

Interakce lidských buněk a kolagenových filmů s bioaktivními látkami

Eva Snášelová

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva SNÁŠELOVÁ**
Osobní číslo: **T10719**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Interakce lidských buněk a kolagenových filmů
s bioaktivními látkami**

Zásady pro vypracování:

V rámci teoretické části zpracovat problematiku významu, struktury a využití kolagenu s ohledem na biomedicínské aplikace. Připravit přehled biologicky aktivních látek vhodných pro biomedicínské aplikace. Prakticky se seznámit s prací v laboratoři buněčných kultur. Osvojit si základní praktiky práce s buněčnými kulturami a metodologií testování polymerních látek. V průběhu zpracování praktické části pak připravit kolagenové filmy obsahující bioaktivní látky a následně provést in vitro test interakce s lidskými buňkami.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Molecular Cell Biology (6th edition) ISBN-10: 0716776014

Cell Biology (Third Edition) ISBN: 978-0-12-164730-8

Farmakologie a toxikologie ISBN: 80-247-0836-1

Culture of Animal Cells ISBN: 978-0-471-45329-1

Bioactive Surfaces ISBN: 978-3-642-20154-7

Biological and Biomedical Coatings Handbook ISBN: 978-1-4398-4996-5

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce:

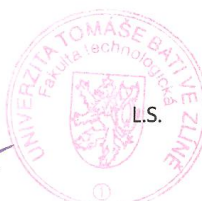
11. února 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou 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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské 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.

Ve Zlíně 27.5.2013

Snášelová Eva

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Hlavním úkolem biomateriálů v medicíně je náhrada poškozené tkáně. Biomateriál musí splňovat celou řadu vlastností – např. být biokompatibilní. Biopolymery, které se běžně vyskytují v živých organismech, tvoří širokou škálu materiálů využitelných k přípravě biomateriálů. Typickým biopolymerem pro biomedicínské aplikace je fibrilární bílkovina kolagen a to především typ I. V oblasti biomedicíny je používán tam, kde je nutná obnova strukturální celistvosti tkáně. Při aplikaci jakéhokoli biomateriálu je výhodné, pokud je nejen biokompatibilní, ale je zároveň schopen zabránit průniku infekce, zejména nozokominální infekci. Cílem této práce je stanovit vliv různých koncentrací antibakteriálních látek imobilizovaných v kolagenových filmech na buněčnou proliferaci.

Klíčová slova: biomateriál, kolagen, nozokominální infekce, antibakteriální látka

ABSTRACT

The major task of biomaterials application in medicine is replacement of damaged tissue. Therefore biomaterials must fulfill a number of properties – eg. be biocompatible. Biopolymers which are commonly found in living organisms are often used in preparation of biomaterials. A typical biopolymer is fibrous protein collagen, especially type I. In the field of biomaterials, the collagen is used when the structural integrity of the tissue must be restored. For the application of any biomaterial it is favorable to also purvey the antibacterial properties. Thanks to that, the reduction of nosocomial infections can be expected. The main aim of this study is to determine the effect of different concentrations of antibacterial substances immobilized on collagen films on cell proliferation.

Keywords: biomaterial, collagen, nosocomial infections, antibacterial compound

Nejdříve bych chtěla touto cestou poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za jeho vedení, připomínky, cenné rady, věnovaný čas i trpělivost. Dále Ing. Zdence Kucekové za její obětavou pomoc především při práci v laboratoři. Velké poděkování patří hlavně mému příteli a mé rodině za jejich velkou podporu, kterou mi prokazovali po celou dobu studia.

Motto:

„Když všichni mluví o nemožnostech, hledej možnosti.“

(Tomáš Baťa 1876 - 1932)

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOMATERIÁLY	12
1.1 VLASTNOSTI BIOMATERIÁLŮ V MEDICÍNĚ	12
1.2 SROVNÁNÍ BIOPOLYMERŮ A SYNTETICKÝCH POLYMERŮ.....	13
1.2.1 Přírodní polymery.....	14
1.2.1.1 Proteiny (bílkoviny)	14
1.2.1.2 Polysacharidy	16
1.2.2 Syntetické polymery	17
1.3 VZNIK BIOPOLYMERŮ	19
1.4 EXTRACELULÁRNÍ MATRIX	21
2 KOLAGEN.....	23
2.1 VLASTNOSTI.....	23
2.2 STRUKTURA.....	24
2.3 ZDROJE.....	26
2.4 KOLAGEN V LÉKAŘSTVÍ.....	26
3 ANTIBAKTERIÁLNÍ LÁTKY	28
3.1 BAKTERIE.....	28
3.2 BARVITELNOST DLE GRAMA.....	28
3.2.1 Staphylococcus aureus	29
3.2.2 Escherichia coli	29
3.3 VLASTNOSTI ANTIBAKTERIÁLNÍCH LÁTEK	30
3.4 POTENCIONÁLNÍ RIZIKA LÉČBY POMOCÍ ANTIBIOTIK.....	31
3.4.1 Rezistence	31
3.4.2 Nozokomiální infekce	32
3.5 BIOFILM.....	32
4 ZÁKLADY KULTIVACE BUNĚČNÝCH KULTUR PRO <i>IN VITRO</i>	
TESTY	34
5 METODY <i>IN VITRO</i> TESTOVÁNÍ BUNĚČNÉ PROLIFERACE	36
5.1 MTT TEST	36
5.2 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	39
6 EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ	40

6.1	KOLAGENOVÉ FILMY	40
6.2	POUŽITÁ BUNĚČNÁ LINIE	41
6.3	PREKULTIVACE.....	42
6.4	MTT TEST	42
6.5	FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	43
6.6	ANTIBAKTERIÁLNÍ TESTY	44
7	VÝSLEDKY.....	46
7.1	TEST CYTOTOXICITY	46
7.2	FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	50
7.3	ANTIBAKTERIÁLNÍ TESTY	51
8	DISKUZE	53
	ZÁVĚR	55
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK.....	65
	SEZNAM GRAFŮ	66

ÚVOD

S rozvojem medicíny úzce souvisí i potřeba vývoje nových biomateriálů pro dokonalejší léčbu. Je snahou navrhovat takové biomateriály, které budou bez jakýchkoli nežádoucích účinků dokonale nahrazovat či léčit poškozenou tkáň lidského organismu. Cílem práce je teoretické seznámení s požadovanými vlastnostmi, které jsou na biomateriál kladeny. Dále je zpracován základní přehled používaných polymerů (přírodních i syntetických) sloužících k výrobě biomateriálů. V medicínských aplikacích nachází velké uplatnění právě kolagen, což je vláknitý biopolymer hojně se vyskytující v tělech živočichů. Je využíván především proto, že jsou známy jeho biologické, chemické, fyzikální i mechanické vlastnosti.

Při návrhu biomateriálů je kladen velký důraz na jeho vlastnosti. Pro jeho správnou funkci je nesmírně důležité dodržení požadovaných vlastností. Praktická část práce se zabývá jedním ze základních parametrů, který je na biomateriál kladen – stanovením cytotoxicity. K testům cytotoxicity slouží MTT test, který vyhodnocuje viabilitu buněk nakultivovaných na zkoumaném biomateriálu. V této části je prezentován i antibakteriální test. Příprava biomateriálu, který by vykazoval antibakteriální účinek, by byla velmi výhodná. Mohlo by se tak potlačit riziko vzniku infekcí při aplikacích biomateriálu pacientovi.

Hlavním cílem práce je stanovit vliv různých koncentrací bioaktivních látek na buněčnou proliferaci, konkrétně na buněčnou linii lidských keratinocytů. Zkoumanými bioaktivními látkami jsou bronopol, benzylchlorid a extrakt z Pažitky pobřežní. Přičemž tyto látky jsou imobilizované v kolagenových filmech.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOMATERIÁLY

Biomateriály jsou všechny materiály, které mohou být použity jako celek, nebo jako součást systému k léčbě, rozšíření nebo náhradě tkáně, orgánu nebo funkční části těla s minimálními nežádoucími účinky nebo odmítnutím ze strany orgánu (Shi, 2004). Na příkladu rozmanitosti používaných materiálů jako jsou kovy, keramika, sklo, polymery a různé kompozity, je možno demonstrovat, že tato definice může zahrnovat širokou škálu materiálů (Klee, Höcker 2000). V současné době se v biomedicínských aplikacích využívá mnoho typů polymerů (Ratner et al. 2004), přičemž významnou součástí jsou biopolymery (Tian et al. 2012). Biopolymery jsou následující látky polymerního charakteru – nukleové kyseliny (deoxyribonukleová kyselina – DNA a ribonukleová kyselina – RNA), bílkoviny a polysacharidy (Murray et al. 2002). Další možnou definicí je, že se jedná o materiál produkováný biologickým systémem (Park, Lakes 2007).

1.1 Vlastnosti biomateriálů v medicíně

Rozvoj lékařských technik stanovuje vyšší požadavky pro biomedicínské materiály (Tian et al. 2012). Biomateriál musí být schopen regulovat strukturu a funkci v tkáni pomocí interakce s transplantovanými nebo hostitelskými buňkami. Ideální biomateriál by měl být biokompatibilní, podporující buněčnou interakci a vývoj tkáně (Kim et al. 2000). Biokompatibilita se zabývá interakcemi, které se konají mezi biomateriálem a tkání těla. To znamená, že materiál by neměl interagovat celkově s tělem, ale pouze na místě v těle, kde se nachází při provádění své funkce, aniž by nějak ovlivnil tkáň (Williams 2003). Biokompatibilní materiál by neměl například vyvolávat žádné změny v okolní tkáni, žádné trombogenní, alergenní, karcinogenní a toxické reakce (Klee, Höcker 2000). Biomateriály by měly poskytnout vhodnou regulaci buněčného chování, jako je přilnavost, proliferace, migrace, diferenciací a podpora rozvoje nové funkční tkáně (Kim et al. 2000). Skutečným cílem výzkumu biomateriálů je vytvořit povrch implantátu, který aktivně interaguje s biologickým systémem a vyvolá přesně stejné reakce jako tělesná tkáň (Klee, Höcker 2000).

Spolu s rozvojem využívání polymerů v medicíně se také zvyšuje podíl materiálů, jež jsou biodegradovatelné neboli biologicky rozložitelné. Biologicky rozložitelné polymery jsou ty, které se rozkládají *in vivo* buď na produkty, které jsou z těla odstraněny jako běžné metabolity, nebo na produkty, které mohou být zcela odstraněny z těla s nebo bez dalších

metabolických transformací (Nair, Laurencin 2006). Při návrhu biologicky rozložitelných materiálů se musí vzít v úvahu mnoho důležitých vlastností. Tyto materiály nesmějí vyvolat trvale zánětlivé reakce, musí mít vhodné mechanické vlastnosti pro jejich zamýšlené použití. Musí se vyrábět netoxické rozkladné produkty, které mohou být snadno vstřebatelné nebo vylučované, a musí zahrnovat odpovídající propustnost a zpracovatelnost pro určené použití (Ulery et al. 2011). Je také nutno zohlednit, že téměř okamžitě po kontaktu materiálu s krví, je materiál potažený bílkovinným sérem v procesu známém jako bílkovinná adsorpce (Puleo, Bizios 2009).

Nevhodné vlastnosti přírodních materiálů vedly k průzkumu syntetických biologicky rozložitelných polymerů pro použití v lékařských aplikacích. Mnoho aplikací biomateriálů vyžaduje materiály, které aktivně pracují s hostitelskou tkání (Bettinger 2011). Hostitelská odpověď k biomateriálu je zásadním stanovením pro úspěch biomedicínských implantátů (Puleo, Bizios 2009). Nicméně implantovaný materiál může mít dopad na lidský organismus a narušit homeostázu těla tím, že ovlivňuje buněčnou fyziologii a funkce organismu (Hunt 2008). Kromě toho, že by tyto materiály neměly vyvolat toxické nebo imunitní odpovědi, měly by být metabolizovány v těle po splnění svých úkolů (Tian et al. 2012). Pochopení interakcí, které probíhají mezi povrchem materiálu a součástí biologického systému je důležitý požadavek vývoje biomateriálů (Klee, Höcker 2000).

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor, který aplikuje principy inženýrství a vědy o živé přírodě k rozvoji biologických náhrad používaných k obnovení, udržení nebo zlepšení tkáňové funkce. Hlavním cílem tkáňového inženýrství je překonat nedostatek dárců a imunitní odpor mezi receptory a dárci (Tian et al. 2012).

1.2 Srovnání biopolymerů a syntetických polymerů

Makromolekuly lze obecně rozdělit na přírodní polymery a syntetické polymery, přičemž každá třída má vlastní specifické rysy (van Hest 2007). Přírodní i syntetické polymery jsou molekuly dlouhých řetězců, které se skládají z velkého počtu malých opakujících se jednotek - monomerů. Polymery samy o sobě obvykle nemají negativní vliv na okolní tkáň, nicméně, nízkomolekulární sloučeniny přidávané do polymerů mohou způsobit různé reakce, např. alergické (Silver, Christiansen 1999).

1.2.1 Přírodní polymery

Široká škála přírodních polymerů týkajících se oblasti biomateriálů zahrnuje: 1) rostlinné materiály - například celulóza či přírodní kaučuky 2) materiály živočišného původu, kde zařazujeme kolagen a 3) jiné přírodní materiály, jako je deoxyribonukleová kyselina (Ratner et al. 2004). Hlavními biopolymery používanými při přípravě materiálů pro biomedicínské aplikace jsou přírodní polymery odvozené od živočišných tkání - kolagen, chitin, chitosan, keratin, hedvábí a elastin (Sionkowska et al. 2009).

1.2.1.1 Proteiny (bílkoviny)

Proteiny jsou polymery složené z polypeptidových řetězců (Snustad, Simmons 2009). Primární struktura polypeptidového řetězce je určena sekvencí aminokyselin (Murray et al. 2002). Řetězce, které obsahují pouze několik aminokyselin, se nazývají oligopeptidy. Delší řetězce, které mají ve své struktuře několik desítek aminokyselin, označujeme jako polypeptidy. Proteiny jsou látky tvořené několika stovkami aminokyselin. Řetězce spojených aminokyselin jsou následně skládány do trojrozměrné struktury jedinečné pro každý protein (Alberts et al. 2002). Molekuly proteinů se podílejí na všech životně důležitých procesech. Lze jednoduše říci, že mají funkci strukturní, metabolickou a informační (Nečas 2000). V těle se vyskytuje celá řada bílkovin s odlišnou strukturou a funkcí. S ohledem na rozsah této práce jsou uvedeny pouze příklady.

Elastin je protein, který dodává tkáním roztažitelnost a smrštitelnost. Proto je přítomen zejména v plicních tkáních a velkých arteriích (Murray et al. 2002) Elastin je jednou z hlavních látek vyskytujících se v extracelulární matrix (Sionkowska et al. 2009). Je převládajícím proteinem ve stěně cév. Bylo zjištěno, že neaktivuje krevní destičky, takže je perspektivním materiálem pro syntetické cévní štěpy (Ulery et al. 2011). Elastin na bázi hydrogelu je vhodnou náhradou chrupavkových tkání (Lee, Henthorn 2012).

Keratin je hlavní strukturní vláknitý protein kožních derivátů - vlasy, vlna, peří, nehty a rohy savců, plazů a ptáků (Vasconcelos et al. 2009). Tenké vrstvy keratinocytů jako samotné buňky nebo buňky kultivované na polyuretanu a hyaluronové esterové membráně byly vyvinuty jako epitelální náhrady (Nair, Laurencin 2006). Lze identifikovat dvě velké skupiny keratinů 1) α keratin, který je typický pro savce a je podmnožinou mnohem větší skupiny vláknitých bílkovin 2) β keratin nacházející se u ptáků a plazů (Whitford 2005).

