku s ohledem na kalibraci a kompenzaci nežádoucích efektů. Spektra byly měřeny v transmisním módu.

#### 9.5 Reologické vlastnosti

V rámci reologických vlastností byly stanovené ztrátový, elastický modul a ztrátový faktor v závislosti na úhlové rychlosti. Tyto parametry byli stanovené na rotačním reometru Anton Paar – Modular Compact Rheometer MCR 502. Měření probíhalo při konstantní teplotě 37°C. Jako teplotní jednotka pro tyto účely byla použita jednotka typu H-PTD200. Vzorek byl smýkán v oscilačním režimu při geometrii deska-deska o průměru 15 mm. Hodnota deformace byla nastavena na 1 %, při této hodnotě se smykání vzorků nacházelo ještě v oblasti lineární viskoelastivity. Frekvence pak byla při této hodnotě deformace měřena od 0 do 10 Hz.

#### 9.6 Pasážování buněk

Buněčná linie NIH/3T3 byla kultivována v kultivačních nádobách v inkubátoru a před pasážováním bylo třeba zkontrolovat, zda jsou buňky v pořádku a použitelné pro experiment prohlédnutím pod mikroskopem. Následně bylo ve flowboxu nejprve odsáto médium a

následně byly buňky prochláchnuty 15 ml PBS. PBS se následně odsálo a byly přidány 4 ml trypsinu, tak aby trypsin pokrýval plochu, na které rostly buňky. Trypsin enzymaticky štěpí vazby mezi jednotlivými buňkami, ale rovněž vazby mezi buňkami a kultivační nádobou, kde jsou adherovány a tím se od ní uvolní. Následně byla kultivační nádoba s působícím trypsinem a buňkami přesunuta na 5 minut do inkubátoru. Po uplynulé době byla kultivační nádoba vyndána a k neutralizaci trypsinu bylo přidáno kultivační médium ve stejném poměru k trypsinu, tedy 4 ml kultivačního média. Celý obsah byl následně přesunut do zkumavky, která byla vložena do centrifugy, kde byl obsah odstředován po dobu 3 minut při otáčkách 1100 za minutu a teplotě 37°C. Jakmile uplynuly 3 minuty buňky byly usazeny na dně zkumavky a supernatant (obsah nad sedimentem) byl odsát. Koncentrace buněk byla s přidavkem 1 ml média  $2 \cdot 10^7$  buněk na 1 ml média. Následně bylo provedeno ředění na výslednou koncentraci  $2 \cdot 10^5$  buněk na 1 ml média.

## 9.7 Stanovení cytotoxicity z extraktů

Extrakty byly připraveny podle normy ČSN EN ISO 10 993-12. Nejprve byly zváženy jednotlivé vzorky hydrogelů a ty byly vloženy do zkumavek. Podle normy ČSN EN ISO 10 993-12 bylo následně k jednotlivým vzorkům přidáno podle jejich hmotnosti kultivační médium v poměru 0,1 g vzorku ku 1 ml kultivačního média. Zkumavky se vzorky s daným poměrem kultivačního média byly následně přesunuty na temperovanou třepačku, kde byly ponechány po dobu 24 hodin při 37°C. Buňky o koncentraci  $2 \cdot 10^5$  na 1 ml média byly následně nasazeny na mikrotitrační destičku o 96 jamkách (do 1 jamky bylo dávkováno 100 μl) a inkubovány rovněž po dobu 24 hodin a teplotě 37°C. Po uplynutých 24 hodinách bylo z mikrotitrační destičky odsát její obsah a následně se do jednotlivých jamek dávkovalo opět 100 μl, kdy se měnil poměr extraktu k médiu. Koncentrace extraktu pro jednotlivé vzorky byly 100, 75, 50, 25, 10 a 5 % se čtyřmi opakováními. Jedna celá mikrotitrační destička se nechala jako reference, tzn. že buňky byly kultivovány v čistém kultivačním médiu bez přidavku extraktů. Následně byly destičky kultivovány dalších 24 hodin a poté byl proveden MTT test.

### 9.7.1 MTT test

Na MTT testování bylo zváženo 20 mg MTT, které bylo rozpuštěno v UPW s výslednou koncentrací 5 mg/ml. MTT je kolorimetrická metoda založena na redukci žluté tetrazoliové soli metabolicky aktivními buňkami, kdy ji mitochondrie buněk mění na fialové krystalky.



Vzniklé krystalky se následně rozpustí pomocí solubilizačního roztoku a následně je proměřeno a vyhodnoceno spektrofotometriky.

U kultivovaných buněk v 96 jamkové destičce bylo nejprve vyměněno médium, k němuž bylo následně přidáno MTT. Roztok MTT byl dle ISO normy ponechán působit po dobu 4 hodin a následně byl odsát. Jako solubilizační činidlo bylo použito DMSO, které bylo napipetováno do jednotlivých jamek, přičemž do jedné bylo pipetováno vždy 100  $\mu$ l. DMSO působilo po dobu 15 minut a následně byla proměřena absorbance na spektrofotometru Infinite M200 při vlnové délce 575 nm. Referenční pozadí DMSO bylo proměřeno při absorbanci 670 nm. Byly proměřeny reference i vzorky, kdy reference odpovídá 100 % viabilitě a vzorky byly porovnávány oproti této hodnotě.

## 9.8 Stanovení cytotoxicity v přímém kontaktu

K stanovení cytotoxicity v přímém kontaktu byla použita 48jamková mikrotitrační destička, na které byly nasazeny buňky v koncentraci  $2 \cdot 10^5$  na 1 ml média. Buňky byly následně kultivovány v kultivačním médiu po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách bylo vyměněno médium a na destičku byly přidány jednotlivé vzorky hydrogelů a následně ponechány působit v přímém kontaktu po dobu dalších 24 hodin. Po expozici byly buňky fluorescenčně nabarveny (viz kapitola 9.9.1) a morfologicky sledovány. Všechny vzorky se testovali v triplikátech.

## 9.9 Buněčné adheze a proliferace

Na test buněčné adheze byla použita 48jamková mikrotitrační destička. Do jednotlivých jamek byly přidány jednotlivé vzorky hydrogelů a na jejich povrch byla napipetována buněčná suspenze v koncentraci  $5 \cdot 10^5$  na 1 ml média. Buňky byly ponechány adherovat po dobu 1 hodiny a následně byly jamky doplněny kultivačním médiem. Každý vzorek byl sledován dvakrát a rovněž byly sledovány dvě reference pro porovnání. Předpokladem bylo, že buňky nebudou na hydrogelech růst, jelikož v kožních aplikacích to není žádoucí. Buňky byly dále nabarveny a pozorovány pod mikroskopem.

### 9.9.1 Barvení buněčných jader a cytoskeletu

Z jednotlivých misek byly nejprve odebrány hydrogely a následně bylo odsáto médium a buňky byly propláchnuty PBS. Následně byl, kvůli fixaci, přidán 4% formaldehyd, který působil 15 minut, poté byl odsán a buňky byly znovu promyty PBS. Dále byl, kvůli

permeabilizaci, přidán 0,5% Triton X-100, který působil 5 minut a následně byly buňky několikrát propláchnuty PBS. Po několika promytích se poslední dávka PBS nechala na miskách a k němu se přidaly barviva. Tato práce již byla prováděna v přítomnosti. Přidaly se 2 kapky barviva ActinRed™ 555, které barví cytoskelet červeně a barvivo Hoechst o koncentraci 10 µg/ml barvicí buněčné jádro na modro. Následně byla mikrotitrační destička s takto připravenými vzorky vložena do inkubátoru na půl hodiny. Po uplynulé době byl obsah odsát a v neposlední řadě bylo přidáno PBS. Následně byly výsledky pozorovány a fotografie pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81 s fázovým kontrastem.

### 9.10 Příprava vzorků na scratch assay

Pomocí scratch assay bylo pozorováno, zda za přítomnosti hydrogelů budou buňky migrovat do místa, kde je způsobená čára, která imituje ránu. Na 24- jamkovou mikrotitrační destičku byly nasazeny buňky v koncentraci  $2 \cdot 10^5$  na 1 ml kultivačního média a následně byly buňky kultivovány až do dosažení konfluence. Mikrotitrační špičkou byly buňky uprostřed každé jamky seškrábnuty v podobě středové čáry a následně byly na dané jamky aplikovány jednotlivé vzorky hydrogelů. Dále se vždy v určitých časových intervalech sledovalo pod mikroskopem, zda buňky migrují. Test byl ukončen po zaznamenání prvního zacelení „rány“.

## 10 VÝSLEDKY A DISKUZE

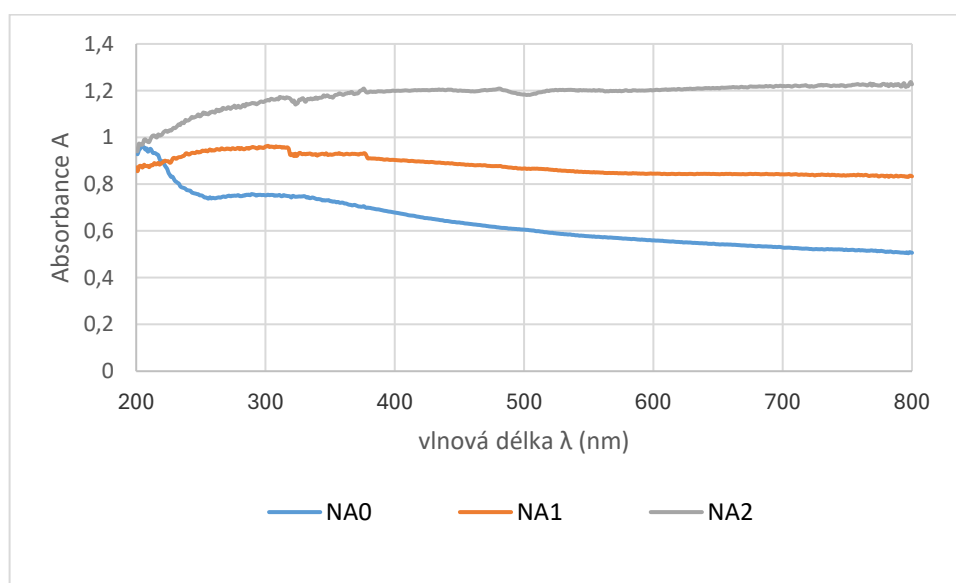
### 10.1 Materiálová charakterizace alginátových hydrogelů

Stanovování materiálových vlastností hydrogelů pro krytí ran je důležitou součástí vývoje a testování těchto slibných biomateriálů. Informace o materiálových vlastnostech pomáhají optimalizovat vývoj hydrogelů a zajišťovat konzistentní kvalitu produktů pro krytí ran. Vývoj hydrogelů s optimálními materiálovými vlastnostmi pro krytí ran je důležitý pro zlepšení hojení ran, pohodlí pacientů a prevenci infekce.

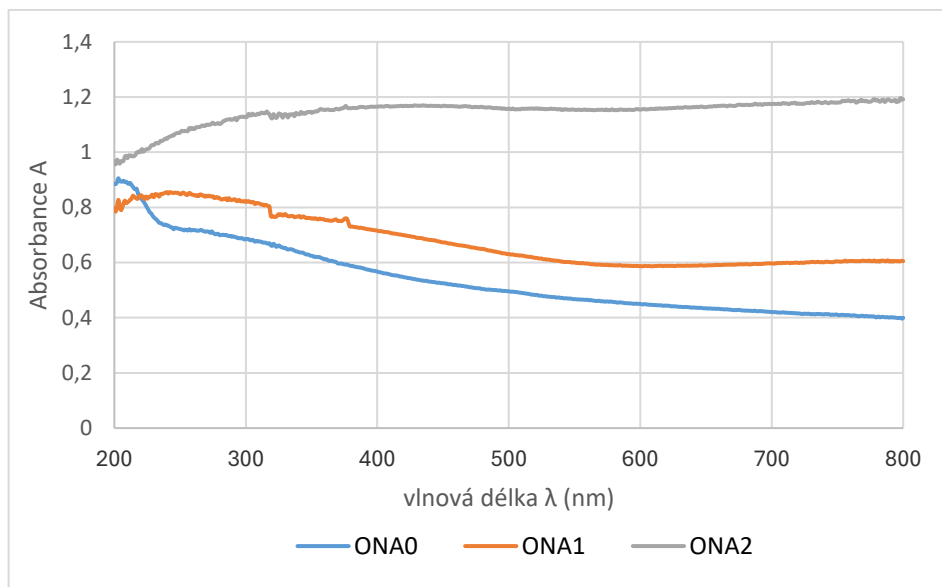
#### 10.1.1 UV-Vis

Stanovení UV-Vis absorpce je relativně jednoduchá a nenáročná technika, která poskytuje cenné informace o složení hydrogelů. Díky tomu je důležitým nástrojem pro výzkum a vývoj hydrogelů a pro jejich aplikace v různých oblastech. Z důvodu inkorporace koloidního PPy do připravených hydrogelů jakožto bioaktivní složky, byla na důkaz přítomnosti PPy ve vzorkách použita právě metoda UV-Vis absorpce.