Fibrin je velký síťovaný biopolymer skládající se z fibronektinu. Podílí se na přirozeném procesu srážení. Je biokompatibilní, biodegradabilní a je schopen zvýšit buněčnou proliferaci (Ulery et al. 2011). Fibrin je funkční materiál pro tkáňové inženýrství. Bylo prokázáno, že stimuluje fibrinogen a tím migraci epidermálních buněk a keratinocytů. Použití fibrinu v tkáňovém inženýrství lze rozdělit do tří hlavních oblastí: 1) použití samostatného fibrinu jako materiálu buněčné matrix 2) jako materiálu buněčné matrix v kombinaci s polymerním „scaffoldem“ – podpurným lešením 3) jako dávkovací systém pro růstové faktory či jiné léčivé látky (Fisher, 2006).

Želatina je produktem tepelné degradace kolagenu, který ztratil mnoho vlastností reálného kolagenu (Ruszczak 2003). Želatina může snadno zesíťovat různými síťovadly a může být formována do podoby hydrogelů, které jsou schopné vstřebávání velkého množství vody (Nair, Laurencin 2006). Proto se ze samostatné želatiny nebo kombinované s lipidy připravují například polštářky pro zástavu krvácení (Mokrejš, Langmaier 2008). Vzhledem k snadné zpracovatelnosti, biologické rozložitelnosti a hydrogelovým vlastnostem chemicky zesíťovaných nebo polyelektrolytových komplexů želatiny, byla rozsáhle studována jako matrice léků (Nair, Laurencin 2006). Především se jedná o výrobu tvrdých želatinových kapslí, měkkých želatinových kapslí, tablet, potahování tablet, přípravu emulzí a (mikro)enkapsulaci. S úspěchem se želatina používá k prevenci vzniku kloubních onemocnění (zejména kolenních a kyčelních kloubů) a osteoporosy. Velmi rozšířené jsou také aplikace želatiny pro přípravu biomateriálů pro injekční aplikace v kostní chirurgii (Mokrejš, Langmaier 2008).

Albumin je bílkovina krevní plazmy o nejvyšší koncentraci. Díky své vysoké krevní kompatibilitě byl rozsáhle studován jako matrice pro intravaskulární systémy podávání léků (Nair, Laurencin 2006). V podstatě je v těle všudypřítomný a téměř všechny tkáně mají enzymy, které ho mohou degradovat, a to dělá albumin slibným polymerem pro biomedicínské aplikace. V současné době je hovězí albumin dodáván na trh jako lepidlo Bio-GLue a byl FDA schválen pro cévní chirurgii (Ulery et al. 2011)

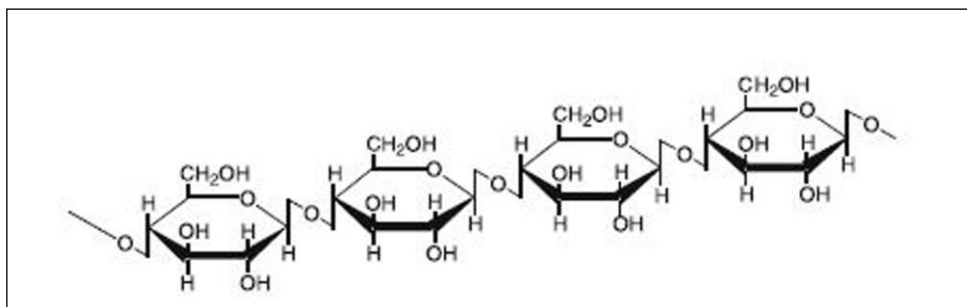
Velmi významným proteinem v oblasti biomateriálů pro lékařské aplikace je kolagen. Vzhledem k tématu mé práce se kolagenu věnuji v samostatné kapitole.

1.2.1.2 Polysacharidy

Polysacharidy jsou výbornými kandidáty pro aplikace v tkáňovém inženýrství právě díky jejich biologické rozložitelnosti, biokompatibilitě, rozpustnosti ve vodě a schopnosti tvořit hydrogely.

Chitin a chitosan jsou typickými polysacharidy mořských živočichů. Chitin a jeho deacetylována forma, chitosan, v poslední době přitahují stále větší pozornost spočívající v pochopení biologických a fyzikálně chemických vlastností (Kurita 2006). Chitosany se v praxi používají převážně ve formě roztoků. Lze je zpracovat do formy vláken a filmů. V medicíně se uplatňují jako hydrogelové nosiče léčiv (Mokrejš, Langmaier 2008). Vykazují antibakteriální vlastnosti a podporují hojení ran (Ulery et al. 2011).

Celulóza tvoří strukturální rámec rostlin a je izolována z mikrofibril. Deriváty celulózy byly rozsáhle studovány pro biomedicínské aplikace jako obvazový materiál v léčbě chirurgických řezů, popálenin, ran a různých kožních onemocnění. Vzhledem k tomu, že deriváty celulózy jsou rozpustné ve vodě a mohou tvořit viskózní želé, našly uplatnění jako masťový základ tzv. "hydrogelové základny" a byly také zkoumány jako matrice pro řízené uvolňování léčiv (Nair, Laurencin 2006). Jeden z etherů celulózy (hydrosypropylmethylcelulosa) je používán jako povlak tablet ve farmacii (Mokrejš, Langmaier 2008).

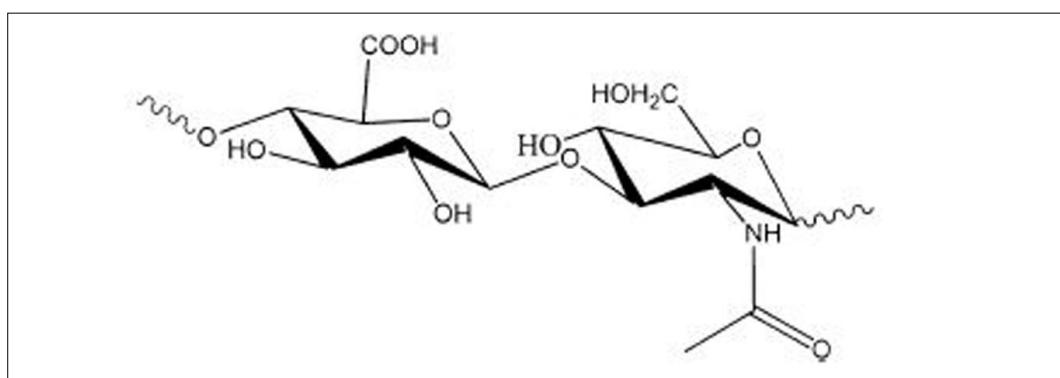


Obrázek 1 – Strukturální vzorec celulózy (Nair, Laurencin 2006)

Škrob je polysacharid tvořený kombinací lineární amylozy z 20-30% a z rozvětvených polymerů – amylopektinů ze 70 – 80% (Nair, Laurencin 2006). Škrob a jeho částečně hydrolyzované produkty (dextriny, maltóza a glukóza) jsou vynikajícím substrátem pro hromadnou výrobu široké škály biotechnologických produktů, jako jsou například organické kyseliny, antibiotika, vitamíny či hormony. Dehydrovaný dimer, laktid, slouží při polymeraci k otevření kruhů, poskytuje tak vysokou molekulovou hmotnost polymeru poly-laktid, který je užitečný v mnoha biomedicínských aplikacích, jako jsou resorbovatelné stehy, pro-

tetická zařízení nebo systémy podávání léků (Tharanathan 2005). Například Contramid je obchodní název systému pomalého uvolňování léčiv založený na bázi škrobu bohatého na amylozu (Nair, Laurencin 2006).

Kyselina hyaluronová byla původně izolována Meyerem a Palmerem v roce 1934. Jde o kyselinu, která se skládá z nerozvětveného řetězce opakujících se disacharidových jednotek z β -glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu (Murray et al. 2002). Kyselina hraje důležitou strukturální roli v kloubní chrupavce a kůži (Ulery et al. 2011). Je nezbytná pro kladení odporu tlakové síly. Důležitá je jako plnivo prostoru v embryonálním vývoji (Alberts et al. 2002). Kyselina hyaluronová má několik vlastností, které z ní činí ideálního kandidáta pro obvazové materiály ran. Může působit jako antioxidant volných radikálů v místě rány a tím modulovat zánět, může pracovat s různými biomolekulami a může být rozpoznána receptory na různých buňkách ve spojení s opravami tkání (Nair, Laurencin 2006). Například sklivec má velké množství této kyseliny, která přispívá k viskoelastickým vlastnostem (Ulery et al. 2011). Proto je kyselina hyaluronová využívána ke zvýšení viskozity očních kapek (Mokrejš, Langmaier 2008). Je známo, že urychluje regeneraci tkání a podporuje mezenchymální a epiteliální buněčné migrace a diferenciaci, čímž se zvyšuje ukládání kolagenu (Nair, Laurencin 2006).



Obrázek 2 – Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové (Nair, Laurencin 2006)

1.2.2 Syntetické polymery

Syntetické polymery jsou univerzální s ohledem na jejich složení a strukturu. Jsou tedy velmi přizpůsobivé a mohou být vhodně nasyntetizovány pro určité aplikace (van Hest

2007). Rostoucí trend ve výzkumu rozložitelných polymerů je ve vývoji kombinovaných polymerů. Jedná se o polymery, ve kterých monomery obsahují více odbouratelných skupin (Ulery et al. 2011). Nové plastické materiály na bázi syntetických polymerů byly navrženy jako makromolekulární struktury. Tyto struktury napodobovaly do jisté míry některé přírodní materiály, přičemž vlastnily značně zlepšené mechanické vlastnosti a trvanlivost (Williams 2003).

Jedním ze způsobů přípravy polymerních materiálů pro biomedicínské aplikace jsou směsi syntetických polymerů s přírodními (Sionkowska 2011). Vytvořením nových materiálů kombinujících výhody jak syntetických materiálů, tak přírodních polymerů se zabývá oblast tkáňového inženýrství (Kim et al. 2000). Směsi syntetických a přírodních polymerů představují novou třídu materiálů s lepšími mechanickými vlastnostmi a biokompatibilitou (Sionkowska et al. 2009).

V současné době se syntetické biopolymery staly atraktivními alternativami pro biomedicínské aplikace z následujících důvodů: 1) i když většina biologicky odvozených rozložitelných polymerů má dobrou biokompatibilitu, některé mohou vyvolat imunitní odpověď, které by bylo možné předejít použitím vhodného syntetického biopolymeru 2) chemické úpravy biologicky získaných, rozložitelných polymerů jsou těžké 3) chemické modifikace mohou způsobit změnu vlastností biologicky odvozených, odbouratelných polymerů (Tian et al. 2012).

Za první pokus použití syntetického materiálu se považuje polymethylmetakrylát (PMMA) (Nair, Laurencin 2006). PMMA je vinylový polymer syntetizovaný radikálovou polymerací z monomeru methylmethakrylátu. Jedná se o biokompatibilní, nerozložitelný a bioinertní polymer. Je jedním z nejtvrdějších polymerů a proto se nejčastěji používá v ortopedických a zubních aplikacích. PMMA má dlouhou historii jako biomateriál a je používán klinicky jako kostní cement pro fixaci kloubních náhrad. Především je PMMA využíván na výrobu kontaktních čoček (Ramakrishna et al. 2010). O používání PMMA v oblasti kontaktních čoček se zasloužil český vědec Otto Wichterle. Wichterle je vynálezcem měkkých kontaktních čoček a byl průkopníkem v oblasti designu, syntézy a aplikace nových polymerů pro zdravotnické účely. V roce 1952 jako první dokázal ve své laboratoři syntetizovat hydrofilní polymer, který byl následně využit v očním lékařství (Sebenda, Hudlický 1999).

Polyethylentereftalát (PET) je termoplastický, neodbouratelný polymer. PET byl poprvé představen v biomedicínských aplikacích v 50. letech 20. století v podobě stehů. I v dnešní době se značně používá v mnoha léčebných postupech např. jako kardiovaskulární implantáty či umělé cévy (Ramakrishna et al. 2010). Dalším běžně používaným syntetickým materiálem je kyselina polyglykolová (PGA). PGA byla jedna z původně sledovaných biologicky odbouratelných polyesterů pro biomedicínské aplikace. PGA byla také zkoumána jako materiál pro vývoj vnitřních zařízení kostní fixace. Nicméně z důvodů vysoké rychlosti polymerní degradace a nízké rozpustnosti ve spojení s akumulací kyselých degradačních produktů, které mohou vést k zánětlivým reakcím, je její aplikace v oblasti biomedicíny omezena (Nair, Laurencin 2006). Kyselina polymléčná (PLA) je jedním z nejčastěji používaných biologicky rozložitelných syntetických polymerů v biomedicínských aplikacích a to zejména při navrhování „scaffoldu“ pro tkáňové inženýrství. Především díky svým funkčním charakteristikám, kdy upřednostňuje růst buněk a tkáně. Mezi nejvíce zkoumanými syntetickými rozložitelnými polymery pro aplikace řízeného uvolňování léčiv je kopolymer PGA a PLA (Ramakrishna et al. 2010). Jako velmi důležitý druh biokompatibilních a biodegradovatelných syntetických polymerů, které byly studovány pro biomedicínské použití v mnoha oblastech, se jeví polyaminokyseliny (Tian et al. 2012).

1.3 Vznik biopolymerů

S ohledem na zaměření mé práce se budu v této kapitole věnovat především vzniku bílkovin, jež jsou velkou skupinou biopolymerů. Mezi bílkoviny řadíme např. kolagen, který je hlavním předmětem této práce. Základem vzniku je sled dějů, které probíhají v průběhu realizace informace zapsané v sekvenci nukleotidů. Tento sled dějů se nazývá genová exprese (Nečas 2000). Základní informace je zapsána v nukleotidové sekvenci označované jako gen. Jedná se o úsek polynukleotidového řetězce vymezený funkcí, kterou nese (Šmarda 2003). Základními mechanismy genové exprese jsou transkripce, posttranskripční úpravy, translace a posttranslační úpravy (Nečas 2000).

Prvním krokem je transkripce nukleotidových sekvencí DNA do sekvencí RNA. Transkripce je iniciována vazbou molekuly RNA polymerázy na specifickou sekvenci DNA označované jako promotor (Nečas 2000). Poté je od startovacího bodu zahájena syntéza RNA a proces pokračuje, dokud enzym nepokročí k ukončovacímu bodu (Murray et al. 2002). Vzniklé vlákno RNA má charakter primárního transkriptu a označuje se jako hete-

rogní nukleární RNA neboli hnRNA. Následnými posttranskripčními úpravami vzniká funkční mediátorová (mRNA), která opouští jádro a vstupuje do ribozomu (Kočárek 2004).

Bezprostřední produkt transkripce se nazývá primární transkript. Aby se takový produkt stal plně funkční, musí být chemicky upravován (Nečas 2000). Úprava je často taková, aby nastalo vyštěpení konkrétních sekvencí a proběhla modifikace konců molekuly. Primární transkript je molekulou, jenž je téměř shodná s molekulou mRNA a proto je často tento transkript označován jako prekurzor mRNA s označením pre-mRNA (Snustad, Simmons 2009). Ze vzniklých molekul se vystřihují nekódující části – introny. Naopak kódující sekvence - exony - se tím pádem spojují dohromady. Procesem alternativního sestřihu navíc může vznikat více mRNA na základě jednoho genu (Nečas 2000).

Dalším krokem je translace. Dochází k překladu sekvencí obsažené v mRNA do sekvence aminokyselin (Murray et al. 2002). V cytoplazmě se mRNA připojuje k organelám zvaným ribozomy, které jsou složeny z ribozomové RNA (rRNA). Připojování se děje na 5'-konci řetězce mRNA. Od tohoto místa dochází k syntéze molekuly proteinu (Kočárek 2004). Dalším nepostradatelným typem molekuly RNA je tzv. transferová RNA (tRNA). Tato molekula tRNA slouží při procesu translace jako adaptér mezi aminokyselinou a kodonem v mRNA (Snustad, Simmons 2009). První tRNA začne čtení informace na mRNA tím, že se antikodonem přiloží na startovací kodon mRNA (Nečas, 2000). Informace v mRNA, která je v ní uložena, je dána pořadím dusíkatých bází. Tato informace je překládána (translace) z mRNA do pořadí aminokyselin vznikajícího bílkovinného polypeptidového řetězce (Šmarda 2003). Nakonec se k ribozomu dostane stop kodon. Translace je ukončena a translační komplex se rozpadne (Nečas 2000).