Na UV-VIS spektrofotometru Perkin-Elmer Lambda 1050 byly měřeny absorpance při vlnové délce  $\lambda=200-800$  nm z data intervalem 1 mm.



Graf 1 Závislost absorpance na vlnové délce u vzorků NA0-2



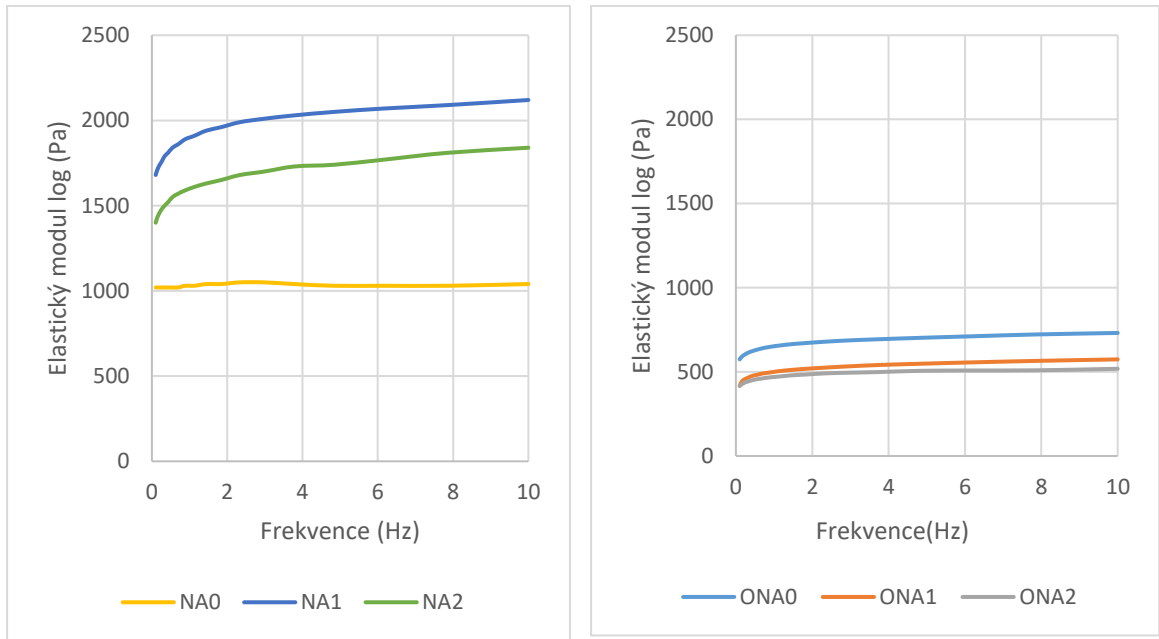
Graf 2 Závislost absorpce na vlnové délce u vzorků ONA0-2

Z měření UV-VIS spektrofotometrie lze pozorovat na grafu č.1 jednotlivá spektra pro vzorky ONA0-2, kdy se zvýšila a posunula nahoru absorpce u vzorků ONA1 a ONA2, kde byly přídavky polypyrrolu. V případě, že je alginát síťován společně s polypyrrolem, který je sám o sobě látka tmavá, dojde k celkové změně vzhledu u výsledného hydrogelu, což způsobuje posunutí křivek. Polypyrrol má absorpční vlnovou délku podle literatury okolo 446 nm. Při testování vzorků s vyšším množstvím PPy, tj. ONA2 a ONA2 je možno v této oblasti pozorovat mírný pík. V závislosti na zvýšené absorpenci při všech vzorcích obsahujících PPy, lze konstatovat, že PPy byl úspěšně inkorporován do všech hydrogelů. [71]

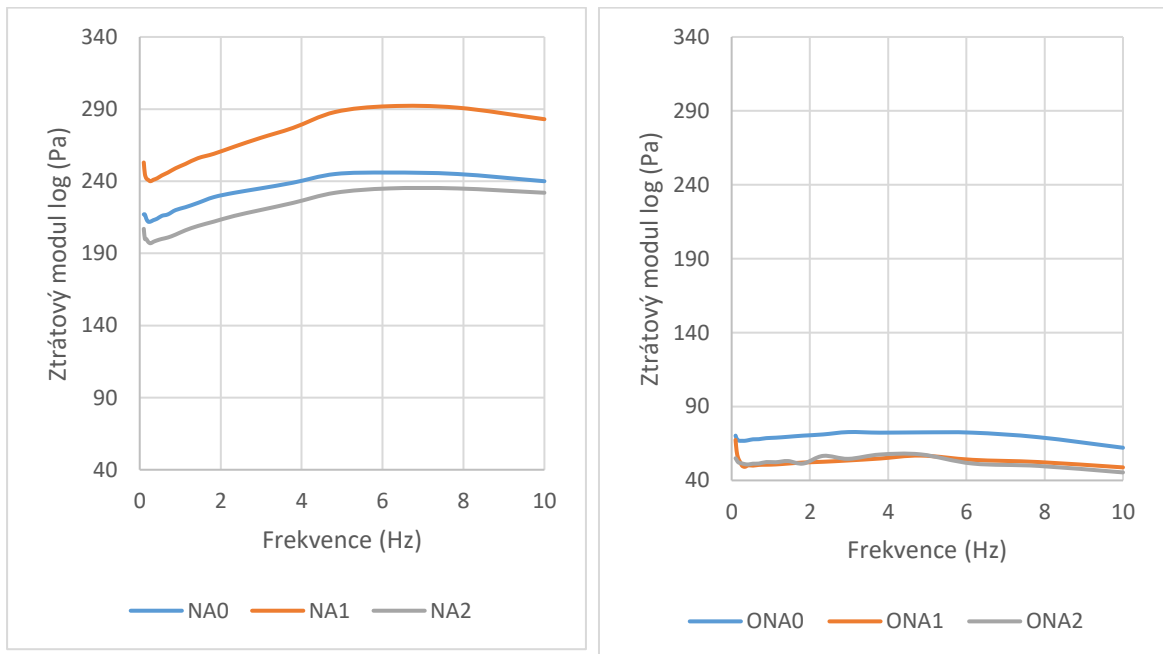
### 10.1.2 Reologie

Hydrogely by měly mít vhodné mechanické vlastnosti, aby odolaly tlaku a tahu, které se na ně při hojení ran vyvíjejí. To je důležité pro zajištění stability krytí rány a pro prevenci mechanického poškození rány. Proto byly stanovené reologické vlastnosti připravených hydrogelů.

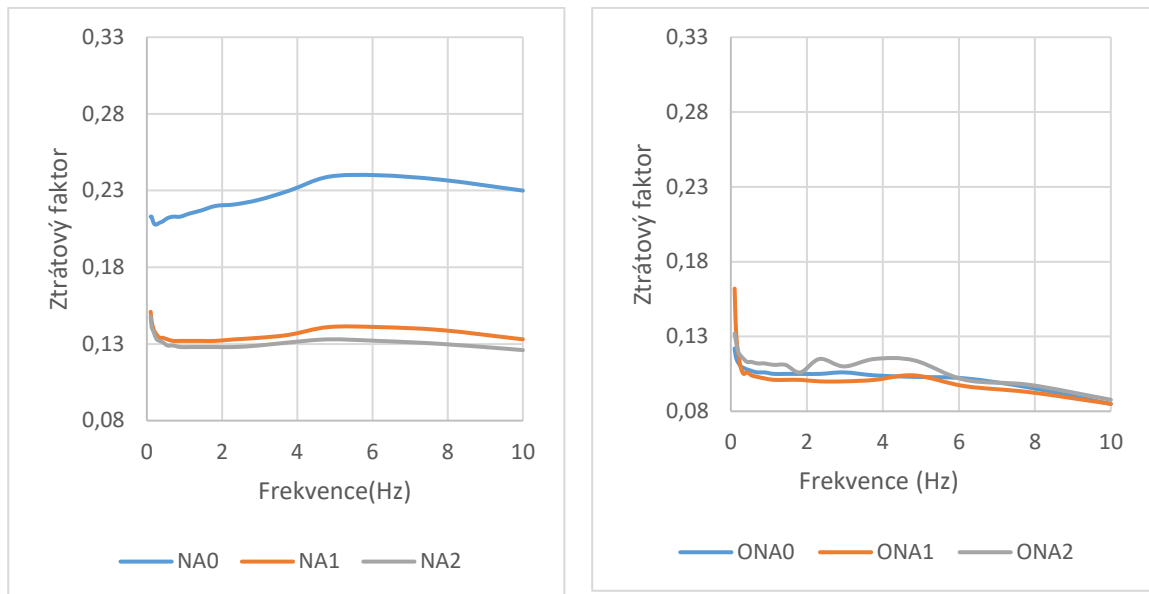
Na rheometru Anton Paar H-PTD200 se vzorky měřily při fyziologické teplotě 37 °C na geometrii deska – deska, přičemž jedna z nich měla zdrsňený povrch, aby nebylo měření ovlivněno skluzem po hladkém povrchu. Byly u nich sledovány ztrátový, elastický modul a ztrátový faktor v závislosti na frekvenci. Frekvence byla měřena od 0 do 10 Hz při 1 % deformaci.



Graf 3 Závislost elastického modulu na frekvenci u vzorku NA0-2 (vlevo) a vzorků ONA0-2 (vpravo)



Graf 4 Závislost ztrátového modulu na frekvenci u vzorku NA0-2 (vlevo) a vzorků ONA0-2 (vpravo)



Graf 5 Změna ztrátového faktoru v závislosti na frekvenci u vzorku NA0-2 (vlevo) a vzorků ONA0-2 (vpravo)

Jak lze pozorovat na grafu č.1 elastický modul se u vzorků NA0-2 pohybuje mezi 2000-3000 Pa oproti vzorkům ONA0-2, kde je o něco nižší a pohybuje se mezi 400-700 Pa. U ztrátového modulu je trend podobný, kdy se mezi hodnotami 190-300 Pa pohybují vzorky NA0-2 a u vzorků ONA0-2 je ztrátový modul mnohem nižší mezi 40 a 90 Pa. Obecně lze z toho vyhodnotit, že jsou všechny vzorky při 37 °C spíše elastické než viskózní, nicméně u vzorků ONA0-2 bylo znatelné, že jsou vzorky méně elastické než vzorky NA0-2.

Konkrétněji u vzorků NA0-2 lze také pozorovat, že vzorek NA1 měl nejvyšší hodnotu elastického modulu a i ztrátového. Poměr mezi těmito moduly určuje právě ztrátový faktor. Ten byl pro vzorky NA1 a NA2, tedy vzorky s přidavkem polypyrrolu nižší a s velmi podobnými hodnotami oproti vzorku NA0, který byl bez přidavku polypyrrolu. Zajímavé dále je, že v porovnání měly vzorky NA0-2 mezi sebou odlišné výsledky a je zde znatelný rozdíl při přidání polypyrrolu. Oproti tomu u vzorků ONA0-2 ten rozdíl, tak znatelný není. Stejně jako tomu bylo u vzorků NA0-2, tak i u vzorků ONA0-2 lze také pozorovat snížení elastického a ztrátového modulu u vzorků s přidavkem polypyrrolu. Co se týče ztrátového faktoru jako poměru mezi viskózní a elastickou částí vzorků, tak oproti NA0-2 byl ztrátový faktor velmi podobný pro všechny tři vzorky ONA0-2.

## 10.2 Biologické testování

Při vývoji materiálu pro využití v oblasti medicíny, či tkáňového inženýrství, je vždy velmi důležitá biokompatibilita materiálu. Biokompatibilní materiál je takový, který nevyvolává

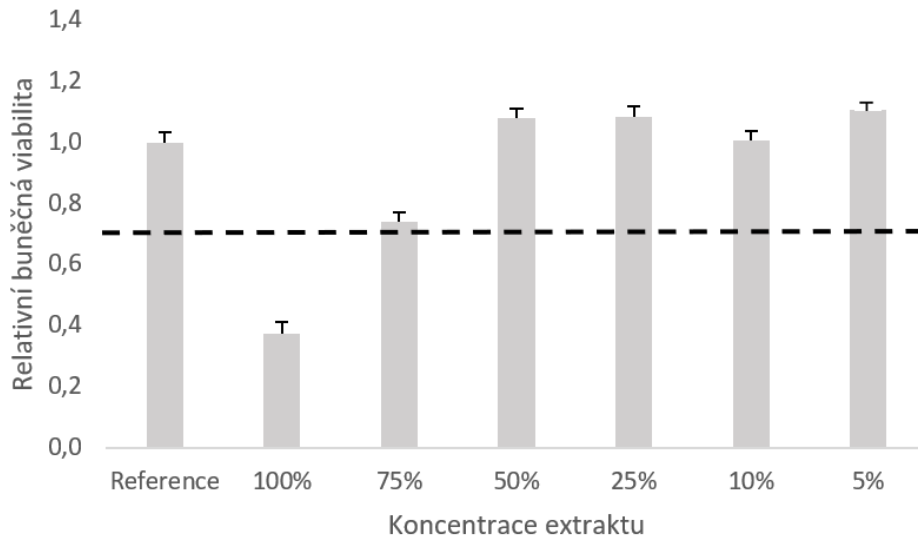
alergické ani žádné jiné nežádoucí účinky u příjemců. Hodnocení biologických vlastností hydrogelů se provádí pomocí různých *in vitro* technik. Stanovení biokompatibility závisí na konkrétní zamýšlené aplikaci materiálů, konkrétně testy, které je nutné vykonat, jsou uvedeny v ČSN ISO 10 993 část první. Základním stanovením při každé zamýšlené aplikaci je stanovení cytotoxicity. V případě testování materiálů určených pro krytí ran je pak důležité stanovení přilnavosti buněk na povrchu materiálu a také schopnost zacelení rány, které se sleduje pomocí tzv. scratch testu. [72]

### 10.2.1 Buněčná cytotoxicita extraktů

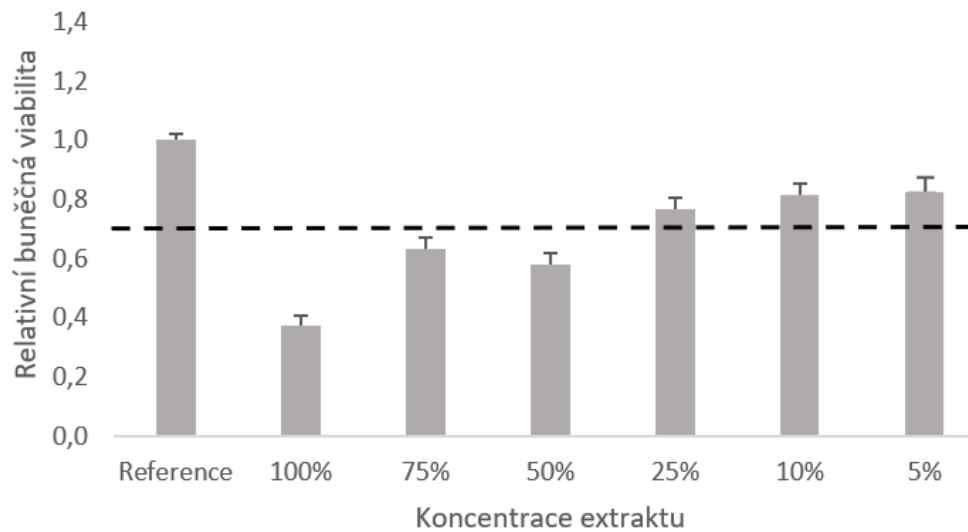
Cytotoxicita vyjadřuje schopnost látky poškozovat nebo zabíjet buňky. Testování cytotoxicity je klíčovou součástí testování biokompatibility, která zajišťuje, že materiály používané ve zdravotnictví nejsou pro tělo škodlivé. Celkově hraje testování cytotoxicity zásadní roli při ochraně lidského zdraví tím, že zajišťuje bezpečnost a účinnost různých substancí a materiálů, které interagují s živými buňkami. Vzhledem k zamýšlené aplikaci připravených hydrogelů jako krytí ran, bylo teda testování cytotoxicity samozřejmostí.

Cytotoxicita byla stanovena dle ČSN ISO 10 993 za využití myších fibroblastů, jakožto buněk, které se podílí na udržení homeostáze a uplatňujících se v tkáňové reparaci. Dle části 5 normy ČSN ISO 10 993 je možné stanovit cytotoxický účinek na extraktech, v přímém kontaktu nebo nepřímým stykem. V rámci této práce byla cytotoxicita stanovena na extraktech a přímým stykem.

Hodnocení cytotoxicitu extraktů hydrogelů bylo vyhodnoceno kvantitativním vyhodnocením buněčné viability pomocí MTT testu. Dle normy látka vykazuje cytotoxický účinek při poklese životaschopnosti buněk pod 70 %, tato hodnota je v grafech 6–11 vyznačena čárkovanou linií.

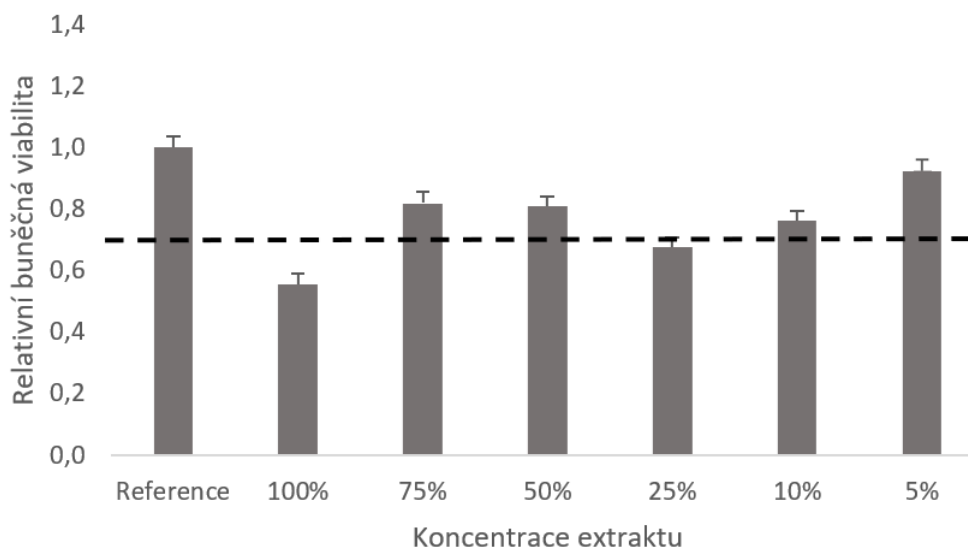


Graf 6 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku NAO



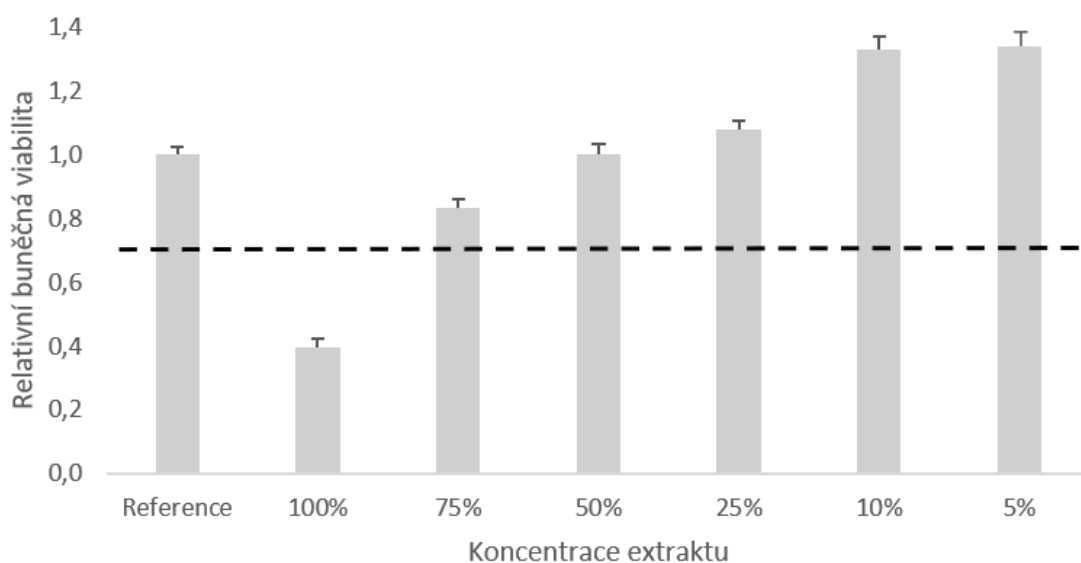
Graf 7 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku NA1



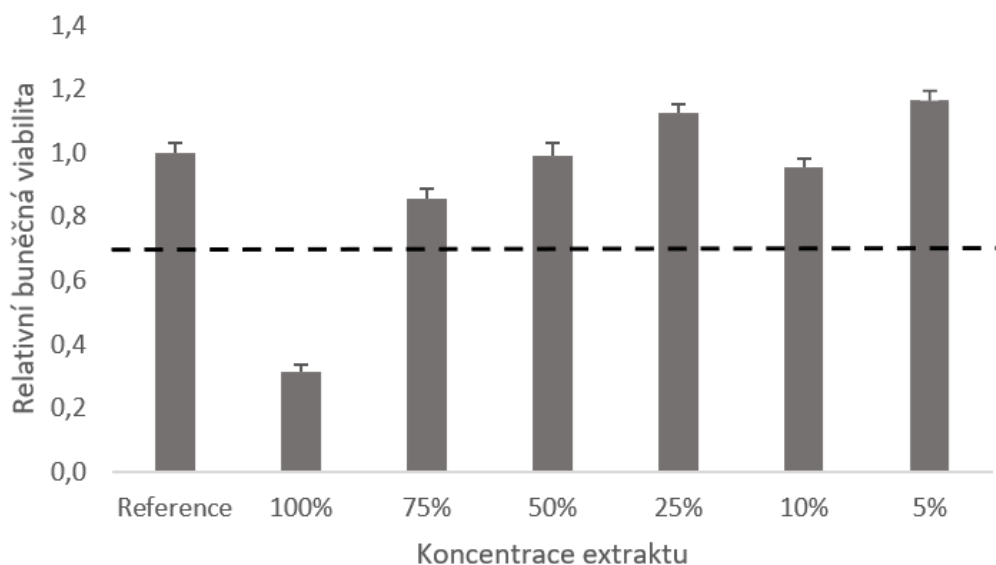


Graf 8 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku NA2

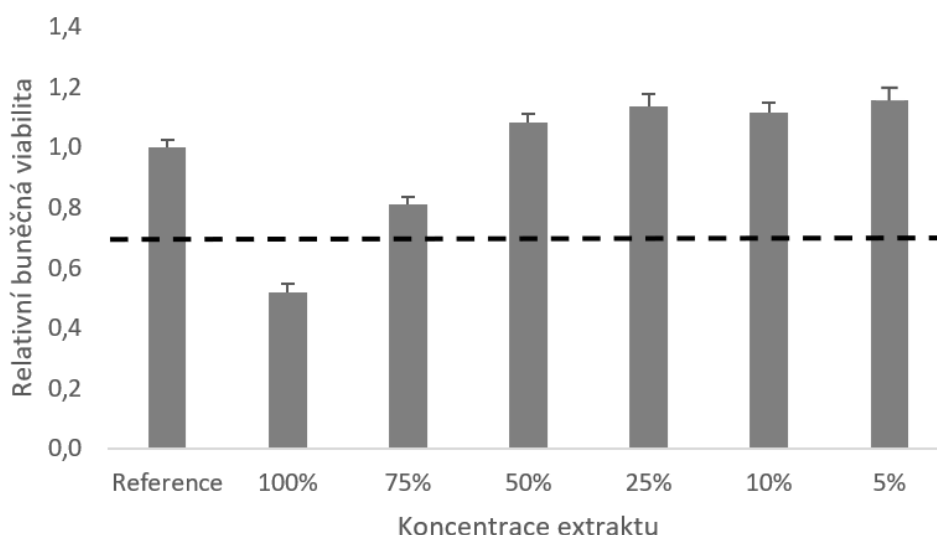
Jak lze pozorovat na grafu 6, vzorek NA0 při koncentraci extraktu 100 % a 75 % vykazoval cytotoxický efekt. Nicméně koncentrace 50, 25, 10 a 5% cytotoxické nebyly. Oproti tomu na grafu 7 u vzorku NA1 byla cytotoxicita pozorována u 100, 75 a 50 % koncentrace extraktu. U koncentrace 25 % byla cytotoxicita na hraně a 10 a 5 % cytotoxické nebyly. Na grafu 8 lze pozorovat vzorek NA2, kde byl nejvyšší přídavek polypyrolu. Vzorek byl cytotoxický pouze při 100% Ostatní koncentrace cytotoxické nebyly. Mírný pokles viability při koncentraci 25 % je přisuzován chybě měření.