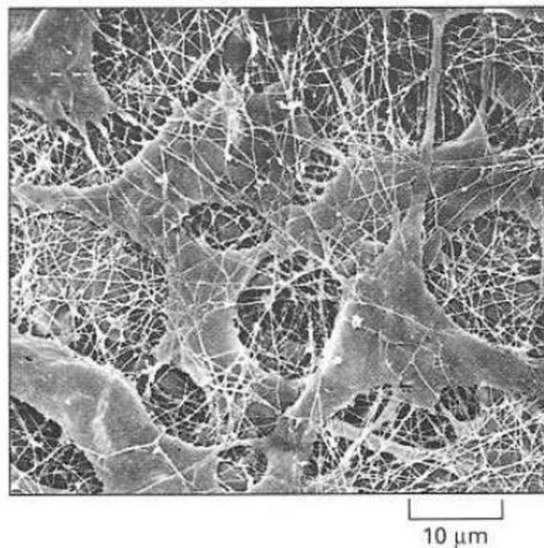
Přímý produkt translace (polypeptidový řetězec) ještě není biologicky funkční. Musí dojít k vytvoření tzv. sekundární, terciární popřípadě kvartérní struktury. Tyto struktury se vytváří spontánně na základě interakcí aminokyselin v řetězci (Nečas 2000). Tyto reakce zahrnují odstranění sekvence na koncích molekuly, doplnění nových skupin (fosforečnany, nebo cukry), modifikaci existujících skupin jako oxidace thiolových skupin (Whitford 2005). Vytvořením správné struktury často pomáhají molekulové chaperony, což jsou látky navazující se k funkčním skupinám polypeptidového řetězce a zabraňující vzniku nežádoucích kombinací nebo uspořádání (Nečas 2000).

1.4 Extracelulární matrix

Většina savčích buněk je ve tkáních obklopena komplexní extracelulární matrix (ECM), často označovanou také jako pojivová tkáň. Pro buňky, které obklopuje, působí především jako podpůrné lešení – „scaffold“ (Murray et al. 2002). Jedná se o trojrozměrnou síť složenou z heterogenních makromolekul (Fisher 2006). Hlavními složkami jsou vláknité bílkoviny kolagen a elastin. Dále řada specializovaných bílkovin, např. fibrilin, fibronektin, laminin (Murray et al. 2002). Další skupinou tvořící ECM jsou proteoglykany. Ty jsou složeny z glykosaminoglykanů, které se připojují k jádru bílkoviny (Murray et al. 2002). Rozlišují se čtyři hlavní skupiny glykosaminoglykanů a to podle sacharidové jednotky, typu spojení mezi sacharidem a bílkovinou, počtu a umístění sulfátové skupiny: 1) kyselina hyaluronová 2) chondroitin sulfát a dermatan sulfát 3) heparan sulfát a 4) keratin sulfát (Alberts et al. 2002).

Složky ECM se váží na bílkoviny označované integriny, které jsou součástí buněčného povrchu (Murray et al. 2002). Představují velkou skupinu homologních transmembránových adhezních receptorů buňka-matrix. Molekula integrinu se skládá ze dvou nekovalentně spojených podjednotek, tzv. α a β . Integriny lidských buněk jsou tvořeny z 24 typů α podjednotek a 9 typů β podjednotek. Rozmanitost je dále zvýšena alternativním sestřihem RNA integrinu (Alberts et al. 2002). Tento mechanismus představuje jednu z drah, kterými může vnější prostředí komunikovat s nitrem buňky (Murray et al. 2002).

Buňky podílející se na tvorbě ECM rozlišujeme podle druhu tkáně, ve které se nacházejí. V pojivových tkáních jsou to fibroblasty a v kostních tkáních jsou to osteoblasty. Přičemž ECM je v pojivové tkáni mnohem hojnější než buňky, které ji obklopují, a určuje tak fyzikální vlastnosti tkání. Dokonce ovlivňuje organizaci buněčného cytoskeletu (Alberts et al. 2004).



Obrázek 3 – Fibroblast v pojivové tkáni

(Alberts et al. 2004)

Velikost, hustota, a orientace kolagenu a dalších ECM vláken se liší u různých tkání a to způsobem souvisejícím s funkcí dané tkáně (Gillette et al. 2011). Všeobecně klíčovou rolí ECM je regulace buněčné reakce v tkáni. Interakce buněk s jejich ECM jsou kriticky zapojeny do zprostředkování vývoje, organizace a oprav mnoha tkání. Je důležitá pro reakce jako jsou migrace buněk během tkáňové formace, dále je zapojena do oprav tkání, růstových reakcí nebo do hojení ran v tkáni (Puleo, Bizios 2009). ECM je tedy komplexem látek a hraje spoustu důležitých rolí v tkáňovém inženýrství (Fisher 2006). Hydrogely jsou atraktivním materiálem, protože jsou strukturně podobné ECM mnoha tkání. A právě proto byly použity jako materiál scaffoldu pro řízené uvolňování léčiv a růstových faktorů a jako materiály náhrad tkáňového inženýrství (Seo et al. 2006).

2 KOLAGEN

Tradičně rozeznáváme čtyři hlavní typy živočišných tkání – pojivě tkáň, epitely, nervové a svalové tkáň. Živočišné pojivě tkáň jsou velmi variabilní. Mohou být: 1) pevné a pružné jako šlacha nebo škára kůže 2) tvrdé a hutné jako kost 3) pružné a tlumící nárazy jako chrupavka 4) měkké a průhledné jako sklivec vyplňující vnitřek oka. U všech těchto tkání je pevnost v tahu založena na fibrilárním proteinu kolagenu (Alberts et al. 2002).

2.1 Vlastnosti

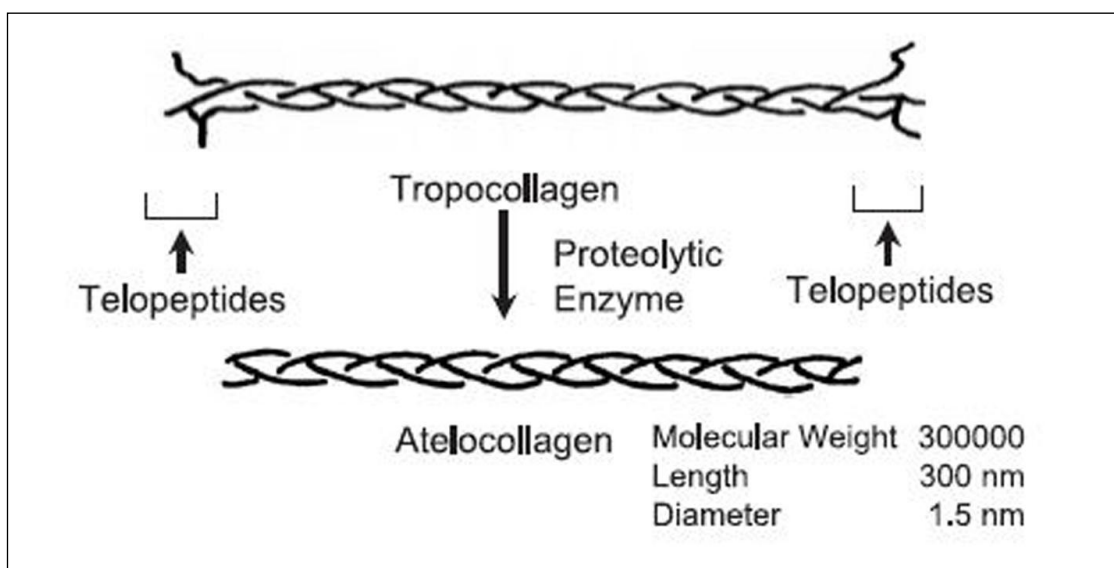
Kolagen se vyskytuje u všech mnohobuněčných živočichů a to v mnoha variantách. Kolageny jsou hlavními proteiny kostí, šlach a kůže a u savců představují 25% z celkového množství proteinů (Alberts et al. 2002). Kolageny jsou vláknité extracelulárně lokalizované strukturální proteiny, které zajišťují pevnost tkáň vůči tahu (Koolman, Röhm 2012). Dopsud bylo identifikováno asi 28 typů kolagenu (Ferreira et al. 2012). Molekulová hmotnost kolagenu je přibližně 300 000. Délka molekuly je 300nm a průměr molekuly je 1,5nm (Sano 2003).

Různé typy kolagenů jsou značeny římskými číslicemi. 90% obsahu všech kolagenů v lidském těle se skládá z typu I, který se vyskytuje především v kůži a kostech. Typ II nacházíme v chrupavce, typ III v retikulárních vlákních, typ IV v bazální membráně. Podle vlastností je lze rozdělit do skupin: 1) síťovité 2) asociované s fibrilami 3) podobné šňůrce perel 4) kotvící 5) transmembránové (Koolman, Röhm 2012).

Kolagen je snadno dostupný, netoxický a je skvělým základem pro biomateriály. Kolagen může být snadno upraven reakcí funkčních skupin, zaváděním příčného spojení nebo štěpením biologické molekuly a tím se tak vytvoří široká škála materiálů, které mají požadované mechanické a biologické vlastnosti. Kolagen má potenciál jako biomateriál v oblasti tkáňového inženýrství kostí v důsledku jeho hojnosti, biokompatibility, vysoké pórovitosti, díky možnostem pro kombinaci s jinými materiály, snadnému zpracování, hydrofilnosti, nízké antigenicitě a absorpčním schopnostem v těle. Kolagen může mít spoustu nevýhod, jako celá řada přírodních polymerů. Někdy může kolagen vykazovat špatné vlastnosti právě v oblasti zpracování s možnou denaturací. V některých případech může nastat i riziko potencionálního přenosu patogenů z živočišného zdroje kolagenu (Ferreira et al. 2012).

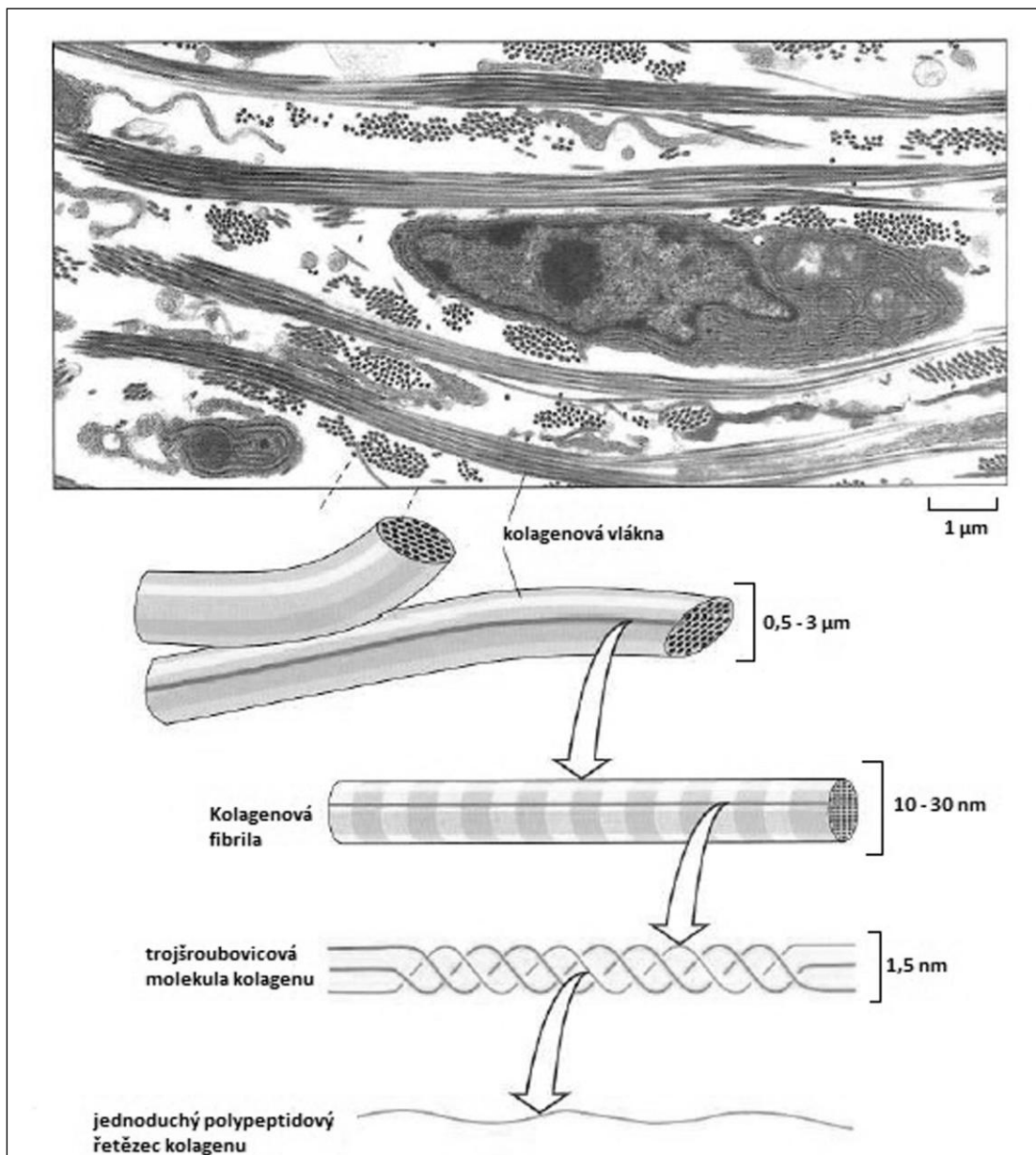
2.2 Struktura

Kolagen má komplexní hierarchickou konformaci, stejně jako jiné proteiny, rozdělenou do čtyř struktur - primární, sekundární, terciární a kvartérní struktura (Ferreira et al. 2012). Hlavními aminokyselinami v kolagenu jsou glycin, prolin, hydroxyprolin a alanin (Sionkowska et al. 2009). Základní stavební jednotka kolagenu, tropokolagen, je složen ze tří polypeptidových řetězců, z nichž každý se skládá asi z 1 000 aminokyselinových zbytků. Každý z polypeptidů tvoří levotočivou šroubovici. Tři levotočivé helikální polypeptidy jsou stočeny dohromady a vytvářejí pravotočivou trojitou šroubovici (superhelix), která je stabilizována vodíkovými vazbami mezi jednotlivými polypeptidovými řetězci (Murray et al. 2002). Každý z těchto tří řetězců má opakující se strukturu „Gly-Xaa-Yaa“. Xaa a Yaa může být jakákoli aminokyselina, ale často je to buď prolin nebo hydroxyprolin. Vlastní molekuly většiny kolagenů se přidružují k vytvoření vyššího řádu struktur jako fibril, sítí nebo supramolekulárních struktur a jsou zodpovědné za mechanické a vazebné vlastnosti, které jsou charakteristické a rozhodující pro funkci těchto biomolekul (Puleo a Bizios, 2009). Na koncích řetězců se nachází nehelikální části N-konec a C-konec. N-konec je zapojen do regulace vláknité struktury. C-konec reguluje formaci trojité šroubovice. Tyto nehelikální konce se nazývají telopeptidy. Pokud kolagen obsahuje telopeptidy je neimunogenní (Ferreira et al. 2012). Kolagen, který je zbaven telopeptidů se označuje jako atelokolagen (Sano 2003).



Obrázek 4 – Schéma molekuly kolagenu (Sano 2003)

Polohy postranních řetězců aminokyselin Xaa a Yaa jsou směrem ven od středu šroubovice a tvoří šroubovité vyvýšeniny a mohou být rozhodující ve sbalení molekuly (Hollinger 2012). Tvorba příčných propojení je nezbytná pro vytvoření makromolekulárního vlákna a následně pro jeho mechanickou stabilitu a jiné fyzikální vlastnosti (Ruszczak 2003). Hydroxyprolin se v jiných proteinech běžně nevyskytuje, zatímco v kolagenu tvoří více než 50% z celkového obsahu aminokyselin. Mnoho dlouhých kolagenových molekul je v extracelulárním prostoru zesíťováno a tvoří neelastická kolagenová vlákna, která mají pevnost v tahu srovnatelnou s ocelí (Alberts et al. 2002).



Obrázek 5 – Organizace a struktura kolagenu (Alberts et al. 2004)

2.3 Zdroje

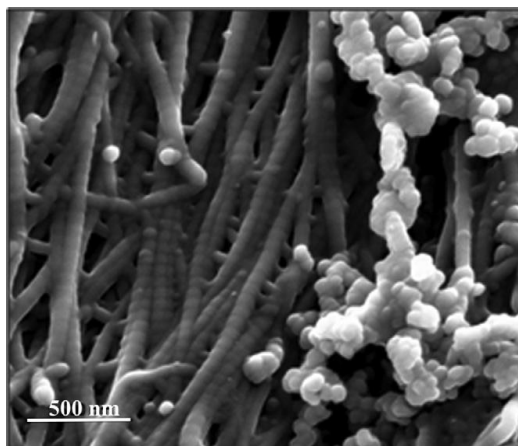
Současnými hlavními zdroji kolagenu jsou zvířecí kůže a Achillovy šlachy a to ze skotu či prasat (Ruszczak 2003). Přírodní polymery, mezi které řadíme právě kolagen, jsou obvykle nerozpustné ve vodě i v organických rozpouštědlech. Výjimkou je právě kolagen, který se extrahuje z tkáně mladých zvířat, která je rozpustná ve zředěné kyselině octové. (Jančář et al. 2009). Je třeba zdůraznit, že vlastnosti kolagenu se liší v závislosti na zdroji zvířat a anatomické lokalizaci surového materiálu. V závislosti na přípravě a čistících technologiích může kolagen typu I odvozený z kůže obsahovat zbytky fibronektinu, elastinu, glykosaminoglykanů, nervové a cévní komponenty a různé další typy kolagenu (např. III, IV, VII) (Ruszczak 2003).

2.4 Kolagen v lékařství

Za posledních deset let byl kolagen mezi nejvíce používaným biomateriálem pro biomedicínské aplikace, díky svým vynikajícím biologickým funkcím a fyzikálně-chemickým vlastnostem (Ferreira et al. 2012). Biomateriály z kolagenu vykazují několik výhodných vlastností: jsou biokompatibilní, netoxické a mají dobře zdokumentovány strukturální, fyzikální, chemické, biologické a imunologické vlastnosti (Ruszczak 2003). Aplikace výrobků z kolagenu v medicíně, ale i farmacii a kosmetice je umožněna fyziologickou blízkostí zvířecího kolagenu s kolagenem lidským (Mokrejš, Langmaier 2008).

Kolagen je využitelný především pro aplikace, kde materiál vyžaduje strukturální celistvost (Groeber et al. 2011). Před použitím musí být zbaven všech nekolagenních kontaminujících složek, které jsou obvykle příčinou imunologických reakcí implantátů. Kolagenní preparáty pro medicínské aplikace jsou vyráběny z kolagenu typu I (Mokrejš, Langmaier 2008). Vzhledem k tomu, že kostní ECM je velmi bohatá na kolagen typu I, našel právě tento typ kolagenu důležité uplatnění v kostním tkáňovém inženýrství, kde na bázi kolagenového scaffoldu poskytuje přirozenou biologickou informaci požadovanou pro buněčnou adhezi, proliferaci a orientaci. Pro aplikaci v kostním tkáňovém inženýrství byly zkoumány i porézní kolagenové scaffoldy s keramickými částicemi (Ferreira et al. 2012). Velmi vhodné jsou i kompozity kolagenu a hydroxyapatitu a to právě díky své vynikající biokompatibilitě a úzkému napodobení kostní tkáně (Nair, Laurencin 2006). Na obrázku 6 je zná-

zorněn růst minerálů na kolagenovém vlákně. Tohoto procesu se využívá v oblasti tkáňového inženýrství kostí (Ferreira et al. 2012).



Obrázek 6 – Růst minerálů na vláknech kolagenu (Ferreira et al. 2012)

Přestože existují velké rozdíly v získávání kolagenu z různých přírodních zdrojů, slouží jako vynikající funkční matrix biomateriálům pro tkáňové inženýrství a náhrady orgánů, jako jsou játra, kůže, krevní cévy a tenké střevo (Lee a Henthorn, 2012). Pro medicínské aplikace se používá v různých fyzikálních formách (Mokrejš, Langmaier 2008). Například kolagenní houby byly rozsáhle zkoumány jako obvazy na rány a popáleniny (Nair, Laurencin 2006). Jako nosiče léčiv se využívá roztoková forma kolagenu. Vlákná slouží jako chirurgický šicí materiál či cévní náhrada. Filmy a folie jsou vhodné pro výrobu kontaktních čoček nebo jako náhrada rohovky. Mohou být využity i jako náhrada umělé ledviny (Mokrejš, Langmaier 2008). Díky své schopnosti být síťován různými látkami je kolagen také atraktivní pro použití v oblasti uvolňování léčiv (Groeber et al. 2011).

Chitosan-kolagenové kompozitní hydrogelové materiály mají potenciální využití v regenerativní medicíně. Tyto materiály mohou být použity pro zapouzdření a doručení, nebo jako *in situ* materiálu ve formě gelů pro regeneraci tkání (Ferreira et al. 2012). Hojně využívaná je gelová forma kolagenu a to zejména v tkáňovém inženýrství pro vytvoření scaffoldu pro husté pojivové tkáně, jako jsou šlachy a vaziva. (Fisher 2006). Kolagen v kombinaci s proteoglykany je metabolicky stabilní a byl rozsáhle studován jako umělá kůže, která urychluje hojení ran (Nair, Laurencin 2006). Své uplatnění nachází kolagen i v zubní medicíně. Zde je využíván vláknitý kolagenový zubní obvaz (Ferreira et al. 2012).

3 ANTIBAKTERIÁLNÍ LÁTKY

Cílem používání antibakteriálních látek je zničení původce onemocnění nebo alespoň omezení jeho růstu bez poškození hostitelského organismu. Rozlišujeme dvě velké skupiny látek - antibiotika a chemoterapeutika. Antibiotika jsou produktem metabolismu mikroorganismů. Chemoterapeutika jsou uměle syntetizované antibakteriální látky. V praxi se označení antibiotika používá ne zcela správně pro obě skupiny látek, jak přírodních tak chemicky syntetizovaných (Lüllman et al. 2004).

3.1 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotické buňky. Vyskytují se buď jako jednotlivě izolované buňky nebo ve shlucích a společenstvech. Obsahují DNA v jednom kruhovém chromozomu, který je volný v cytoplazmě a nemá membránu. Jsou však vybaveny všemi nezbytnými součástmi biochemického aparátu (Nečas 2000).

Cytoplazma buňky je obklopena cytoplazmatickou membránou. Membránu obklopuje buněčná stěna. Na povrchu stěny se může vyskytovat bakteriální pouzdro nebo vrstva slizu. Z povrchu mohou vystupovat bičíky, případně výběžky zvané pili neboli fimbrie. V cytoplazmě nalézáme nukleoid čili jaderný ekvivalent, ribozomy, inkluzní tělíska, vakuoly nebo granula. Některé bakterie jsou schopny produkovat i spóry (Votava 2005). Plazmidy jsou další organelou v cytoplazmě buňky a pro životně důležité funkce nejsou zcela nezbytné. Ovšem za určitých podmínek mohou být tyto organely velmi výhodné (Nečas 2000). Plazmid je organela složená z kruhové DNA, která je syntetizována nezávisle na chromozomu. Na plazmidech jsou například umístěny geny rezistence k antibiotikům nebo geny určující produkci toxinů (Schindler 2010).

3.2 Barvitelnost dle Grama

Jelikož jsou bakterie příliš malých rozměru, je možno je pozorovat pouze pod mikroskopem po obarvení. Z několika způsobů jejich barvení je nejvýznamnější barvení podle Grama. Dánský lékař Hans Christian Joachim Gram (1853-1938) objevil, že bakterie se dají rozdělit do dvou skupin na základě schopnosti či neschopnosti obarvených buněk po držet si barvivo v přítomnosti alkoholu nebo acetonu (Votava 2005).

Pomocí této metody zbarvení lze bakterie rozdělit na grampozitivní (G+) a gramnegativní (G-) bakterie. Postup barvení dle Grama je následující: preparát bakterií se obarví krystalovou violetí – bakteriální buňky se obarví tmavomodře až modrofialově. Přidá se Lugolův roztok – vzniká komplex barviva s jodem. Následuje působení alkoholu (96% etanol) nebo acetonu. Jako grampozitivní se označují ty bakterie, které si komplex krystalové violeti s jodem podrží a zůstávají tmavěmodré. Gramnegativní bakterie je třeba dobarvit konstantním barvivem, například safraninem, tyto bakterie jsou pak červené. Takovéto rozdělení bakterií souvisí se stavbou buněčné stěny. Stěna gramnegativních bakterií obsahuje více lipidů než stěna grampozitivních bakterií (Votava 2005).

3.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) je grampozitivní bakterie kulovitěho tvaru (Schindler 2010). Přibližně u třetiny populace žije ve vztahu blízkém komensalismu na kůži nebo na sliznicích a nevyvolává žádné potíže. Ovšem při poruše přirozené odolnosti se projeví jako patogen. Začne pronikat do tkání (Votava et al. 2003). Následně může způsobit širokou škálu infekcí – např. plic, kostí, srdce a krevního oběhu. Velmi často je rezistentní vůči antibiotikům (Ducel et al. 2002). Navíc může být jedním ze zdrojů hnisavé infekce operační rány (Votava 2005).

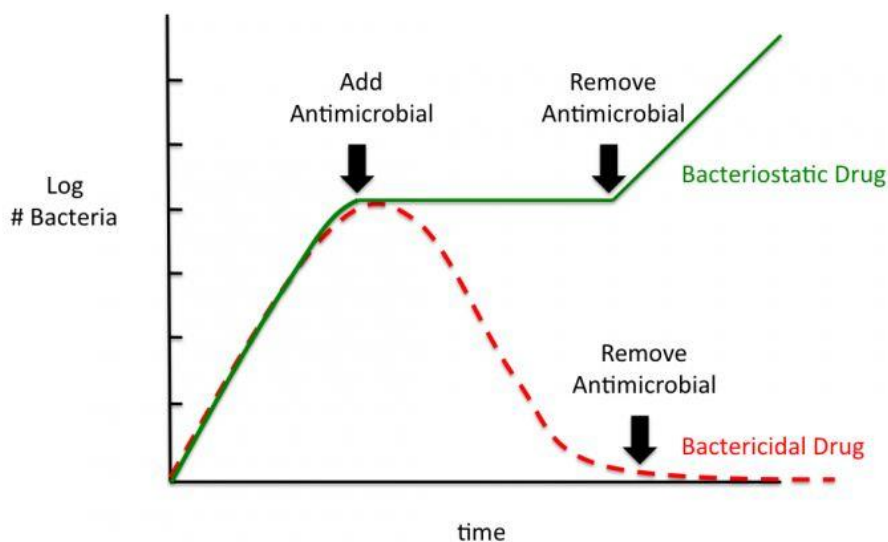
3.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) je gramnegativní fakultativně anaerobní bakterií tyčinkovitěho tvaru. U zdravého člověka je běžnou součástí střevní mikroflóry. Pro organismus je prospěšná tím, že se podílí na tvorbě vitamínů a to především na vitamínu K. Jedná se ale o podmíněně patogenního mikroba. Mimo střevo je *E. coli* téměř vždy patogenní (Votava et al. 2003). *E. coli* je velmi přizpůsobivou bakterií chemickým podmínkám. Lze ji pěstovat na jednoduché směsi živin v kultivační nádobě (Alberts et al. 2002).

E. Coli je v oblasti nozokomiálních infekcí označována za jednoho z původců močové infekce (Votava 2005). Močová infekce patří k nejčastějším nozokomiálním infekcím. Přičemž 80% infekcí je spojováno s použitím permanentního močového katétru (Ducel et al. 2002).

3.3 Vlastnosti antibakteriálních látek

Antibakteriální látky jsou jednou ze skupin antiinfektiv. Vnitřní třídění antibakteriálních látek je především podle chemické struktury, které odpovídá řada společných vlastností, jako je mechanismus působení i rezistence, spektrum nebo nežádoucí účinky (Votava 2005). U antibakteriálních látek se rozeznávají dva typy jejich účinku – bakteriocidní a bakteriostatický (Pankey, Sabath 2004). Látka, která ovlivňuje buněčnou stěnu či membránu má účinek bakteriocidní, naopak bakteriostaticky působí látka inhibující proteosyntézu (Lüllmann et al. 2004). Rozdíl v této antibakteriální aktivitě je zobrazen na obrázku 7. Osa x na grafu znázorňuje dobu působení antibakteriální látky a osa y počet bakterií. Pokud látka postihuje jen na málo bakteriálních druhů, hovoříme o antibiotiku s úzkým spektrem. Naopak, je-li látka účinná na mnoho bakteriálních kmenů, mluvíme o antibiotiku se širokým spektrem (Lüllmann et al. 2007).



Obrázek 7 – Antibakteriální aktivita (Albritton et al. 2008)

Antibakteriální látka může působit na různých místech mikrobiální buňky a to různými způsoby (Votava 2005). Klíčové působení antibakteriální látky je zaměřeno na: 1) inhibici syntézy buněčné stěny 2) funkci buněčné membrány 3) inhibici syntézy kyseliny tetrahydrolistové 4) interferenci s bakteriální DNA 5) inhibici proteosyntézy (Lüllman et al. 2004). Látky, které inhibují buněčnou stěnu, jsou jako léčivo velmi vhodné a to z toho důvodu, že lidská buňka buněčnou stěnu nemá. Příkladem takových antibakteriálních látek mohou být

β -laktamová antibiotika zahrnující například peniciliny či cefalosporiny (Lüllmann et al. 2007). Inhibice kyseliny tetrahydrolistové spočívá v tom, že lidský organismus ji potřebuje pro syntézu purinových bází a tymidinu, které jsou stavebními látkami vstupující do syntézy DNA a RNA. Zatímco lidskému tělu je dodávána ve formě vitamínu jako kyselina listová, bakterie si ji syntetizuje redukcí kyseliny dihydrolistové. Na inhibici syntézy kyseliny dihydrolistové působí tzv. sulfonamidy. Sulfonamidy jsou látkami působícími bakteriostaticky jak na G+ tak G- bakterie. Diaminopyromidiny jsou látky, které v bakteriální buňce inhibují reduktázu kyseliny dihydrolistové (Lüllmann et al. 2004). Princip působení látek, které inhibují funkci DNA, je takový, že inhibují transkripci genetického kódu z DNA. Dochází k poškození regulačního centra buněčného metabolismu (Lüllmann et al. 2007).

Na druhou stranu se mohou bakterie jevit i jako užitečné. Například jsou zde bakteriální polyestery a polyamidy. Jedná se o polymery produkované mikroorganismy v reakci na konkrétní živiny a kulturní podmínky. Jsou to netoxické, biokompatibilní, biodegradabilní materiály a jsou zkoumány pro celou řadu aplikací v lékařských a příbuzných oborech (Nair, Laurencin 2006).

3.4 Potencionální rizika léčby pomocí antibiotik

Bezesporně antibiotika zachránila životy miliónům lidí. Ovšem v dnešní době je problém v genetice bakterií, jak jednotlivých buněk, tak celých bakteriálních populací na Zemi. (Schindler 2008).

3.4.1 Rezistence

V posledních letech došlo k nárůstu počtu léků, které pokryjí léčbu téměř všech infekčních onemocnění. Na druhé straně se také vyvinuly bakteriální kmeny, které jsou vůči takové léčbě rezistentní (Lüllmann a kol. 2004). Rezistence může být vlastností bakterie, která je pro ni přirozená (primární) a tudíž pak nelze konkrétní antibiotikum při konkrétní infekci aplikovat (Schindler 2008). Rizikovější faktor v oblasti medicíny představuje získaná (sekundární) rezistence. Původní bakterie, která byla na antibiotikum citlivá, se stává rezistentní (Lochmann 2008). Navíc selekční tlak intenzivního užívání antibiotik podporuje rezistenci vůči antibiotikům (Ducel et al. 2002).