Graf 9 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku ONA0



Graf 10 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku ONA1



Graf 11 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku ONA2

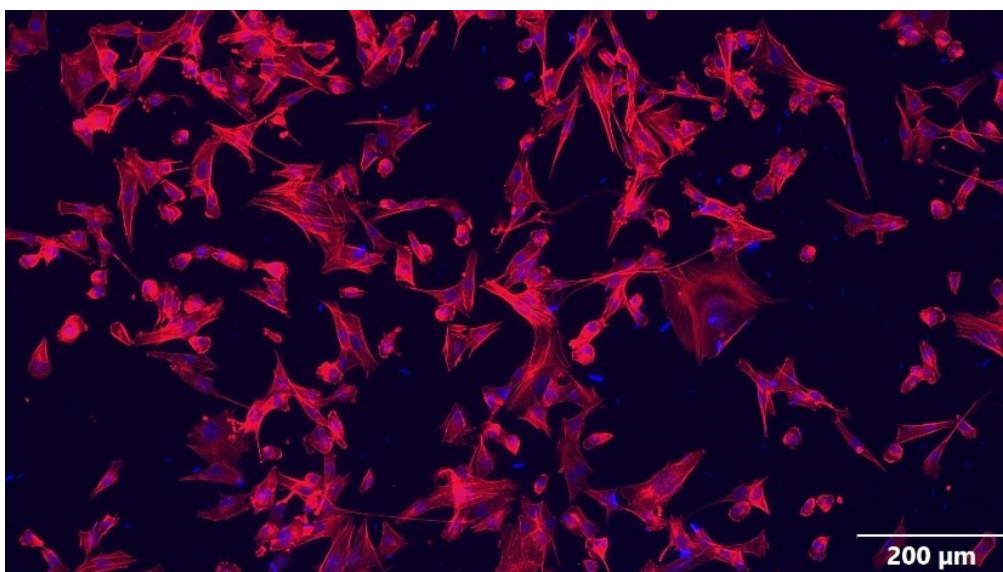
Buněčná viabilita u vzorku ONA0-2 pozorovány na grafech 9-11 prokázala cytotoxicitu u všech třech při 100 % koncentraci extraktu. Nicméně u žádných jiných koncentrací u všech vzorků cytotoxicita pozorována nebyla. Oproti vzorků NA0-2 je zde také pozorován nárůst v relativní buněčné viability, a to zejména u nižších koncentrací jako je u ONA0 10 a 5 %, u ONA1 to vypadá dle měření zejména na 25 a 5 %. A u vzorku ONA2 je nárůst buněčné viability pozorován oproti referenci také již při 50 %.

Ze zde dosažených výsledků lze konstatovat, že kombinace oxidovaného a neoxidovaného alginátu má lepší efekt na buněčnou viabilitu. Zároveň je možné konstatovat, že přídavek

PPy v použitých koncentracích nemá negativní efekt na cytotoxicitu materiálů. Pro vylepšení buněčné viability by hydrogely mohli být ještě před samotným užitím promývány. Takto připravené hydrogely můžou být dále zkoumány pro jejich aplikace jako je krytí ran.

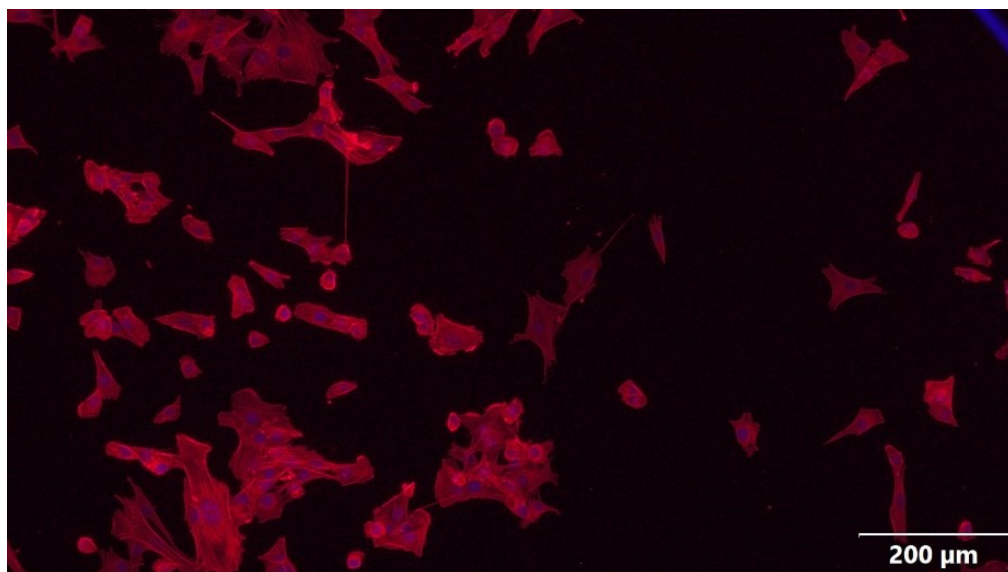
### 10.2.2 Buněčná cytotoxicita v přímém kontaktu, adheze a proliferace

Jak bylo řečeno dříve, cytotoxicita se může hodnotit i v přímém kontaktu s materiálem. V tomto případě bylo zvoleno kvalitativní hodnocení cytotoxicity za použití fluorescenčního barviva. Výsledky z testu cytotoxicity v přímém kontaktu jsou znázorněny na obrázcích 14–20.

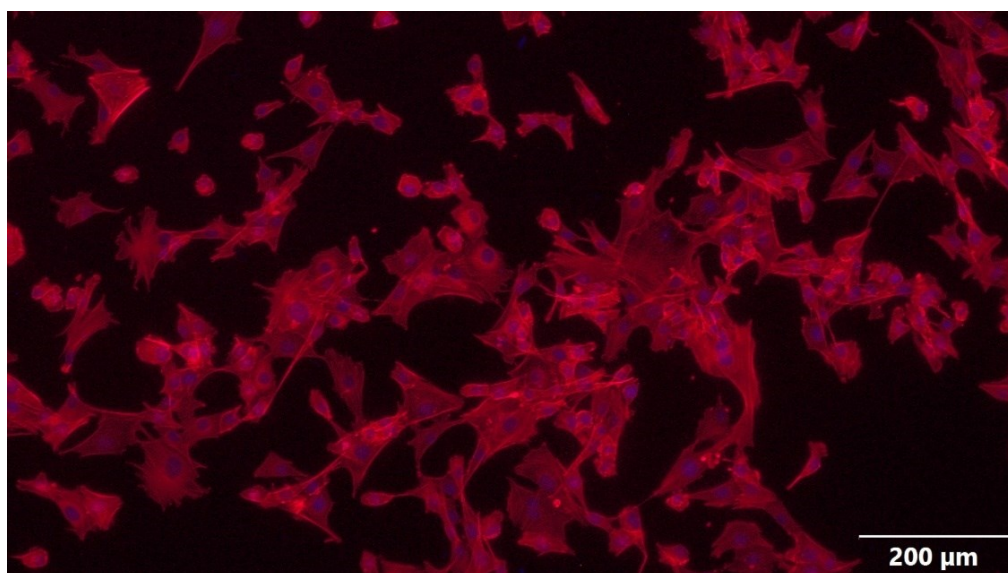


Obrázek 14 Referenční vzorek bez přítomnosti vzorků

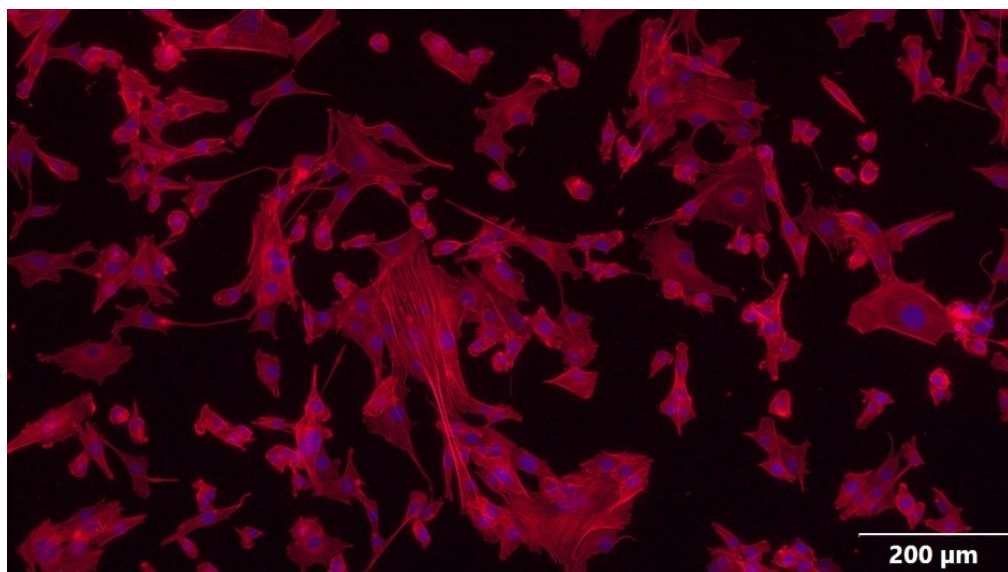
Na obrázku 14 lze sledovat referenční vzorek, tzn. buňky nasazený na kultivační plastik bez přítomnosti hydrogelů. Jak lze poznat u nabarveného referenčního vzorku na obrázku 14, vyskytují se zde modře obarvená jádra a červeně zbarvené cytoskelety buněk.



Obrázek 15 NA0

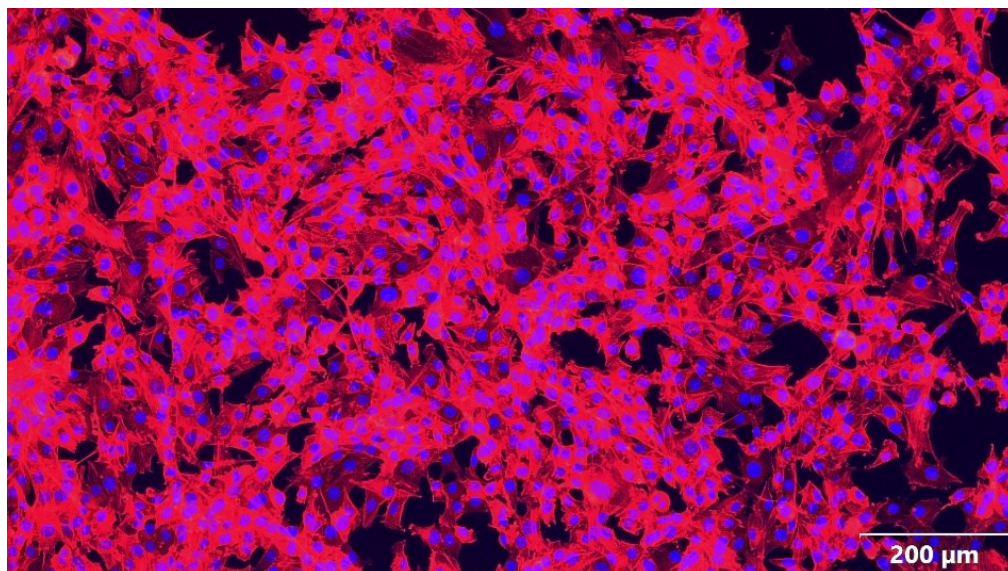


Obrázek 16 NA1

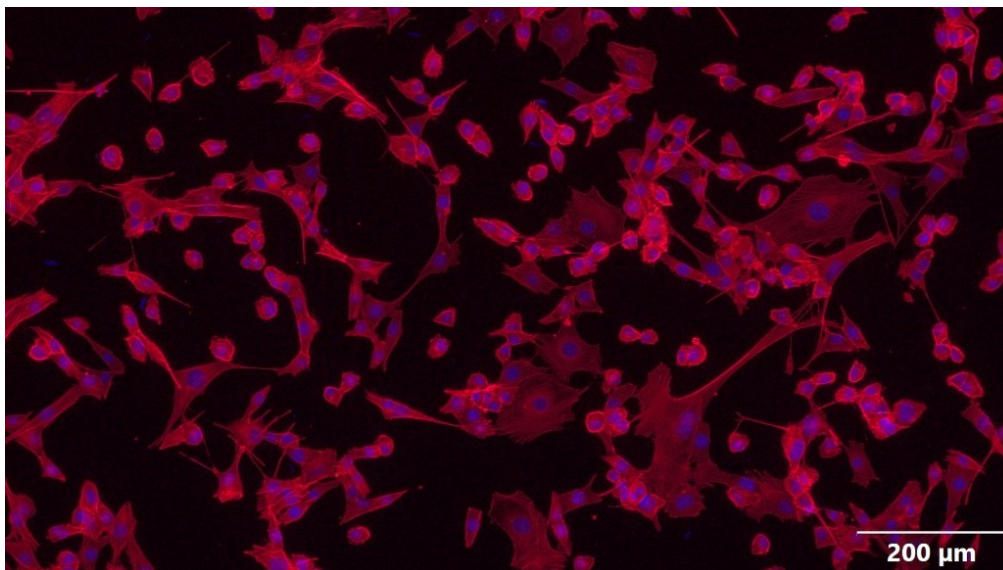


Obrázek 17 NA2

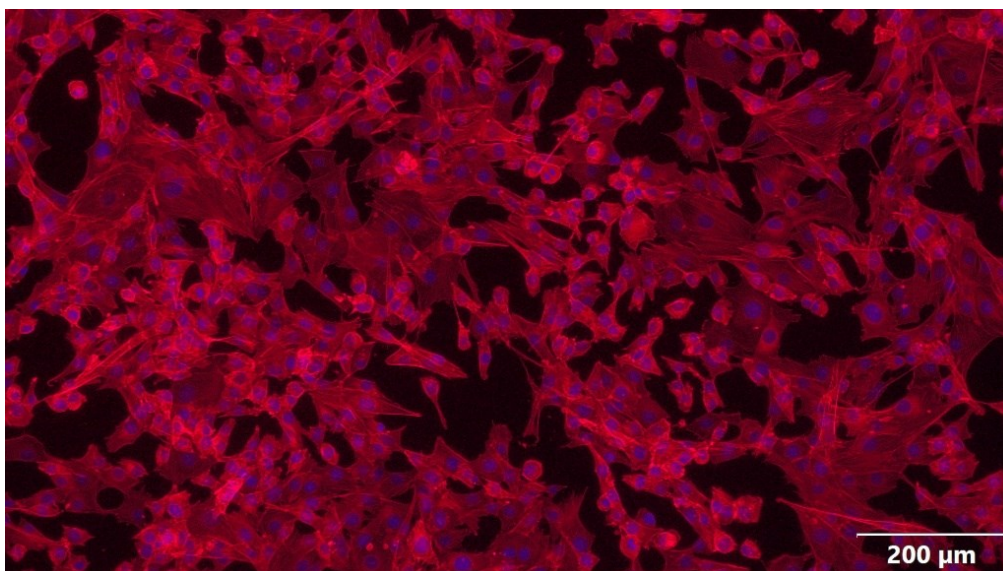
Na obrázku 15–17 jsou vzorky NA0-2. Na obrázku 15 buňky tvoří klastry a také nemají svůj typický protáhlý tvar a je jich o něco méně. Oproti tomu obrázek 16 a 17 se vzorky s přísadkou polypyrrolu NA1 a NA2 lze pozorovat vyšší množství buněk s homogennějším rozptřením. Také morfologicky buňky mají své typické tvary. Nicméně, některé buňky jsou viditelné poškozeny.



Obrázek 18 ONA0



Obrázek 19 ONA1



Obrázek 20 ONA2

Na obrázku 18 lze pozorovat mnoho buněk u vzorku ONA0. Je vidět, že buňkám prostředí vyhovovalo i s gelem bez přídavku polypyrrolu a mnohem lépe oproti vzorku NA0 a referenci. U obrázku 19 s ONA1 jsou také krásně znatelná buněčná jádra i cytoskelety, nicméně není jich tolik, jako tomu bylo u ONA0. A také je zde znát několik buněk s poškozenou morfologií. Na obrázku 20 je potom vzorek ONA2, který je opět krásně pokrytý buňkami s běžnou morfologií.

Nutno ale konstatovat, že při manipulaci s jemnými hydrogely došlo u některých vzorků k částečnému mechanickému odstranění buněk a zhoršení jejich morfologie. Obecně lze ale zhodnotit, že buňky byly schopny růstu při všech vzorkách, nedocházelo k zakulacení buněk ani k příliš velkým změnám v morfologii. Závěrem je možné usoudit, že testy cytotoxicity

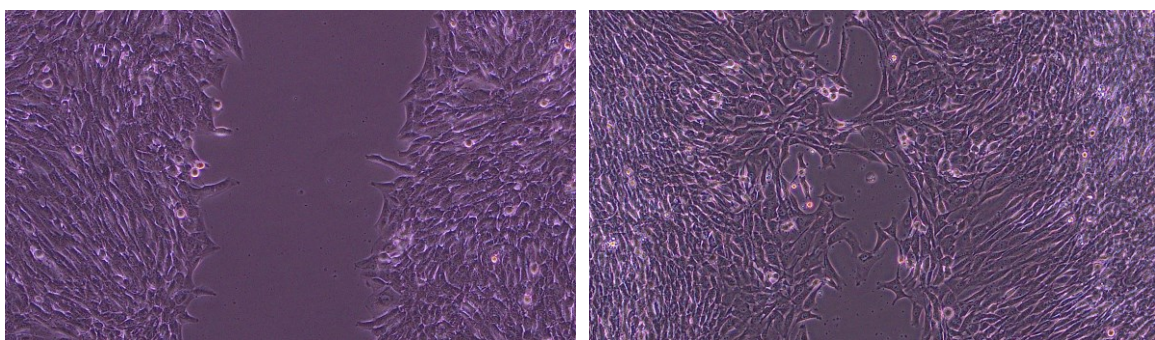
v přímém kontaktu potvrdili výsledek testů z cytotoxicity extraktů, a to že kombinace oxidovaného a neoxidovaného alginátu má lepší efekt na buněčnou viabilitu.

Stanovení buněčné adheze a proliferace se dělalo na povrchu hydrogelů. Hydrogely byly pozorovány pod mikroskopem a na hydrogelech nebyly žádné porostlé buňky. Proto nebyly pořízeny fotografie. To je ale přínosné pro jejich budoucí aplikace jako jsou např. odstranitelné náplasti na hojení ran, kde by prorůstání buňkami nebylo žádoucí.

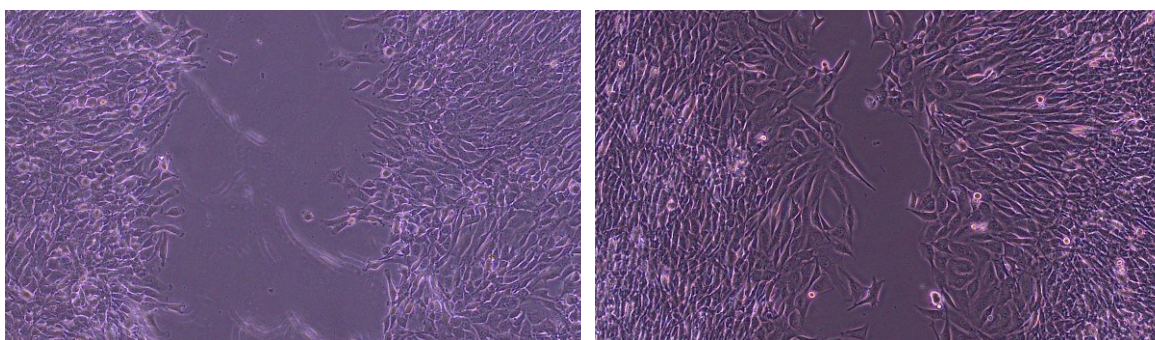
### 10.2.3 Scratch test

Scratch test nazývaný také jako test hojení rán, je metoda používaná na studium migrace buněk a interakcí mezi nimi. Princip spočívá v narušení buněčné monovrstvy, kdy se tímto narušením mimikuje rána. Jedná se o poměrně jednoduchý a rychlý test využívaný při výzkumu hojení ran.

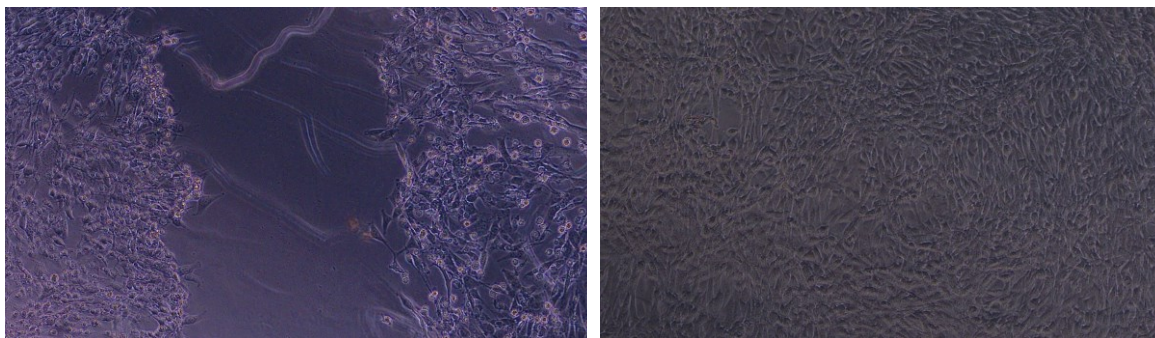
Po vytvoření rány na buněčné monovrstvě a jejich expozici hydrogelům, byla rána pravidelně mikroskopicky sledovaná. Zde jsou mikrofotografie pořízené pro všechny vzorky po 4 a 24 hodinách.