Rezistence může vznikat adaptací na úrovni fenotypu či genotypu (Lochmann 2008). Necitlivost bakterie vůči účinku léčiva má hned několik způsobů vývoje: 1) enzy-

matická inaktivace léčiva v bezprostřední blízkosti bakterie či dokonce v jejím nitru 2) snížený příjem účinné látky do bakterie nebo zvýšený transport z nitra bakterie 3) znečitlivění místa v bakterii nebo kompenzace metabolického defektu vyvolaného účinnou látkou (Lüllmann et al. 2004).

3.4.2 Nozokomiální infekce

Odolnost proti antimikrobiálním látkám je problémem ve zdravotnických zařízeních a nemocnicích, kde je přenos bakterií zesílený. Onemocnění, jež mají původ ve zdravotnickém zařízení, se označují jako nozokomiální. Nozokomiální infekce jsou často způsobeny právě organismy, které jsou vůči antibiotikům rezistentní. Čtyři nejběžnější nozokomiální infekce jsou infekce močových cest, infekce operační rány, zápal plic a primární infekce krevního řečiště (Ducel et al. 2002). Zdroj infekce může být exogenní či endogenní. Exogenní znamená, že původcem infekce jsou jiní pacienti, návštěvy či personál. Endogenní zdroj naopak označuje za původce infekce vlastní mikroflóru pacienta (Votava 2005).

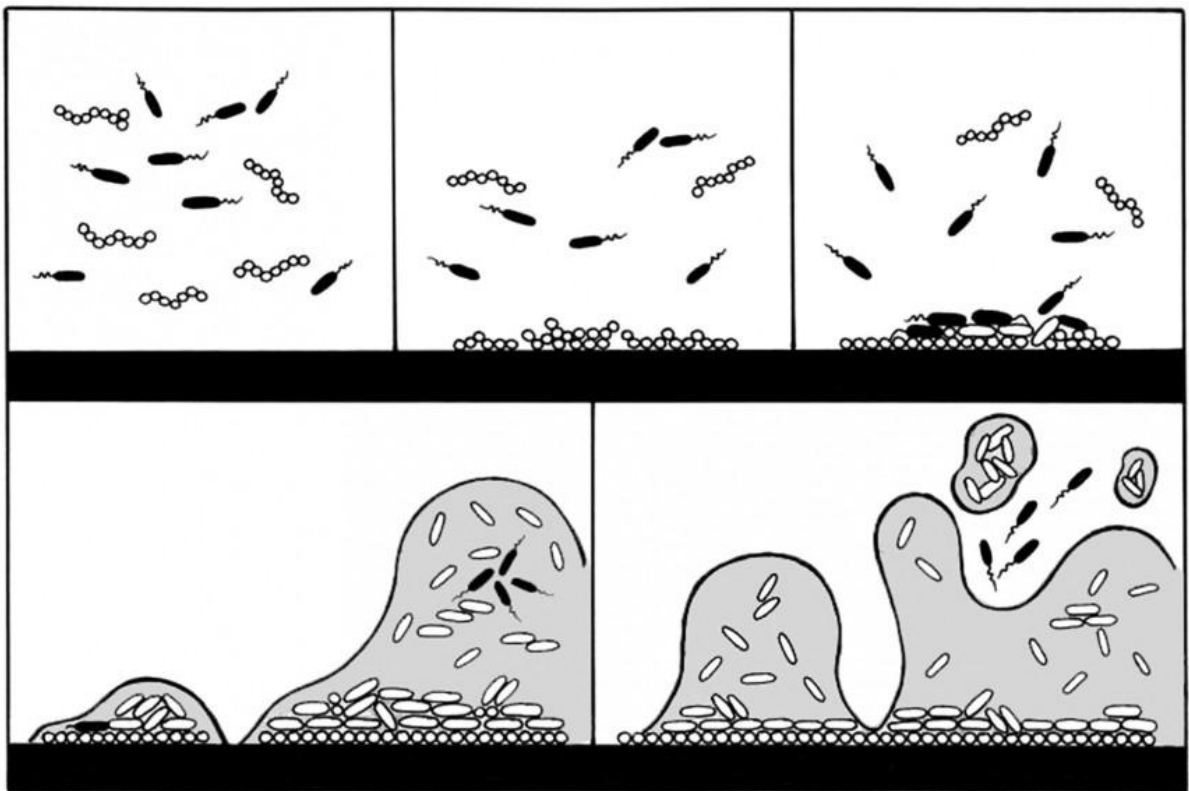
3.5 Biofilm

Pro bakterie není problémem žít volně ve vodném prostředí nebo na pevném podkladu, kde mohou vytvořit biofilm (Schindler 2008). Růst v biofilmu bakteriím zaručuje vyšší odolnost k přežití. Stávají se odolnější toxickým látkám, UV záření, ale i mechanickému poškození a dokonce jsou i odolnější bakteriofágům či jiným predátorům (Rulík et al. 2011). Příznivým prostředím pro vytváření biofilmu jsou sliznice a výstelky dutin.

Biofilmy se mohou tvořit například na plastických či kovových protetických implantátech, které byly zavedeny do lidského organismu (Schindler 2008). Jedná se intravenózní katétr, umělé srdeční chlopně, kloubní náhrady, chirurgické stehy, cévní štěpy, nitroděložní tělíška, močové katétr nebo kontaktní čočky a jinak podobné náhrady. Příklady onemocnění, které zapříčiňuje právě tvorba biofilmu, jsou zubní kaz, zánět středního ucha, záněty žlučových cest či zánět plic (Votava 2005). Na tvorbu biofilmu má pak vliv zejména způsob zavedení implantátu, péče o něj a doba, po kterou je zaveden do těla. Velmi podstatným vlivem je materiál implantátu. Povrchy těchto náhrad jsou díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem vhodné pro adhezi a následnou tvorbu biofilmu pro mnoho

kmenů bakterií. Osídlování implantátů usnadňuje vrstva sérových a tkáňových proteinů hostitele a to především ty, co jsou součástí krve.

Vznik a vývoj biofilmu má několik kroků, které jsou zobrazeny níže na obrázku 8. Nad určitým pevným podkladem, který může být tvořen např. jakýmkoli implantátem se nachází kapalná fáze, v našem případě jde o krev. Organické látky vyskující se v krevním řečišti jsou zachytávány na pevný podklad. Dále dochází k adhezi mikroorganismů na organické látky, které jsou právě výživou pro mikroorganismy. Přilnuté mikroorganismy se množí více a více a biofilm v podstatě roste. Navíc jsou zachytávány i další buňky z okolní kapaliny. U takto plně rozvinutého biofilmu dochází k oddělování drobných mikroorganismů, což může v lidském organismu vyvolat závažné potíže (Rulík et al. 2011).



Obrázek 8 – Princip vzniku a vývoje biofilmu (Rulík et al. 2011)

4 ZÁKLADY KULTIVACE BUNĚČNÝCH KULTUR PRO *IN VITRO* TESTY

Testy prováděné na buněčných liniích se nazývají *in vitro* testy (Alberts et al. 2002). V mnoha případech se buňky izolují a udržují v laboratoři za podmínek, které umožní jejich přežití a růst. Takový postup udržování je známý jako kultivace (Lodish et al. 2013). Všechny buněčné linie sloužící k *in vitro* testování potřebují pro svůj růst živiny v podobě živných médií, vhodnou teplotu, pH a kyslík. Změny v podmínkách kultivace mohou způsobit či zastavit růst nebo dokonce vyvolat apoptózu (Lee, Henthorn 2012).

První fází tkáňové kultury je primární buněčná kultura. Ke stanovení primární buněčné kultury se běžně používají živočišné tkáně nebo jejich embrya. Po izolaci požadovaného části tkáně dochází k rozčlenění buněk buď mechanicky nebo enzymaticky (Lee a Henthorn, 2012). Prvním krokem při izolaci buněk jednotného typu tkáně, která obsahuje směs buněčných typů je narušit ECM, která drží buňky pohromadě (Alberts et al. 2002).

Pro kultivaci různých buněčných linií se používají různé typy médií. Výběr je většinou empirický a lze jej optimalizovat pro různé buněčné linie a účely. Většina médií má následující základní součásti: vyvážený solný roztok, esenciální aminokyseliny, glukózu, vitamíny a antibiotika. K doplnění médií se používá různých sér. Séra obsahují růstové faktory a hormony, které buňka potřebuje ke svému růstu (Lee, Henthorn 2012). Nejvíce používaná séra v tkáňové kultuře jsou původem lidského séra, telecího či hovězí plodu nebo dospělé koně (Alberts et al. 2002).



Obrázek 9 – Zásobní láhev média (Invitrogen protocol)

Savčí buňky jsou nepřizpůsobivé na různý rozsah teplot (Lee, Henthorn 2012). Optimální teplota pro buněčné kultury je závislá na: 1) tělesné teplotě zvířete, ze kterého byly buňky získány 2) jakémkoli anatomickém kolísání teploty 3) začlenění bezpečnostního

faktoru pro drobné regulace inkubátoru. Teplota doporučená pro většinu lidských buněk a buněk teplokrevných živočišných linií je 37°C (Freshney 2005). Mnoho buněčných linií vyžaduje také optimální pH. Buněčným liniím vyhovuje hodnota pH 7,4 (Lee, Henthorn 2012). Optimální pH pro růst buněk se liší poměrně málo mezi různými buněčnými kmeny. Ovšem například linie fibroblastů rostou nejlépe při pH 7,4 - 7,7 naopak transformované buňky mohou lépe růst při pH 7,0 - 7,4 (Freshney 2005).

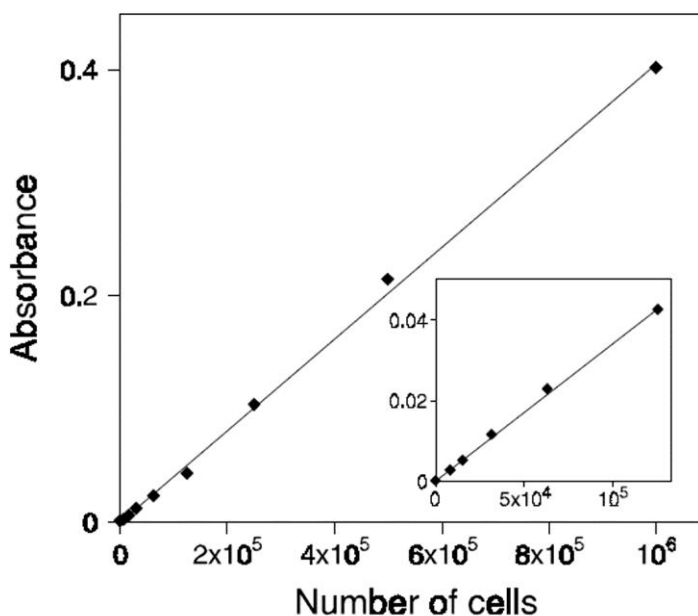
Kyslík je vyžadován pro dýchání a je tedy klíčovou živinou pro přežití kultur živočišných buněk, i když požadavky se liší podle druhu buněčné linie (Lee, Henthorn 2012). Přičemž většina buněčných linií preferuje nižší tlak kyslíku (Freshney 2005). Vzhledem k nízké rozpustnosti kyslíku ve vodě, musí být kyslík k dispozici nepřetržitě a to obvykle větráním kultivačního média (Lee, Henthorn 2012).

5 METODY IN VITRO TESTOVÁNÍ BUNĚČNÉ PROLIFERACE

Nové materiály by měly být hodnoceny *in vivo* a *in vitro* biologickým testováním k zajištění bezpečnosti a biokompatibility před použitím v lidském těle. Testy cytotoxicity se běžně používají pro hodnocení biokompatibility materiálů. Správné hodnocení cytotoxicity vyžaduje správné a přesné *in vitro* laboratorní zkoušky (Wang et al. 2010).

5.1 MTT test

MTT test může být použitelný pro předběžné detekční kontroly materiálů pro cytotoxické účinky. Jde o relativně levný test a lze jej snadno provést. MTT test je poměrně spolehlivou metodu ve srovnání s jinými testy (Wang et al. 2010). Jedná se o kvantitativní metodu založenou na použití 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Dufrane et al. 2001). Test zahrnuje přeměnu ve vodě rozpustného MTT na nerozpustný formazan (Vybrant protocol, 2002). MTT je transformováno mitochondriálními dehydrogenázami v živých buňkách s modro-fialově barevnou sraženinou formazanu (Wang et al. 2010).



Obrázek 10 – Linerární závislost viability buněk a absorbance (Vybrant Protocol, 2002)

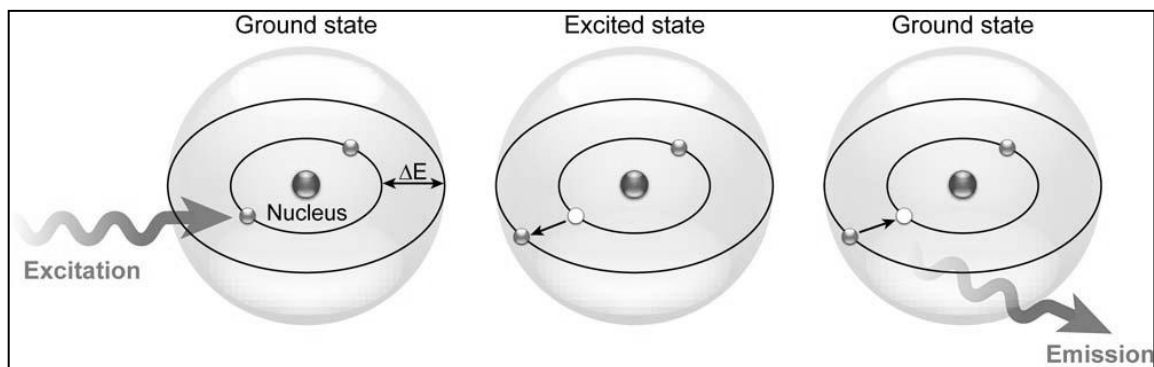
Následně je koncentrace stanovena pomocí absorbance světelného záření o vlnové délce 570nm (Vybrant protocol, 2002). Absorbance formazanu ve viditelné oblasti je ve vzájemném vztahu s životaschopností buněk neboli viabilitou, jak můžeme vidět na obrázku 10 (Wang et al. 2010). Výsledek následně poukazuje na velmi citlivé měření. Je zaznamenána hustota buněk přibližně 10^6 na jednu jamku testované mikrodestičky (Vybrant protocol, 2002).

Výsledky, jež jsou získány pomocí MTT testu poukazují, že je tento test dostatečný k prokázání viability buněčných linií. Při návrhu biomateriálů je důležité dokázat jejich dostatečnou biokompatibilitu. Proto musí být provedena řada testů, které tuto vlastnost dokazují. První etapou důkazů biokompatibility je test cytotoxicity. MTT test se jevil jako velmi dostačující test, který studoval interakci mezi živou buňkou a biomateriálem (Dufrene et al. 2001).

5.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie se stala nezbytným nástrojem v biologii, stejně jako ve vědě materiálů, protože má atributy, které nejsou snadno dostupné v jiné optické mikroskopické technice (Spring 2003). Především poskytuje efektivní a jedinečný přístup ke studiu pevné a živé buňky. Jedná se o všestrannou metodu s velkou specifičností a vysokou citlivostí (Ishikawa-Ankerhold et al. 2012).