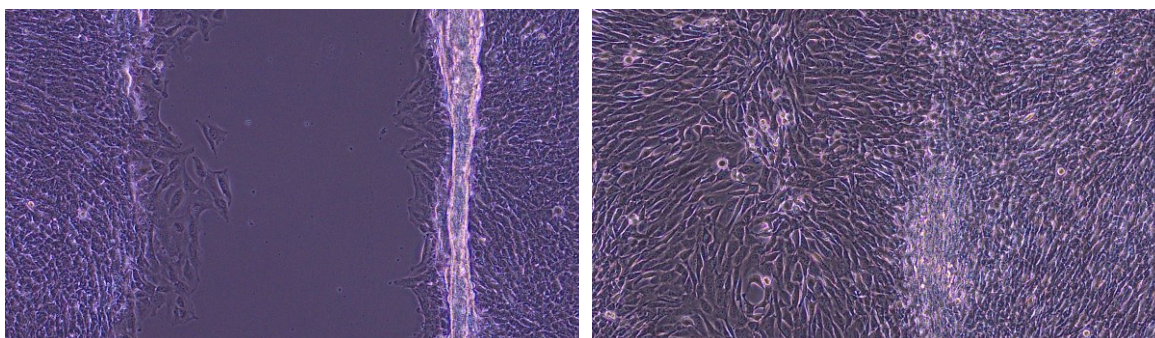
Obrázek 21 Reference bez přítomnosti vzorku po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo)



Obrázek 22 Scratch assay v přítomnosti NAO po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo)

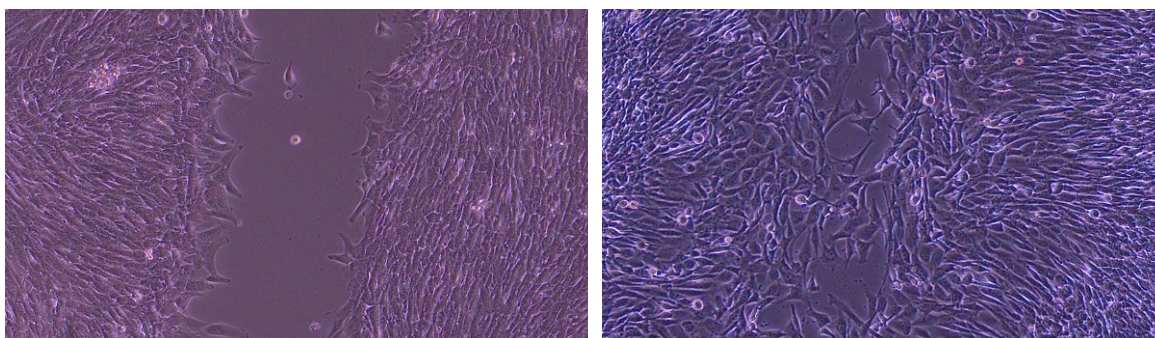


Obrázek 23 Scratch assay v přítomnosti NA1 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo)



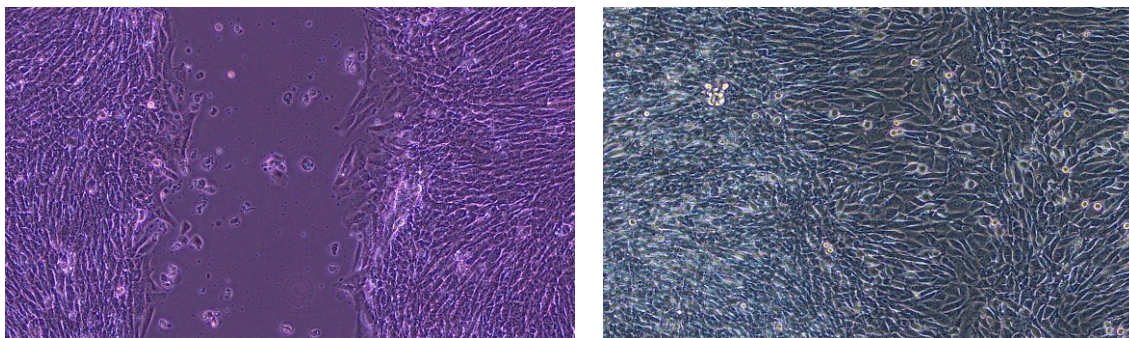
Obrázek 24 Scratch assay v přítomnosti NA2 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo)

Na obrázku 21 lze pozorovat, že se imitovaná „rána“ u referenčního vzorku po 24 hodinách nezacelila úplně. Po 4 hodinách zde prakticky není pozorována žádná změna v migraci buněk. Naproti tomu u obrázku 22 již po 4 hodinách v přítomnosti NA0 buňky začaly migrovat lehce z kraje. Po 24 hodinách nebyl povrch „rány“ opět zcela zacelen. Nicméně u obrázků 23 a 24, tedy vzorků NA1 a NA2 s přísadkou PPy, lze pozorovat, že rovněž stejně jako u NA0 začaly již po 4 hodinách buňky migrovat, a to nejlépe u nejvyššího přísadku polypyrrolu, tedy NA2. Po 24 hodinách byly „rány“ u obou vzorků zcela zacelené.

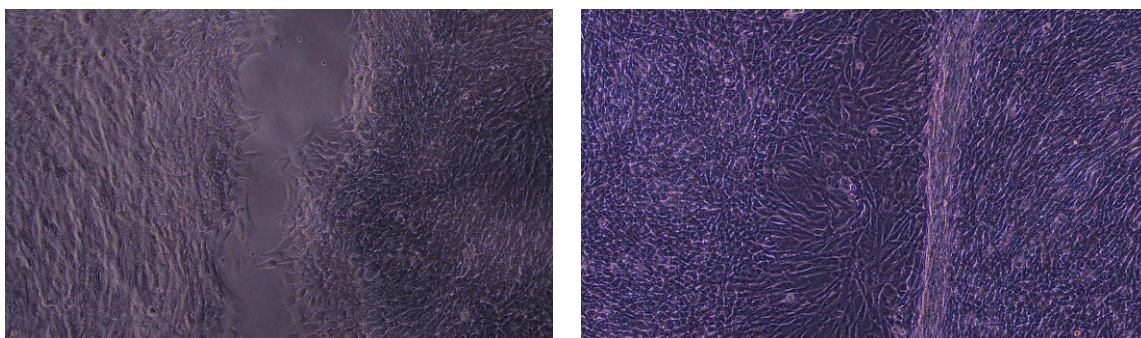


Obrázek 25 Scratch assay v přítomnosti 0NA0 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo)





Obrázek 26 Scratch assay v přítomnosti ONA1 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo)



Obrázek 27 Scratch assay v přítomnosti ONA2 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo)

Na obrázku 25 je vzorek ONA0, kde již po 4 hodinách lze pozorovat okrajová migrace do „rány“. U vzorku ONA1 lze pozorovat pouze zbylé buňky po prvotním seškrábnutí a migrace zde příliš viditelná není. U vzorku ONA2 (obrázek 27) byla „rána“ podstatně více zamigrovaná buňkami oproti jakémukoliv jinému vzorku. Po 24 hodinách u vzorku ONA0 byla pozorována podobná migrace jako u vzorku NA0 nebo reference, nešlo však o úplně zacelení. Naproti tomu u vzorků ONA1 a ONA2 došlo k celému zacelení „rány“ a navíc to vypadá, že PPy zde přispěl i k buněčné proliferaci.

Lze teda konstatovat, že inkorporace PPy do matrice měla předpokládaný efekt a značně podpořila hojení ran. Celkově jako nejefektivnější vzorek, zde vyšel vzorek ONA2, kde docházelo k viditelnému zacelování rány již po 4 hodinách.

## ZÁVĚR

Hojení ran je přirozenou fyziologickou reakcí na poškození tkáně. Hojení ran však není jednoduchý jev, ale zahrnuje komplexní souhru mezi četnými typy buněk, cytokiny, mediátory a vaskulárním systémem. Kožní rána, hlavně když není pořádně léčená, může představovat vážná zdravotní rizika. Cílem léčby ran je vytvoření materiálů, které umožní co nejrychlejší zahojení rány, s důrazem na obnovení formy i funkce poraněné oblasti. Proto v této diplomové práci byly zkoumány alginátové hydrogely určené právě na krytí ran. Pro přípravu hydrogelů byl použit alginát v oxidované i neoxidované formě.

Jednou z důležitých vlastností materiálu určeného na krytí ran je jeho mechanická ochrana a přizpůsobení se ráně. Proto jsou podstatné jeho viskoelastické vlastnosti. Alginátové hydrogely byly tedy charakterizovány pomocí reologie. Na reometru bylo vyhodnoceno, že všechny připravené vzorky NA0-2 a ONA0-2 vykazovaly elastické chování.

Mimo jiné je ale při této aplikaci důležitá i podpora hojení, či snížení zánětlivé reakce, proto byl do alginátových hydrogelů zainkorporován polypyrol jako bioaktivní složka a sledován rozdíl mezi vzorky bez přídavku polypyrrolu (NA0 a ONA0) a s přídavkem (vzorky NA1, NA2, ONA1 a ONA2). Jeho přítomnost byla potvrzena pomocí UV-Vis spektrofotometrie.

V neposlední řadě je pro každý materiál, který přichází do kontaktu s lidským tělem, či už přímým nebo nepřímým, stanovení jeho biologické odpovědi. Z toho důvodu byly otestovány základní biologické vlastnosti připravených hydrogelů jako je cytotoxicita, buněčná adheze a schopnost migrace do imitované rány pomocí scratch assay.

Při testování cytotoxicity bylo vyhodnoceno, že testované vzorky nebyly cytotoxické zejména při nižších koncentracích jako 25,10 a 5 %. Vzorky s přídavkem oxidované formy alginátu vykazovaly menší cytotoxicitu při vyšších koncentracích extraktů než vzorky připravené pouze z neoxidované formy alginátu. Nejlépe vycházel vzorek s oxidovaným alginátem a nejvyšším přídavkem polypyrrolu, který nebyl cytotoxický ani při koncentraci 75 %. Při testování buněčné adheze bylo ověřeno, že na žádném ze vzorků nerostly buňky, což potvrzuje, že se materiál hodí pro aplikace na krytí ran. A to z důvodu, aby nedocházelo k problematické výměně krytí. Zároveň však v okolí hydrogelů nedošlo k inhibici buněčné aktivity ani k umrtvení buněk. Při *in vitro* scratch assay, jakožto imitaci rány, byly vytvořené „scratches“ zcela zoceleny po 24 hodinách u všech vzorků s přídavkem polypyrrolu. Zejména

u vzorků s oxidovaným alginátem bylo zacelení nejvýznamnější a jejich přítomnost napomohla také buněčné proliferaci.

Lze tedy zkonstatovat, že při přípravě alginátových hydrogelů se jeví jako vhodnější kombinace oxidované s neoxidovanou formou před využitím čistého alginátu v neoxidované podobě. Obecně ke zlepšení biologických vlastností také pomohla přítomnost polypyrrolu. Závěrem je možné tedy říct, že připravené hydrogely mají potenciál na uplatnění v oblasti hojení ran.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] LOPEZ-OJEDA, Wilfredo; PANDEY, Amarendra, ALHAJJ, Mandy a OAKLEY Amanda. Anatomy, Skin (Integument). Online. StatPearls. 2023. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441980/> [cit. 2023-11-05].
- [2] CONTRIBUTORS, WebMD Editorial. How Does the Skin Work? Online. WebMD. Dostupné z: <https://www.webmd.com/beauty/cosmetic-procedures-overview-skin> [cit. 2023-11-05].
- [3] HOLICK, Michael; SMITH Ellen a PINCUS Stephanie. Skin as the site of vitamin D synthesis and target tissue for 1,25-dihydroxyvitamin D3. Use of calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for treatment of psoriasis. Online. Archives of Dermatology. 1987, vol. 123, no. 12, s. 1677–1683 a. ISSN 0003987X. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2825606/> [cit. 2023-11-05].
- [4] Different Types of Wounds. Online. Dostupné z: <http://www.woundcarecenters.org/article/wound-basics/different-types-of-wounds> [cit. 2023-09-11].
- [5] CICHOREK, Mirosława; WACHULSKA, Małgorzata; STASIEWICZ Aneta a TYMIŃSKA Agata. Skin melanocytes: biology and development. Online. Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii. 2013, vol. 30, no.1, s. 30–41. ISSN 1642395X. Dostupné z: [doi:10.5114/pdia.2013.33376](https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376) [cit. 2023-11-05].
- [6] ABRAHAM, Jacob a MATHEW, Sherin. Merkel Cells: A Collective Review of Current Concepts. Online. International Journal of Applied and Basic Medical Research. 2019, vol.9, no.1, s.9–13. ISSN 2229516X. Dostupné z: [doi:10.4103/ijabmr.IJABMR\\_34\\_18](https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_34_18) [cit. 2023-11-05].
- [7] CLAYTON, Kalum; VALLEJO, Andres F.; DAVIES, James; SIRVENT, Sofia a POLAK, Marta E. Langerhans Cells—Programmed by the Epidermis. Online. Frontiers in Immunology. 2017, no.8, s. 1676. ISSN 1664-3224. Dostupné z: [doi:10.3389/fimmu.2017.01676](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01676) [cit. 2023-11-05].
- [8] YOUSEF, Hani; MIAO, Julia H., ALHAJJ, Mandy a BADRI, Talel. Histology, Skin Appendages. Online. StatPearls. 2023 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482237/> [cit. 2023-11-05].