Podstata celé fluorescence je znázorněna na obrázku 11. Když organické nebo anorganické vzorky absorbují záření v podobě světelného kvanta a následně toto záření vyzáří, je takový proces typickým výsledkem fluorescence (Spring 2003). Elektron je excitován na vyšší energetickou dráhu. Po určité době elektron přechází zpět do své původní dráhy. Přebytková energie je ve formě emise vyzářena (Ishikawa-Ankerhold et al. 2012). Fluorescence je emisí fotonů pomocí atomů nebo molekul, jejichž elektrony jsou přechodně stimulovány k vyššímu budicímu stavu zářivou energií z vnějšího zdroje (Murphy 2001). Moderní mikroskopy pro pozorování fluorescenčních vzorků jsou nakonfigurovány tak, aby světelná excitace prostřednictvím objektivu prošla do vzorku a pak se selektivně pozorovalo emitované fluorescenční světlo, které přichází zpět ze vzorku (Lodish et al. 2013). Ovšem ve většině aplikací fluorescenční mikroskopie je počet fotonů, které se dostanou do oka nebo na detektor, obvykle velmi nízký. Uvádí se, že účinnost zachycování mikroskopy, je menší než 30% (Spring 2003).



Obrázek 11 – Princip fluorescence (Ishikawa-Ankerhold et al. 2012)

Fluorescenční mikroskopie je široce využívána pro studium intracelulární distribuce a molekulárních mechanismů velkého množství makromolekul a metabolitů (Murphy 2001). Nejčastěji se používá k detekci specifických proteinů nebo jiných molekul v buňkách a tkáních (Alberts et al. 2002). Je důležité si blíže uvědomit některé z hlavních aplikací, pro které je fluorescenční mikroskopie použitelná. Patří mezi ně například: 1) stanovení intracelulární distribuce makromolekul ve vytvořených strukturách, jako jsou například membrány 2) studium intracelulární dynamiky makromolekul spojených se závaznými postupy disociace a difúze 3) studium proteinů a reakčních mechanismů pomocí fluorescenčního přenosu energie a fluorescenční korelační mikroskopie 4) stanovení intracelulárních koncentrací a změn kontrakcí iontů, včetně H^+ , Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} a mnoho jiných kovů 5) studium životaschopnosti buněk a účinků faktorů, které ovlivňují rychlost apoptózy pomocí kombinace barev, které jsou trvalé a nestálé vůči plazmatické membráně 6) zkoumání buněčných funkcí, jako je endocytóza, exocytóza, transdukce signálu a regenerace transmembránových potenciálů pomocí fluorescenčních barviv (Murphy 2011).

Fluorescenční mikroskop detekuje buňky takovým způsobem, že se buňky obarvují fluorescenčními barvivy (Alberts et al. 2002). Přičemž koncentrace fluorescenčního barviva je závislá na koncentraci iontů (Lodish et al. 2013). Dvě fluorescenční barviva, která se běžně používají, jsou: 1) fluorescein, které emituje intenzivní zelenou fluorescenci při excitaci s modrým světlem a 2) rhodamin, které emituje tmavě červenou fluorescenci při excitaci zeleno-žlutého světla (Alberts et al. 2002).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

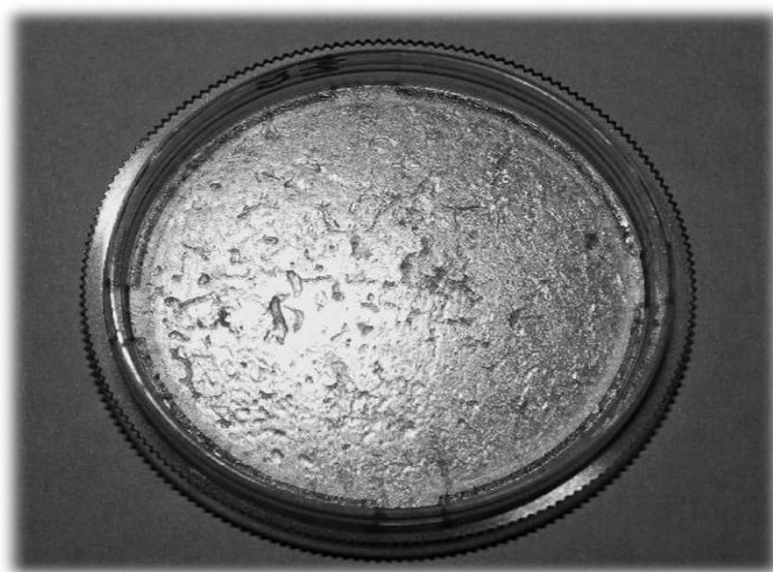
6 EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ

V experimentu se pracovalo s kolagenovými filmy, které obsahovaly jednak antibakteriální látky – benzylchlorid (BzCl) a bronopol a dále extrakt z Pažitky pobřežní (*Allium schoenoprasum*). Pro stanovení zda je antibakteriální látka účinná v použitých koncentracích byla použita disková difuzní metoda. Stanovení cytotoxicity bylo provedeno dle ISO 10993-5 „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“, s úpravami.

6.1 Kolagenové filmy

Pro experiment byly použity kolagenové filmy, konkrétně s emulzí atelokolagu z hovězí Achillovy šlachy (pH 3,5), která obsahovala 1,4% atelokolagenu (Vipo AS). Atekolagen byl rozpuštěn v 0,1M kyselině octové, aby se připravil 0,1% w/w roztok. Roztok se následně míchal pomocí třepačky (IKA) po dobu 4 hodin při 1000 otáčkách za minutu. Následně se 2ml tohoto roztoku odlévaly na petriho misky. Rozpouštědlo bylo odpařováno po dobu tří dnů za laboratorních podmínek.

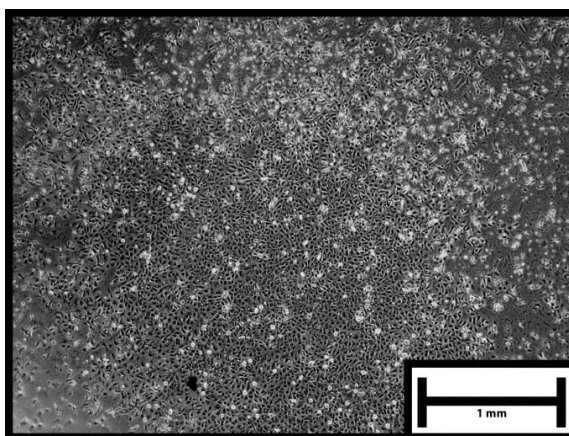
Součástí kolagenových filmů byly následující bioaktivní látky: 1) benzylchlorid o koncentracích 2%; 0,5% a 0,1% 2) bronopol o koncentracích 2%; 0,5% a 0,1% 3) extrakt z *Allium schoenoprasum* (*A. schoenoprasum*) o koncentracích 25µg/ml; 50µg/ml; 75µg/ml a 100µg/ml. Přičemž jedna petriho miska zůstala pouze s atelokolagenem. Jako reference byl použit růst buněk na tkáňovém polystyrenu (PAA).



Obrázek 12 – Ukázka připraveného kolagenového filmu

6.2 Použitá buněčná linie

Pro testy cytotoxicity byla použita následující buněčná linie. Jednalo se o linii lidských keratinocytů HaCaT (CLS - Cell Lines Service). Buňky byly získány z lidské kůže 62letého muže. Z pohledu růstových vlastností jsou keratinocyty jednovrstevné. Tato buněčná linie spadá do kategorie biosafety level 1 (což znamená, že s buňkami se může pracovat bez jakéhokoliv omezení, neobsahují žádný patogen, který by mohl vyvolat onemocnění, a představují minimální potenciální riziko pro laboratorní pracovníky a životní prostředí). Buňky byly kultivovány v inkubátoru Heracell 150i (ThermoScientific). Pro tyto buňky je důležité, aby inkubátor udržoval následující kultivační parametry: koncentrace oxidu uhličitého (CO₂) 5%, teplota 37,0°C a stabilní vlhkost.



Obrázek 13 – Ukázka buněčné linie HaCaT

K buňkám bylo přidáváno kultivační médium, které je složeno z Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) s vysokým obsahem glukózy. Vysokým obsahem glukózy je myšlena její koncentrace 4,5g/l. Součástí kultivačního média je také přídavek stabilního L-glutaminu. L-glutamin je esenciální aminokyselina a musí být do médií přidávána pro následnou buněčnou kultivaci. Přídavek takto stabilního L-glutaminu zajistí použitelnost média po dobu 18 měsíců. Součástí média jsou i vitamíny. Navíc bylo médium podle doporučení výrobce obohaceno přídavkem 10% fetálního hovězího séra (PAA). Médium neobsahuje žádné látky, které by v daných koncentracích byly považovány za zdravotně nebezpečné. Médium je nutné skladovat v řádně označených nádobách při teplotě 2°C až 8°C. Z fyzikálního hlediska je pro médium vhodná koncentrace CO₂ 8,5%. Hodnota pH by se

měla pohybovat v rozmezí 6,8 – 7,5. DMEM slouží k pěstování celé řady buněčných linií. Součástí média byla také antibiotika pro prevenci infekce a to penicilin a streptomycin.

6.3 Prekultivace

Před započítáním vlastního testu bylo nutné provést prekultivaci buněk. Nejdříve se odsálo medium z kultivační lahve. Poté se buňky opláchly pomocí PBS ($0,2 \text{ ml/cm}^2$), které se následně odsálo. Pomocí trypsinu ($0,1 \text{ ml/cm}^2$) byly narušeny mezibuněčné spoje a buňky tak byly převedeny do suspenze. Doba působení trypsinu byla individuální podle pozorovaného uvolnění buněk, maximálně však 20 minut. Při trypsinizaci dochází k oddělení buněk jak ode dna kultivační láhve, tak jednotlivých buněk od sebe. Po oddělení buněk se přidalo kultivační médium ($0,1 \text{ ml/cm}^2$). Obsah kultivační láhve se převedl do zkumavky, která se nechala centrifugovat, aby se buňky dokonale oddělily od média s trypsinem. Centrifugace proběhla na centrifuze Ependorf 5702 R (Ependorf) po dobu 3 minut, při teplotě 37°C a rychlosti $1,1 \cdot 10^3 \text{ rpm}$. Buňky se dokonale oddělily od média na spodní část zkumavky. Médium se odsálo a buňky se naředily na požadovanou koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk/ml kultivačního média. Ze zkumavky o požadované koncentraci se vždy odpipetovaly 2 ml, které se přidaly na každou petriho misku. Následně probíhala třídní kultivace.

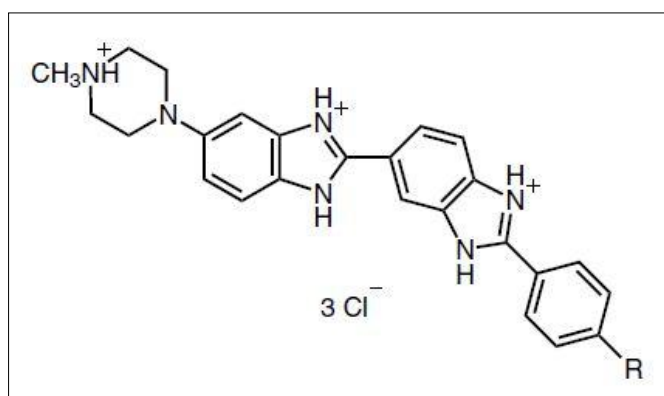
6.4 MTT test

Po třech dnech kultivace se u poloviny vzorků provedl MTT test. Na Petriho misky se přidalo $5 \mu\text{l/ml}$ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). MTT je prášek žluté barvy, rozpustný ve vodě 10 g/l (Duchefa biochemie).

MTT se nechalo v inkubátoru 4 hodiny působit. Pak se odpipetovalo $0,8 \text{ ml}$ roztoku z misky, zbytek se odsál a $0,8 \text{ ml}$ se vrátilo. Přidalo se $1,6 \text{ ml}$ DMSO (dimethylsulfoxid), které se nechalo 20 minut působit. Poté se již měřila absorbance vzorků na mikrotitračním spektrofotometru Sunrise (Tecan). Vlnová délka byla nastavena v oblasti viditelného světla na hodnotu 570 nm (Vybrant protocol, 2002).

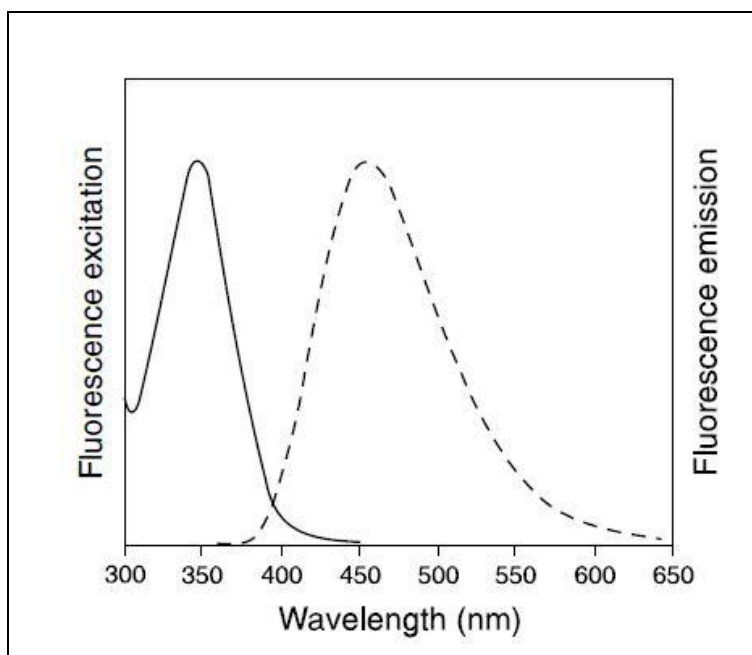
6.5 Fluorescenční mikroskopie

K druhé polovině vzorků se přidalo 10 μ g/ml fluorescenčního barviva Hoechst (Invitrogen protocol, 2005). Vzorky byly pozorovány na invertovaném fluorescenčním mikroskopu (Olympus CKX 41). Existují různé druhy barviva Hoechst. Při experimentu se pracovalo s druhem – pentahydrat(bis-benzimide) čili Hoechst s označením 33258, který je mírně rozpustný ve vodě. Strukturální vzorec je znázorněn na obrázku 14.



Obrázek 14 – Struktura barviva Hoechst (Invitrogen protocol, 2005)

Hoechst je modré cytoplazmatickou membránou propustné fluorescenční barvivo, které je velmi citlivé na konformaci DNA a stav chromatinu v buňkách. Hoechst barvivo je velmi užitečné pro životně důležité rozpoznání poškozené DNA a další životaschopnost buňky. Měření spočívá v tom, že se sledují posuny emisních spekter barviva. Barviva mohou být vybudena jednak xenonovou nebo obloukovou lampou, ale i UV laserem. Přidání koncentrací barviva ke vzorkům je přizpůsobeno konkrétnímu buněčnému typu. Různý přídavek koncentrace následně vede i k různým typům inkubačních podmínek. Konečné zbarvení může ovlivnit řada faktorů a to např. růstové médium, hustota buněk či přítomnost dalších typů buněk (Invitrogen protocol, 2005).



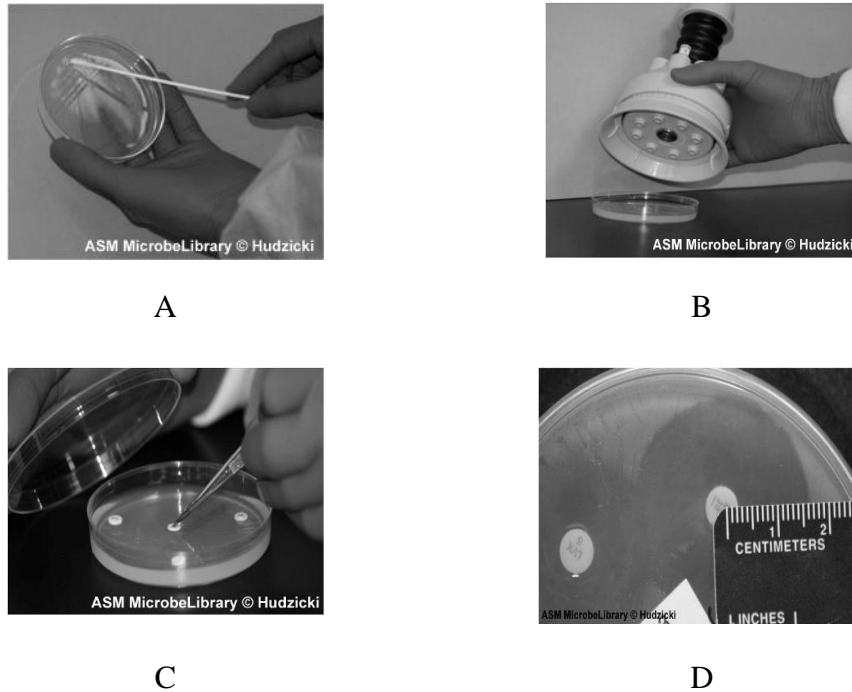
Obrázek 15 – Emisní a excitační spektrum barviva Hoechst

(Invitrogen protocol, 2005)

6.6 Antibakteriální testy

Antibakteriální testy byly provedeny pomocí diskové difúzní metody neboli Kirby-Bauerovy metody. Metoda se používá již od roku 1966 a je pojmenována podle průkopníků W. Kirbyho a W. Bauera. Jedná se o jednu z metod, které se využívá ke stanovení citlivosti k antibiotikům.