- [9] PIIPPONEN, Minna; LI, Dongqing a LANDÉN, Ning Xu. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, vol. 21, no.22, s.8790. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21228790 [cit. 2023-11-05].
- [10] KUDLOVÁ, Pavla. Hojení ran. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2021. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/50089>. [cit. 2023-11-05].
- [11] STOJADINOVIC, Alexander; CARLSON, Jay W., SCHULTZ, Gregory S.; DAVIS, Thomas A. a ELSTER, Eric A. Topical advances in wound care. Online. *Gynecologic Oncology*. 2008, vol. 111, no.2, s.70-80. ISSN 1095-6859. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2008.07.042 [cit. 2023-11-05].
- [12] KIRSNER, Robert a EAGLSTEIN, William. The wound healing process. Online. *Dermatologic Clinics*. 1993. s. 629-640. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(18\)30216-X](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(18)30216-X) [cit. 2023-11-05].
- [13] FOUNTAIN, John H. a LAPPIN, Sarah L. Physiology, Platelet. Online. StatPearls. 2023 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470328/> [cit. 2023-11-19].
- [14] KATTULA, Sravya; BYRNES, James R. a WOLBERG, Alisa S. Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. Online. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2017, vol. 3, no.3, s.13–21. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.117.308564 [cit. 2023-11-19].
- [15] SWYSTUN, Laura L. a LIAW, Patricia C. The role of leukocytes in thrombosis. Online. *Blood*. 2016, vol.128, no. 6, s. 753–762. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2016-05-718114 [cit. 2023-11-19].
- [16] BAHRAM, Morteza; MOHSENI, Naimeh; MOGHTADER, Mehdi; BAHRAM, Morteza; MOHSENI, Naimeh a MOGHTADER, Mehdi. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. Online. *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. 2016 ISBN 978-953-51-2510-5. Dostupné z: doi:10.5772/64301 [cit. 2023-11-19].

- [17] HO, Tzu-Chuan; CHANG, Chin-Chuan; CHAN, Hung-Pin; CHUNG, Tze-Wen; SHU, Chih-Wen; CHUANG, Kuo-Pin; DUH, Tsai-Hui; YANG, Ming-Hui a TYAN, Yu-Chang. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. Online. *Molecules*. 2022, vol. 27, no. 9, s. 2902. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27092902 [cit. 2023-11-19].
- [18] YUMIN, Qin; 7 - Functional wound dressings. Online. *Medical Textile Materials*. 2016; s. 89-107. ISBN 9780081006184. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100618-4.00007-8>. [cit. 2024-04-25].
- [19] REZVANI GHOMI, Erfan; KHALILI, Shahla; KHORASANI, Saied; NOURI, Rasoul a RAMAKRISHNA, Seeram. Wound dressings: Current advances and future directions. Online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2019, vol. 136, no. 27. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.47738 [cit. 2023-11-19].
- [20] ADERIBIGBE, Blessing a BUYANA, Buhle. Alginate in Wound Dressings. Online. *Pharmaceutics*. 2018, vol. 10, no. 2, s. 42. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020042 [cit. 2023-11-19].
- [21] YUAN, Ningning; SHAO, Kan Shan; a CHEN, Cheng. Chitosan, alginate, hyaluronic acid and other novel multifunctional hydrogel dressings for wound healing: A review. Online. *International Journal of Biological Macromolecules* 2023, vol. 240. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.124321 [cit. 2023-11-19].
- [22] FIRLAR, Ilayda; ALTUNBEK, Mine; MCCARTHY, Colleen; RAMALINGAM, Murugan a CAMCI-UNAL, Gulden. Functional Hydrogels for Treatment of Chronic Wounds. Online. *Gels*. 2022, vol. 8, no. 2, s. 127. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels8020127 [cit. 2023-11-19].
- [23] AHMADI, F., Z. OVEISI, S. Mohammadi SAMANI a Z. AMOOZGAR. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2015, vol. 10, no. 1, s.1–16. ISSN 1735-5362. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4578208/> [cit. 2023-11-19].
- [24] Glycosaminoglycan – an overview. Online. *ScienceDirect Topics*. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/glycosaminoglycan> [cit. 2023-11-19].

- [25] FENG, Peipei; LUO, Yang; KE, Chunhai; QIU, Haofeng; WANG, Wei et al. Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications. Online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021, vol. 9 ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.650598> [cit. 2023-11-19].
- [26] YILMAZ ATAY, Hüsnügül. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. Online. *Functional Chitosan*. 2020, s. 457–489. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-15-0263-7\_15 [cit. 2023-11-19]
- [27] Double-Network Chitosan-Based Hydrogels with Improved Mechanical, Conductive, Antimicrobial, and Antibiofouling Properties. Online. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2310-2861/9/4/278> [cit. 2023-11-21].
- [28] BELLICH, Barbara; D'AGOSTINO, Ilenia; SEMERARO, Sabrina; GAMINI Amelia a Attilio CESÀRO. “The Good, the Bad and the Ugly” of Chitosans. Online. *Marine Drugs*. 2016, vol. 14, no. 5, s. 99. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md14050099 [cit. 2023-11-21].
- [29] SARI, Rezmelia; LARASATI, Grace; KUNCOROWATI Nurul G. a SYAIFY Ahmad. Platelet-rich fibrin (PRF) membranes accelerate open wound healing better than amniotic membranes: A histological study on the proliferation phase. Online. *Wound Medicine*. 2020. ISSN 2213-9095. Dostupné z: doi: 10.1016/j.wndm.2020.100190 [cit. 2023-11-21].
- [30] SCHULTZ, Gregory S.; CHIN, Gloria A.; MOLDAWER, Lyle a DIEGELMANN, Robert F. Principles of Wound Healing. Online. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. 2011. ISBN 978-0-9871718-2-5. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534261/> [cit. 2023-11-21].
- [31] Chitosan: Uses and Risks. Online. Dostupné z: <https://www.webmd.com/vitamins-and-supplements/chitosan-uses-and-risks> [cit. 2023-11-21].
- [32] FRENKEL, Joseph S. The role of hyaluronan in wound healing. Online. *International Wound Journal*. 2012, vol. 11, no.2, s. 159–163. ISSN 1742-4801. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742481X.2012.01057.x

- [33] HAUCK, Sophia; ZAGER, Paula; HALFTER, Norbert; WANDEL, Elke; TORREGROSSA, Marta et al. 2021. Collagen/hyaluronan based hydrogels releasing sulfated hyaluronan improve dermal wound healing in diabetic mice via reducing inflammatory macrophage activity. Online. *Bioactive Materials* 2021, vol. 6, no.12, s. 4342–4359. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2021.04.026
- [34] CATANZANO, Ovidio; D'ESPOSITO, Vittoria; ACIERNO, Stefano; AMBROSIO, Maria, Rosaria; DE CARO, Carmen et. al. Alginate–hyaluronan composite hydrogels accelerate wound healing process. Online. *Carbohydrate Polymers* 2015, vol. 131, s.407–414. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.081
- [35] THÖNES, Stephan; ROTHER, Sandra; WIPPOLD, Tom; Joanna BLASZKIEWICZ, Kanagasabai BALAMURUGAN et. al. Hyaluronan/collagen hydrogels containing sulfated hyaluronan improve wound healing by sustained release of heparin-binding EGF-like growth factor. Online. *Acta Biomaterialia* 2019, vol. 86, p.135–147. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2019.01.029
- [36] ABASALIZADEH, Farhad; MOGHADDAM, Sevil Vaghefi; ALIZADEH, Effat; AKBARI, Elahe; KASHANI, Elmira ed al. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3 D bioprinting. Online. *Journal of Biological Engineering*. 2020, vol. 14, no. 1, s. 8. ISSN 1754-1611. Dostupné z: doi:10.1186/s13036-020-0227-7 [cit. 2023-11-21].
- [37] Physico-Chemical Properties of Sodium Alginate. Online. Dostupné z: <https://encyclopedia.pub/entry/29966> [cit. 2023-11-21].
- [38] AGUERO, Lisette; ALPDAGTAS, Saadet; ILHAN, Elif; ZALDIVAR-SILVA, Dionisio a GUNDUZ Oguzhan. Functional role of crosslinking in alginate scaffold for drug delivery and tissue engineering: A review. Online. *European Polymer Journal*. 2021, vol. 160. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110807. [cit. 2023-11-21].
- [39] TAN, Junyan; LUO, Yuning; GUO, Yuqiong; ZHOU, Yue; LIAO, Xinying ed al. Development of alginate-based hydrogels: Crosslinking strategies and biomedical applications. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, vol. 239. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124275 [cit. 2023-11-21].



- [40] SHARMA, Ankita; VERMA, Chetna; SINGH, Pratibha; MUKHOPADHYAY, Samrat; GUPTA, Amlan a GUPTA, Bhuvanesh. Alginate based biomaterials for hemostatic applications: Innovations and developments. Online. International Journal of Biological Macromolecules. 2024, vol. 264. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130771
- [41] SALEEM, Aimon; REHMAN, Roeya; HUSSAIN, Sania; SALEM, Mohamed A.; ALI, Faisal; SHAH, Sayyed Asim Ali; YOUNAS, Umer; EL-BAHY, Salah M.; EL-BAHY, Zeinhom M. a IQBAL, Munawar. Biodegradable and hemocompatible alginate/okra hydrogel films with promising stability and biological attributes. Online. International Journal of Biological Macromolecules 2023, vol. 245. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125532
- [42] HU, Xulin; ZHANG, Zhen; WU, Haoming; YANG, Shuhao; ZHAO, Weiming ed al. Progress in the application of 3 D-printed sodium alginate-based hydrogel scaffolds in bone tissue repair. Online. Biomaterials Advances. 2023, vol. 152. ISSN 2772-9508. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bioadv.2023.213501
- [43] BAHADORAN, Maedeh; SHAMLOO, Amir a Yeganeh Dorri NOKOORANI. Development of a polyvinyl alcohol/sodium alginate hydrogel-based scaffold incorporating bFGF-encapsulated microspheres for accelerated wound healing. Online. Scientific Reports 2023, vol.10, no.1, s. 7342. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-64480-9
- [44] KAPISHON, Vitaliy; WHITNEY, Ralph A.; CHAMPAGNE, Pascale; CUNNINGHAM, Michael F.; a NEUFELD, Ronald J.; Polymerization Induced Self-Assembly of Alginate Based Amphiphilic Graft Copolymers Synthesized by Single Electron Transfer Living Radical Polymerization. Online. Biomacromolecules. 2015, vol. 16, no. 7, s. 2040–2048. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.biomac.5b00470 [cit. 2023-11-21].
- [45] CHALITANGKOON, Jongjit; WONGKITTISIN, Marisa; a MONVISADE, Pathavuth. Silver loaded hydroxyethylacryl chitosan/sodium alginate hydrogel films for controlled drug release wound dressings. Online. International Journal of Biological Macromolecules. 2020, vol. 159, s. 194–203. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.061 [cit. 2023-11-21].