Schéma s jednotlivými kroky diskové difúzní metody je znázorněno na obrázku 16. Do petriho misky je nalita živná půda, na kterou se inokulují bakterie (A). Pomocí dispenzoru čili dávkovače (B) anebo ručně se na povrch agarů nanese kolečka filtračních papírů, na které jsou nanášeny látky, které mají být testovány (C). Připravené vzorky se inkubují po dobu 16 až 18 hodin. Nakonec se měří průměr inhibiční zóny a to s přesností na milimetr. Průměr inhibiční zóny, která je produkována, indikuje náchylnost nebo rezistenci bakterií vůči antibiotiku (Hudzicki, 2009).



Obrázek 16 – Princip diskové difúzní metody (Hudzicki, 2009)

Jednoduše tato metoda spočívá v nanesení zkoumané látky na papírový disk umístěný na živnou půdu. Je-li od disku pozorován růst inhibiční zóny, jinými slovy bakterie nedokáží prorůstát až k samotným vzorkům disků, je zkoumaná látka účinná a vykazuje antibakteriální účinek. Rostou-li však bakterie až k samotným diskům a není tak pozorován jakýkoli průměr inhibiční zóny, je takovéto antibiotikum neúčinné a nevykazuje žádný antibakteriální účinek.

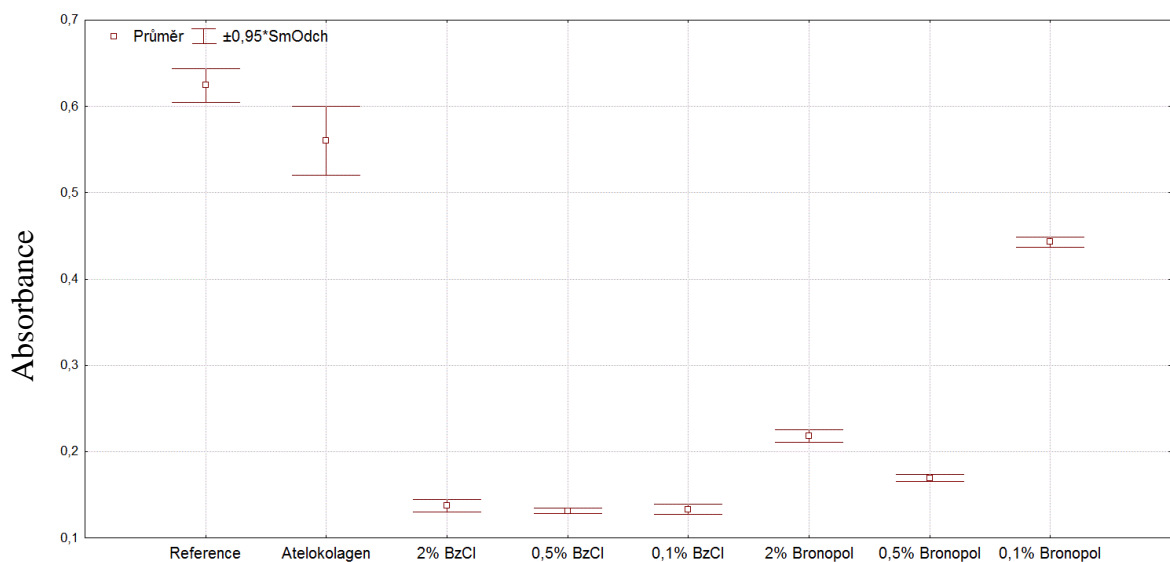
Vzorky kolagenu s různými koncentracemi extraktů z *A. schoenoprasum* byly nanесeny na sterilní kolečka filtračního papíru o průměru 8mm. Živnou půdou byl Mueller-Hintonův agar, který byl naočkován dvěma patogenními mikroorganismy. Konkrétně se jednalo o dva druhy bakterií: 1) *Escherichia coli* (*E. coli*) (CCM4516) a 2) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (CCM4517). Vzorky byly inkubovány 2 dny při teplotě 35°C. Průměr inhibiční zóny byl kontrolován první i druhý den kultivace.

7 VÝSLEDKY

Hlavním cílem práce byla snaha připravit biomateriál, který bude biokompatibilní a zároveň antibakteriální. Existuje mnoho potencionálních materiálů, které jsou pro takovéto účely vhodné. My jsme si vybrali kolagen, protože je často studován, vyskytuje se v lidském těle, je obecně biokompatibilní a netoxický. Jedním z testů určujících biokompatibilitu je cytotoxicita. V našem případě jsme využili pro testování cytotoxicity jsme využili buněčné linie lidských keratinocytů. K vyhodnocení viability buněk byl použit test MTT a fluorescenční mikroskopie. Antibakteriální efekt byl stanoven pomocí diskové difuzní metody.

7.1 Test cytotoxicity

Výsledky testování cytotoxicity jsou prezentovány ve formě grafů a tabulek. Osy x grafů znázorňují zastoupení jednotlivých kolagenových filmů s přidáním různých koncentrací účinných látek. Osy y představují absorbanci viditelného světla při hodnotě vlnové délky 570nm v rámci vyhodnocení MTT testu.



Graf 1 – Cytotoxicita kolagenových filmů s antibakteriálními látkami

Graf 1 je zobrazením výsledků cytotoxicity kolagenových filmů s různými koncentracemi účinných antibakteriálních látek. Pozorujeme, že růst buněk na samostatném kolagenovém filmu (bez jakékoli koncentrace antibakteriální látky) se téměř shoduje s referenč-

ním vzorkem (tkáňový polystyren). Vzorek kolagenového filmu s koncentrací 0,1% bronopolu vykazuje již sníženou absorpenci viditelného světla, tedy snížený viabilitu buněk. Kolagenové filmy, které obsahovaly 2% bronopolu a 0,5% bronopolu vykazují podstatně snížený růst buněk. Vzorky kolagenových filmů s 2%; 0,5% a 0,1% benzylchloridu neabsorbovaly téměř žádné viditelné světlo. Lze tedy říci, že kolagenové filmy s těmito koncentracemi benzylchloridu výrazně snížily růst buněk. Benzylchlorid ve všech testovaných koncentracích a bronopol v koncentracích 2% a 0,5% měli výrazný vliv na buněčnou viabilitu

Tabulka 1- Viabilita buněk kultivovaných za přítomnosti účinných antibakteriálních látek v různých koncentracích

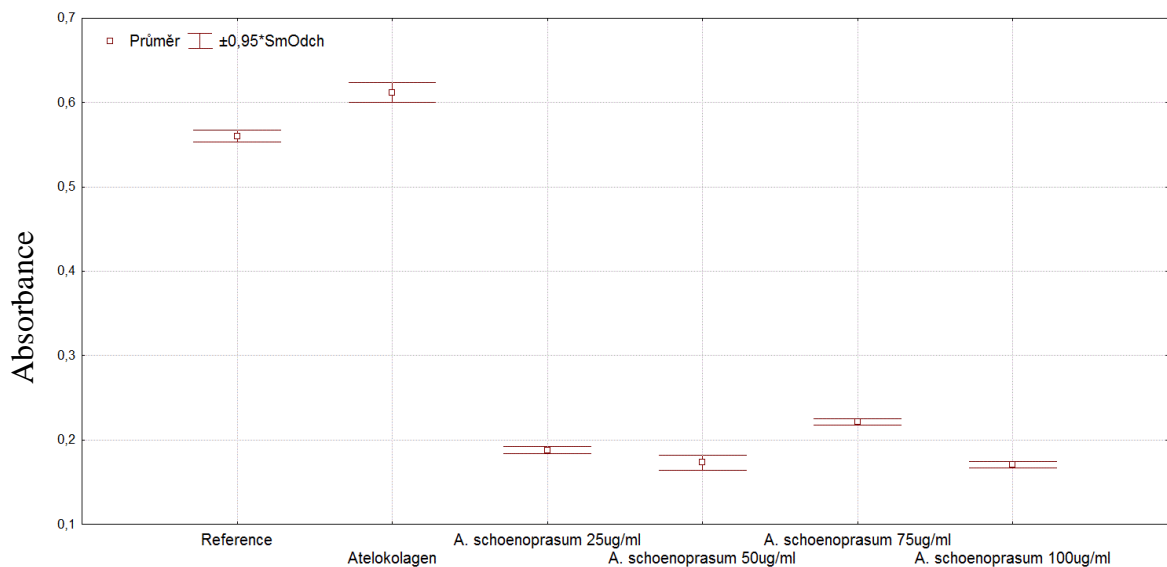
Vzorek	Průměr ± SD	p	%
Atelokolagen	0,5602 ± 0,0422	0,0335	89,7
2% BzCl	0,1377 ± 0,0076	0,0000	22,1
0,5% BzCl	0,1313 ± 0,0033	0,0000	21,0
0,1% BzCl	0,1331 ± 0,0061	0,0000	21,3
2% Bronopol	0,2182 ± 0,0075	0,0000	34,9
0,5% Bronopol	0,1692 ± 0,0044	0,0000	27,1
0,1% Bronopol	0,4429 ± 0,0063	0,0000	70,9
Reference	0,6244 ± 0,0202		100

Poznámka: p vyjadřuje hladinu významnosti při porovnání s referencí. % vyjadřují procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; >80 vyjadřuje necytotoxický efekt; 60–80 slabá cytotoxicita; 40–60 střední cytotoxicita, <40 silná cytotoxicita.

V tabulce 1 jsou zaznamenány průměrné hodnoty absorpencí se směrodatnou odchylkou, které korelují s buněčnou viabilitou. Sloupec s hodnotami p je vyjádřením hladiny významnosti rozdílů mezi absorpencí jednotlivých vzorků a referencí (vyhodnoceno pomocí T-testu). Dále je uveden procentuální pokles viability buněk, což odpovídá vyhodnocení pomocí ISO normy. Hodnota 100 znamená 100% přežitelnost buněk a odpovídá referenci. Hodnoty mezi 80 – 100 jsou vyjádřením necytotoxického efektu. Rozmezí hodnot 60 – 80

poukazuje na slabou cytotoxicitu, 40 – 60 střední cytotoxicitu. Hodnota, která je nižší než 40 je ukazatelem silné cytotoxicity.

Z uvedených hodnot můžeme určit, že samotný atelokolagen nevykazuje žádný cytotoxický efekt. Kolagenový film s koncentrací bronopolu 0,1% vykazuje hodnotou 70,9%, což odpovídá slabému cytotoxickému efektu. Zbylé koncentrace vykazují silnou cytotoxicitu. Pro následující zamyšlené aplikace biomateriálu je teoreticky použitelný materiál s koncentrací 0,1% bronopolu. V případě BzCl pak všechny testované koncentrace vykazují silnou cytotoxicitu. Pro zamýšlené aplikace tedy nejsou tyto koncentrace vhodné.



Graf 2 - Cytotoxicita kolagenových film s extraktem *A. schoenoprasum*

Na grafu 2 jsou zaznamenány výsledné hodnoty cytotoxicity kolagenových filmů s extraktem *A. schoenoprasum*. Všechny zkoumané koncentrace pažitkového extraktu snižovaly viabilitu buněk vyjádřenou absorbancí světla o vlnové délce 570nm,. U koncentrace 75μg/ml byla absorbance o něco málo vyšší než u ostatních koncentrací. U koncentrací 25μg/ml; 50μg/ml a 100μg/ml byla absorbance nižší než 0,2 U koncentrace 75μg/ml extraktu absorbance přesahovala hodnotu 0,2. Tyto hodnoty jsou velmi nízké oproti hodnotě absorbance reference, která je 0,6. Hodnota absorbance vzorku kolagenového filmu bez přidání jakékoli koncentrace extraktu přesahovala hodnotu referenčního vzorku, teda došlo ke zvýšené viabilitě. Toto neodpovídá výsledku předcházejícího testu, kde atelokolagen vykazoval nižší hodnotu absorbance. To může být dáno nehomogenitou připravených

vzorků, což je obecný problém biopolymerů. Na grafu si můžeme také všimnout velmi nízké směrodatné odchylky. Rozptýlení hodnot absorpčních je tedy velmi nízké a blízké průměrné hodnotě.

Tabulka 2 - Viabilita buněk kultivovaných za přítomnosti extraktu *Allium schoenoprasum* v různých koncentracích

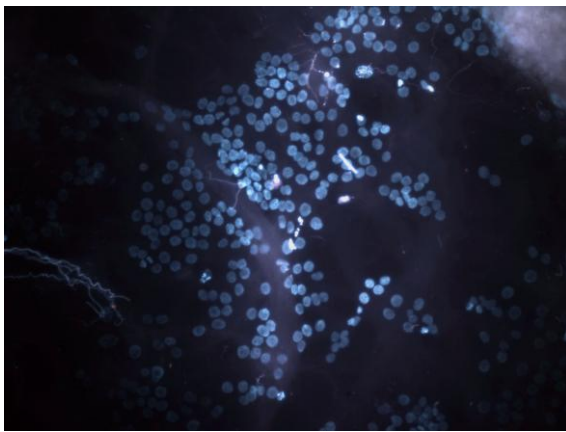
Vzorek	Průměr ± SD	p	%
Atelokolagen	0,6119 ± 0,0123	0,0001	109,2
A. schoenoprasum 25ug/ml	0,1877 ± 0,0045	0,0000	33,5
A. schoenoprasum 50ug/ml	0,1731 ± 0,0090	0,0000	30,9
A. schoenoprasum 75ug/ml	0,2215 ± 0,0036	0,0000	39,5
A. schoenoprasum 100ug/ml	0,1708 ± 0,0041	0,0000	30,5
Reference	0,5604 ± 0,0078		100

Poznámka: p vyjadřuje hladinu významnosti při porovnání s referencí. % vyjadřují procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk; >80 vyjadřuje necytotoxický efekt; 60–80 slabá cytotoxicita; 40–60 střední cytotoxicita, <40 silná cytotoxicita.

K zobrazení výsledků MTT testu kolagenových filmů s extraktem *A. schoenoprasum* na grafu 2 se vztahuje tabulka 2. Výsledky MTT testu v podobě číselných hodnot potvrzují grafické zobrazení. Průměrné hodnoty absorpčních všech vzorků kolagenových filmů s koncentracemi extraktu *A. schoenoprasum* dokazují velmi nízkou viabilitu buněk. Hodnoty procentuálního poklesu viability buněk jsou v rozmezí 30,5% – 39,5%. Koncentrace přidané ke kolagenovým filmům tedy vykazují silnou cytotoxicitu. Naopak vzorek atelokolagenu bez přidání koncentrací extraktu přesahuje hodnotu 100.