- [46] ALGICELL® Ag Antimicrobial Alginate Dressing. Online. Dostupné z: <https://www.woundsource.com/product/algicell-ag-antimicrobial-alginate-dressing> [cit. 2023-11-21].
- [47] VIVAMEL-ALGINÁTOVÉ KRYTÍ S LÉKAŘSKÝM MEDEM, STERILNÍ 10X10CM, 10 KS V BALENÍ. Online. Dostupné z: <https://www.benu.cz/vivamel-alginatove-kryti-s-lekarskym-medem-sterilni-10x10cm-10-ks-v-baleni-197031-10> [cit. 2023-11-21].
- [48] CAO, Lianqi; LU, Wei; MATA, Analucia; NISHINARI, Katsuyoshi a FANG, Yapeng. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. Online. Carbohydrate Polymers. 2020, vol.242. ISSN 01448617. Dostupné z: doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116389. [cit. 2024-03-30]
- [49] MAHMOUD, M. Ahmed; EL-RASOUL, Saleh Abd; AUDA, Sayed a IBRAHIM, Mohamed. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles. Online. Saudi Pharmaceutical Journal. 2013, v. 21, no. 1, s. 61-69. ISSN 1319-0164. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.08.004>.
- [50] SHU, Jingxiang; MCCLEMENTS, David Julian; LUO, Shunjing; YE, Jiangping a Chengmei LIU. Effect of internal and external gelation on the physical properties, water distribution, and lycopene encapsulation properties of alginate-based emulsion gels. Food Hydrocolloids. 2023, v. 139. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodhyd.2023.108499
- [51] CHAN, Lai Wah; LEE, Huey Ying; HENG, Paul. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. Carbohydrate Polymers. 2006, s.176-187. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:[10.1016/j.carbpol.2005.07.033](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.07.033)
- [52] LIANG, Yeshi a CHO-HONG GOH, James. Polypyrrole-Incorporated Conducting Constructs for Tissue Engineering Applications: A Review. Online. Bioelectricity. 2020. s. 101-119. Dostupné z: doi: 10.1089/bioe.2020.0010. [cit. 2024-03-12]
- [53] KÁČEROVÁ, Simona; VÍCHOVÁ, Zdenka; VALÁŠKOVÁ, Kristýna; VÍCHA, Jan; MÜNSTER, Lukáš ed al. Biocompatibility of colloidal polypyrrole. Online. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2023, vol. 232. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:[10.1016/j.colsurfb.2023.113605](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113605) [cit. 2024-03-12].

- [54] BHARDWAJ, Varun; GUMBER, Divya; ABBOT, Vikrant; DHIMAN, Saurabh a SHARMA, Poonam. Pyrrole: a resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics. Online RSC Advances. 2015, vol. 5, no. 20. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C4RA15710A [cit. 2024-03-12].
- [55] EDWARDS, Alison A. a ALEXANDER, Bruce D., UV-Visible Absorption Spectroscopy. Online. Oxford: Academic Press. 2017. s. 511–519 ISBN 978-0-12-803224-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00013-3. [cit. 2024-04-01].
- [56] Electronic Spectroscopy – Interpretation. Online. Chemistry LibreTexts. 2013 Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy\\_-\\_Interpretation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_-_Interpretation) [cit. 2024-04-01].
- [57] The Basics of UV-Vis Spectrofotometry. A primer. Online. Agilent Trusted Answers. 2021. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/primer-uv-vis-basics-5980-1397en-agilent.pdf>
- [58] Basics of rheology. Online. Anton Paar. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/cz-cs/zaklady-reologie/> [cit. 2024-04-01].
- [59] PAROLINE, Gina. Basics of Applied Rheology. Online. Anton Paar USA. 2016 Dostupné z: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5362553/mod\\_resource/content/1/Rheology\\_tutorial\\_Anton%20Paar.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5362553/mod_resource/content/1/Rheology_tutorial_Anton%20Paar.pdf) [cit. 2024-04-03].
- [60] ABRAHAM, J.; SHARIKA, T.; MISHRA, R. K. a THOMAS, S. Rheological characteristics of nanomaterials and nanocomposites. Online. Polymer Blends. 2017, s. 327–350 ISBN 978-0-08-101991-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-101991-7.00014-5 [cit. 2024-04-03].
- [61] CORY, Giles. Scratch-wound assay. Online. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). 2011, vol. 769, s. 25–30. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-207-6\_2 [cit. 2024-03-12].

- [62] Confluent | Glossary. Cell x Image Lab – Nikon. Online. Dostupné z: <https://www.healthcare.nikon.com/en/ss/cell-image-lab/glossary/confluent.html> [cit. 2024-04-08].
- [63] PHONRACHOM, Onnicha; CHAROENSUK, Phanawat; KITI, Kitipong; SAICHANA, Natsaran; KAKUMYAN Pattana a Orawan SUWANTONG. Potential use of propolis-loaded quaternized chitosan/pectin hydrogel films as wound dressings: Preparation, characterization, antibacterial evaluation, and in vitro healing assay. Online International Journal of Biological Macromolecules 2023, vol.241. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124633
- [64] KHALILI, Amelia Ahmad a AHMAD, Mohd Ridzuan. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. Online International Journal of Molecular Sciences. 2015, vol. 16, no. 8. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms160818149 [cit. 2024-03-12].
- [65] SHINDE, Ashwini; ILLATH, Kavitha; GUPTA, Pallavi; SHINDE, Pallavi; LIM, Ki-Taek; ed al. A Review of Single-Cell Adhesion Force Kinetics and Applications. Online. Cells. 2021, vol. 10, no. 3, s. 577. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10030577 [cit. 2024-03-12].
- [66] Cytotoxicity Assays – CZ. Online. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/cytotoxicity.html> [cit. 2024-04-08].
- [67] ČR, ÚZIS, [b.r.]. nekróza | NZIP. NZIP.cz Online. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/3492>. [cit. 2024-04-08].
- [68] ČR, ÚZIS, [b.r.]. apoptóza | NZIP. NZIP.cz. Online. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/2617>. [cit. 2024-04-08].
- [69] HUGHES, Timothy a RUSTEN, Tor Erik. Origin and Evolution of Self-Consumption: Autophagy. Online. Landes Bioscience. 2013. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6274/>. [cit. 2024-04-08].

- [70] GRUBER, Sarah a NICKEL, Angela. Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device. Online. *Frontiers in Medical Technology*. 2023, vol.5. ISSN 2673-3129. Dostupné z: doi:10.3389/fmedt.2023.1195529
- [71] CHOUGULE, Manik A.; PAWAR, Shailesh G.; GODSE, Prasad R.; MULIK, Ramesh N.; SEN, Shashwati et al. Synthesis and Characterization of Polypyrrole (PPy) Thin Films. Online. *Soft Nanoscience Letters*. 2011, vol. 1, s.6-10. Dostupné z: doi:10.4236/sn.l.2011.11002 [cit. 2024-04-25].
- [72] ČSN EN ISO 10 993-6:2016. Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 12: Příprava vzorků a referenční materiály. 2017. Dostupné z: <https://www.technicke-normy-csn.cz/csn-en-iso-10993-6-855220-232670.html>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

--CONH <sub>2</sub> /-CONH	acetamidová skupina
--COOH	karboxylová skupina
NH <sub>2</sub>	aminová skupina
- SO <sub>3</sub> H	sulfunová skupina
-OH	hydroxidová skupina
2D	dvoudimenzionální
3D	tridimenzionální
ADP	adenosindisfosfát
Aj.	a jiné
Apod.	a podobně
c	koncentrace
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	dihydrát chloridu vápenátého
ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EDTA-Ca	spojení ethylendiamintetraoctové kyseliny s vápníkovým iontem
G blok	kyselina α-L-guluronové
G*	Komplexní modul
G'	Elastický modul
G''	Ztrátový modul
GM blok	spojení kyseliny α-L-guluronové s β-D-kyselinou manuronovou
HA	kyselina hyaluronová/ hyaluronan
HB-EGF / H-bFGF	z ang. Heparin- binding epidermal growth factor – heparin vazebný epidermální růstový faktor
HCl	kyselina chlorovodíková
Hm%	hmotnostní procento/a

M blok	$\beta$ -D-kyselinou manuronovou
MTT	(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
Mw	Molekulová hmotnost
MWCO	Z ang. Molecular weight cut-off – mezní hodnota molekulové hodnoty
NIR	Blízká oblast infračervené oblasti záření
NA0	Vzorek neoxidovaného alginátu s 0 $\mu$ l přídatku PPy
NA1	Vzorek neoxidovaného alginátu s 124 $\mu$ l přídatku PPy
NA2	Vzorek neoxidovaného alginátu s 248 $\mu$ l přídatku PPy
ONA0	Vzorek oxidovaný: neoxidovaný 1:1 alginát s 0 $\mu$ l přídatku PPy
ONA1	Vzorek oxidovaný: neoxidovaný 1:1 alginát s 124 $\mu$ l přídatku PPy
ONA2	Vzorek oxidovaný: neoxidovaný 1:1 alginát s 248 $\mu$ l přídatku PPy
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCL	Polykaprolakton
PPy	Polyvinylpyrolidon
PPy/PVP	Roztok polyvinylpyrolidonu s polyvinyl
PVA	Polyvinylacetát
PVP	Polyvinylpyrolidon
tan( $\delta$ )	Ztrátový faktor
T-buňky	Buňky imunitního systému T-lymfocyty
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TGF- $\beta$ mediátor	Z ang. Transforming growth factor beta – transformující/ měnící růstový faktor beta
UPW	Z ang. Ultra-pure water – ultra čistá voda
UV	Ultrafialové záření

---

UV-Vis	Rozsah spektra v ultrafialové a viditelné oblasti
Z ang.	Z anglického
$\eta^*$	Komplexní viskozita
$\eta'$	Elastická viskozita
$\eta''$	Ztrátová viskozita



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Zjednodušená struktura anatomie kůže .....	13
Obrázek 2 Propojení mezi melanocyty a keratinocyty .....	14
Obrázek 3 Fáze hojení ran .....	19
Obrázek 4 Přehled klasifikace hydrogelů podle různých kritérií jako příprava, náboj, zdroj, síťování, odpovědi na podměty specifického rázu a fyzikálních vlastností [20].....	24
Obrázek 5 Chitosan.....	26
Obrázek 6 Hyaluronan .....	28
Obrázek 7 1,4- $\alpha$ -L-glukuronová kyselina (vlevo) a 1,4- $\beta$ -manurová kyselina (vpravo)...	29
Obrázek 8 G-blok (spojení dvou guluronových kyselin).....	30
Obrázek 9 M-blok (spojení dvou manurových kyselin) .....	30
Obrázek 10 GM-blok (spojení guluronové kyseliny – vpravo a manurové kyseliny-vlevo) .	30
Obrázek 11 Příklady metod fyzikálního a chemického síťování alginátu .....	33
Obrázek 13 Schéma postupu při testování cytotoxicity.....	40
Obrázek 12 schéma postupu scratch assay .....	42
Obrázek 14 Referenční vzorek bez přítomnosti vzorků .....	59
Obrázek 15 NA0 .....	60
Obrázek 16 NA1 .....	60
Obrázek 17 NA2 .....	61
Obrázek 18 ONA0 .....	61
Obrázek 19 ONA1 .....	62
Obrázek 20 ONA2 .....	62
Obrázek 21 Reference bez přítomnosti vzorku po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo).....	63
Obrázek 22 Scratch assay v přítomnosti NA0 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo).....	63
Obrázek 23 Scratch assay v přítomnosti NA1 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo).....	64
Obrázek 24 Scratch assay v přítomnosti NA2 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo).....	64
Obrázek 25 Scratch assay v přítomnosti ONA0 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo).....	64
Obrázek 26 Scratch assay v přítomnosti ONA1 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo).....	65
Obrázek 27 Scratch assay v přítomnosti ONA2 po 4 hodinách (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo).....	65

**SEZNAM TABULEK**

Graf 1 Závislost absorpance na vlnové délce u vzorků NA0-2 .....	51
Graf 2 Závislost absorpance na vlnové délce u vzorků ONA0-2 .....	52
Graf 3 Závislost elastického modulu na frekvenci u vzorku NA0-2 (vlevo) a vzorků ONA0-2 (vpravo).....	53
Graf 4 Závislost ztrátového modulu na frekvenci u vzorku NA0-2 (vlevo) a vzorků ONA0-2 (vpravo).....	53
Graf 5 Změna ztrátového faktoru v závislosti na frekvenci u vzorku NA0-2 (vlevo) a vzorků ONA0-2 (vpravo).....	54
Graf 6 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku NA0.....	56
Graf 7 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku NA1.....	56
Graf 8 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku NA2.....	57
Graf 9 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku ONA0.....	57
Graf 10 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku ONA1.....	58
Graf 11 Vyhodnocení buněčné viability v závislosti na koncentraci (%) extraktu u vzorku ONA2.....	58