7.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je optická metoda, která detekuje přítomnost fluorescenčních sond v buňkách. Oproti klasické mikroskopii poskytuje výrazně vyšší kvalitu obrazu, pokud jsou buňky kultivovány v strukturách kolagenu. Je to dáno zobrazením pouze konkrétních struktur, v našem případě DNA, zatímco zobrazení kolagenu a dalších struktur je výrazně omezeno. Nutností je použití fluorescenčních molekul, které se váží na makromolekulární struktury buňky. Fluorescenční molekuly absorbují světelné paprsky o určitých vlnových délkách a následně paprsky emitují o vyšší vlnové délce. Podle výsledného barevného spektra tak můžeme určit přítomnost určitých struktur či látek buňky.



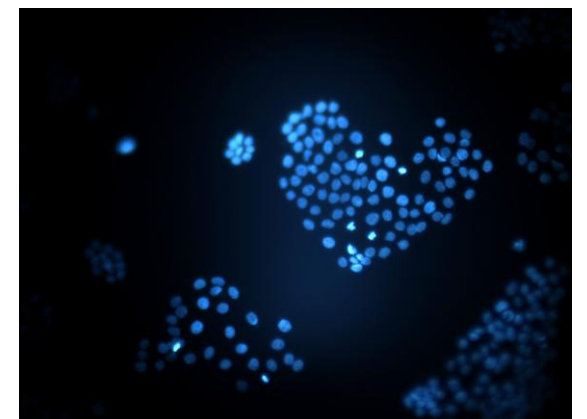
A



B



C



D

Obrázek 17 – Výsledné snímky fluorescenční mikroskopie

Použitou fluorescenční molekulou bylo modré fluorescenční barvivo Hoechst, které se váže na molekuly DNA. Na celkovém obrázku 19 vidíme fotografie pořízené z fluorescenční mikroskopie. Na snímku A je vzorek atelokolagenu bez přidání jakékoli koncentrace účinné antibakteriální látky či extraktu z pažitky. Podle hustoty jader, znázorněné pomocí barviva Hoechst, můžeme usoudit, že buněčná linie porůstala kolagenový film poměrně dobře. Takto hustý růst buněčné linie ovšem nepozorujeme na fotografii B u vzorku kolagenového filmu, který obsahuje extrakt z pažitky o nejvyšší použité koncentraci 100 μ g/ml. Koncentrace buněčných jader je v tomto případě výrazně nižší, což odpovídá nízkému výskytu buněk. Snímek C představuje samotná kolagenová vlákna, která jsou celá porostlá keratinocyty. Na fotografii D je zachycen růst keratinocytů, představující vzorek reference. Buňky na tomto snímku nejsou kultivovány na žádném kolagenovém vlákně, ani zde není přidána jakákoli koncentrace účinné antibakteriální látky nebo extrakt z pažitky. Na snímku pozorujeme jasně modře zářící útvary představující hustotu buněčných jader.

7.3 Antibakteriální testy

S ohledem na časové možnosti, byly provedeny antibakteriální testy pouze na vzorcích s extraktem *A. schoenoprasum*. V tabulce 3 jsou zaznamenány výsledky antibakteriálních testů kyseliny octové, samotného kolagenu a jednotlivé vzorky polyfenolických látek o koncentracích 1%; 2,5%; 5% a 10%. Tyto vzorky byly podrobeny antibakteriálnímu testu diskovou difúzní metodou.



Obrázek 18 – Ilustrativní vzorky podrobené antibakteriálnímu testu

Na obrázku 22 jsou zobrazeny dva vzorky, s kterými se u antibakteriálního testu pracovalo. Při provádění antibakteriálního testu byl pozorován růst bakterií *E. Coli* a *S. aureus*. Výsledek testu ukázal, že během prvního ani druhého dne inkubace nebyla na vzorcích pozorována žádná inhibiční zóna. Testovatelné koncentrace tedy nevykazovaly žádnou antibakteriální aktivitu.

Tabulka 3 – Výsledky antibakteriálního testu polyfenolických látek

Vzorek	1. den inkubace	2. den inkubace
0,1M CH ₃ COOH	-	-
Kolagen	-	-
1%	-	-
2,5%	-	-
5%	-	-
10%	-	-

8 DISKUZE

Při návrhu biomateriálů, které mají následně nacházet svá uplatnění v biomedických aplikacích, se musí dodržet celá řada požadovaných vlastností. Důležitou vlastností, kterou je nutno zabezpečit u každého biomateriálu, je jeho biokompatibilita (Kim et al. 2000). Proto jsou biomateriály podrobovány řadě testů, aby se tato vlastnost prokázala. Základním testem, který se provádí při dokazování biokompatibility je test cytotoxicity (Dufrane et al. 2001). Bakalářská práce se zabývá testováním upravených kolagenových filmů. Různé fyzikální formy kolagenu se zcela běžně používají v oblasti epidermálních náhrad při různých poraněních kůže či při popáleninách (Nair, Laurencin 2006). Důvod, proč se kolagen tak hojně používá jako biomateriál jen ten, že se jedná o materiál, který má vynikající a dobře prozkoumané vlastnosti jak biologické, tak i fyzikálně-chemické (Ferreira et al. 2012). Kolagen vykazuje celou řadu vlastností, které jsou z pohledu návrhu biomateriálů velmi výhodné. Především je kolagen biokompatibilní a netoxický (Ruszczak 2003).

Test cytotoxicity kolagenových filmů byl proveden pomocí MTT testu. Kolagenové filmy navíc obsahovaly účinné antibakteriální látky bronopol a benzylchlorid, protože je velmi výhodné, aby používaný biomateriál byl antibakteriální. Mohly bychom tak při aplikacích biomateriálů předcházet vzniku infekcí u pacientů, protože infekce, které mohou být spojeny s používáním polymerů v lékařských aplikacích jsou hlavními klinickými komplikacemi. V roce 2005 byla provedena studie, která se zabývala antibakteriálními vlastnostmi polyetyleny (PE), který má v biomedicínských aplikacích mnoho uplatnění. Vrstva PE byla upravena pomocí bronopolu. Takto modifikovaný PE vykazoval lepší antibakteriální účinek vůči bakteriím *E. coli* i *S. aureus* (Zhang et al. 2006). To že i benzylchlorid je účinná antibakteriální látka dokazuje studie, která se zabývala přípravou vodě nerozpuštěného antibakteriálního materiálu. Byly zde použity dvě antibakteriální činidla a jako silnější se jevila právě látka benzylchlorid (Gao et al. 2007).

U vzorků kolagenových filmů s vybranými koncentracemi antibakteriálních látek bronopolu a benzylchloridu byla pomocí MTT testu prokázána snížená viabilita buněčné linie HaCaT. Použité koncentrace antibakteriálních látek vykazovaly cytotoxické účinky na buněčnou linii, se kterou se pracovalo. Pouze u vzorku s koncentrací 0,1% bronopolu byl zaznamenán účinek mírné cytotoxicity. Lze předpokládat, že čím by se ještě více snižovala koncentrace bronopolu, tím by se více zvyšovala viabilita buněk. Je zřejmé, že by se našla

taková koncentrace, která by nevykazovala žádný cytotoxický účinek. Byla by tak splněna podmínka nutné biokompatibility a velmi výhodný antibakteriální účinek biomateriálu.

Dále byly na vzorcích kolagenových filmů zkoumány polyfenolické látky, které byly získány z Pažitky pobřežní (*A. schoenoprasum*). Takto získaný extrakt polyfenolických látek z *A. schoenoprasum* přidáný ke kolagenovým filmům v různých koncentracích byl podroben jak testu viability buněk, tak antibakteriálnímu testu.

Existují studie, které se zabývají antiproliferačním účinkem fenolických sloučenin v řadě jedlých květů. Jednou ze zkoumaných bylin byla i *A. schoenoprasum*. Tato studie předpokládala, že fenolické sloučeniny obsažené v léčivých bylinách podstatně sníží buněčnou proliferaci. Výsledky prokázaly sníženou viabilitu buněčné linie HaCaT v přítomnosti extraktu z *A. schoenoprasum* (Kuceková et al. 2011). V rámci praktické části bakalářské práce byl proveden test buněčné viability na kolagenových filmech s rozdílnými koncentracemi polyfenolických látek z *A. schoenoprasum*. Výsledek testu potvrzuje snížení buněčné proliferace linie HaCaT za přítomnosti poly fenolických látek z *A. schoenoprasum*. Tato skutečnost, že polyfenolické látky inhibují růst buněk, poukazuje na potenciální využití při léčbě a prevenci nádorových onemocnění (Kuceková et al. 2011).

ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo stanovit vliv různých koncentrací bioaktivních látek na buněčnou proliferaci. Byly prováděny testy těchto látek: bronopol, benzylchlorid a polyfenolické látky (extrakt z Pažitky pobřežní).

Bronopol a benzylchlorid jsou látky, u kterých je jejich antibakteriální účinek znám. Při testu cytotoxicity, který byl prováděn pomocí MTT testu, tyto účinné antibakteriální látky o zkoumaných koncentracích výrazně snižovaly proliferační účinek buněčné linie HaCaT. Pouze jediná koncentrace (0,1%) látky bronopolu vykazovala účinek mírné cytotoxicity. Je zřejmé, že o něco nižší koncentrace by vykazovaly ještě nižší cytotoxický účinek. Biomateriál s takovou koncentrací bronopolu by jednak byl antibakteriální a zároveň by splňoval by i podmínku biokompatibility. V testech se také potvrdilo, že vzorky atelokolagenu výrazně podporují buněčnou proliferaci.

U polyfenolických látek byl zkoumán vliv různých koncentrací na buněčnou proliferaci. Navíc byl proveden antibakteriální test. Při antibakteriálním testu nebyl prokázán antibakteriální účinek polyfenolických látek. Naopak předpokládaná snížená viabilita buněk se prokázala. Všechny použité koncentrace polyfenolických látek vykazovaly silný cytotoxický účinek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, c2002, xxxiv, 1463, [84] s. ISBN 0-8153-3218-1.
- Albritton R.L., D.M. Coen a D.E. Golan. 2008. Principles of Combination Chemotherapy. *Principles of Pharmacology. The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. 2nd Edition. Dostupné z URL: http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/bacteriostatic_vs_bactericidal
- Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, a M. Turck. 1966. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:493-496.
- BETTINGER, Ch. J. 2011. Biodegradable elastomers for tissue engineering and cell-biomaterial interactions. *Macromolecular bioscience* [online], roč. 11, č. 4, s. 467–82. [vid. 8. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201000397
- DUFRANE, D., O. CORNU, T. VERRAES, N. SCHECROUN, X. BANSE, Y. J. SCHNEIDER a C. DELLOYE. 2001. In vitro evaluation of acute cytotoxicity of human chemically treated allografts. *European cells & materials* [online], roč. 1, s. 52–8; discussion 58. [vid. 8. March 2013]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16821194>
- DUCCEL, G., J. FABRY, L. NICOLLE. 2002. Prevention of hospital-acquired infections. 2nd. Malta: s.n.
- FERREIRA, A. M., P. GENTILE, V. CHIONO a G. CIARDELLI. 2012. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia* [online], roč. 8, č. 9, s. 3191–200. [vid. 6. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2012.06.014
- FISHER, J. P. *Tissue engineering*. New York, N.Y.: Springer, c2006, xx, 463 s., [3] s. barev. obr. příl. ISBN 0-387-32664-2.
- FRESHNEY, R. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, c2005, xxvi, 642 s. ISBN 0471453293
- GAO, B., S. HE, J. GUO a R. WANG. Preparation and antibacterial character of a water-insoluble antibacterial material of grafting polyvinylpyridinium on silica

- gel. *Materials Letters*. 2007, vol. 61, issue 3, s. 877-883. DOI: 10.1016/j.matlet.2006.06.034.
- GILLETTE, B. M., N. S. ROSSEN, N. DAS, D. LEONG, M. WANG, A. DUGAR a S. K. SIA. 2011. Engineering extracellular matrix structure in 3D multiphase tissues. *Biomaterials* [online], roč. 32, č. 32, s. 8067–76. [vid. 8. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.043
 - GROEBER, F., M. HOLEITER, M. HAMPEL, S. HINDERER a K. SCHENKE-LAYLAND. 2011. Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. *Advanced drug delivery reviews* [online], roč. 63, č. 4-5, s. 352–66. [vid. 3. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2011.01.005
 - HOLLINGER, J. O. *An introduction to biomaterials*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, c2012, xix, 624 s. ISBN 978-1-4398-1256-3
 - HUNT, J. A. 2008. Materials in a cellular world., roč. 7, č. August, s. 617–619. Dostupné z: doi:10.1038/nmat2242
 - HUDZICKI, J. 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. Dostupné z URL: <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>
 - *Invitrogen detection technologies; Hoechst Stains*. Molecular Probes, 2005. Dostupné z URL:<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/H3570?ICID=search-product>
 - ISHIKAWA-ANKERHOLD, H. C., R. ANKERHOLD a G. P. C. DRUMMEN. 2012. Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online], roč. 17, č. 4, s. 4047–132. [vid. 27. February 2013]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules17044047
 - JANČÁŘ, J., L. VOJTOVÁ, A. NEČAS, R. SRNEC, L. URBANOVÁ a M. CRHA. 2009. Stability of Collagen Scaffold Implants for Animals with Iatrogenic Articular Cartilage Defects. *Acta Veterinaria Brno* [online], roč. 78, č. 4, s. 643–648. [vid. 14. March 2013]. Dostupné z: doi:10.2754/avb200978040643

- KIM, Byung-Soo, C. E. BAEZ a A. ATALA. 2000. Biomaterials for tissue engineering. *World Journal of Urology* [online], roč. 18, č. 1, s. 2–9. Dostupné z: doi:10.1007/s003450050002
- KLEE, D. a H. HÖCKER. 2000. *Polymers for Biomedical Applications: Improvement of the Interface Compatibility.*, roč. 149. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000
- KOČÁREK, E. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2004, 211 s. ISBN 8071833266.
- KOOLMAN, J. a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012, xiv, 498 s. ISBN 978-80-247-2977-0.
- KUČEKOVÁ, Z., Mlček J., P. Humpolíček, O. Rop, P. Valášek a P. Sáha. Phenolic compounds from *Allium schoenoprasum*, *Tragopogon pratensis* and *Rumex acetosa* and their antiproliferative effects. *Molecules* 2011, 16, 9207-9217; Dostupné z: doi:10.3390/molecules16119207
- KURITA, K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* [online], roč. 8, č. 3, s. 203–26. [vid. 4. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1007/s10126-005-0097-5
- LEE, S. a D. HENTHORN. *Materials in biology and medicine*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2012, xiv, 246 s. ISBN 978-1-4398-8169-9.
- LODISH, H. F. *Molecular cell biology*. 7th ed. New York: W. H. Freeman & Company, 2013, xxxiii, 1154, [58] s. ISBN 978-1-4292-3413-9.
- LOCHMANN, O.. *Nežádoucí účinky antiinfekčních léčiv*. Vyd. 1. V Praze: Triton, 2008, 243 s. ISBN 978-80-7387-073-7.
- LÜLLMANN, H., K. MOHR a L. HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 3., české. Praha: Grada, 2007, 372 s. ISBN 978-80-247-1672-5.
- LÜLLMANN, H., K. MOHR a M. WEHLING. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, 725 s. ISBN 80-247-0836-1.

- MOKREJŠ, P. a F. LANGMAIER. *Aplikace přírodních polymerů*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008, 90 s. ISBN 978-80-7318-674-6.
- MURPHY, D. B. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. New York: Wiley-Liss, 2001, xii, 368 s. ISBN 0-471-25391-x
- MURRAY, R. K. *Harperova biochemie*. Vyd. v ČR 4., V H & H 3. Praha: H & H, 2002, ix, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- NAIR, L. S. a C. T. LAURENCIN. 2006. Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery. [online], č. October 2005, s. 47–90. Dostupné z: doi:10.1007/b137240
- NEČAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3., přeprac. vyd. Jinočany: H & H, 2000, 554 s. ISBN 8086022463.
- PANKEY, G. a L. D. SABATH. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* [online], roč. 38, č. 6, s. 864–70. Dostupné z: doi:10.1086/381972
- PARK, J. B. a R. S. LAKES. *Biomaterials: an introduction*. 3rd ed. New York: Springer, c2007, xi, 561 s. ISBN 978-0-387-37879-4.
- PULEO, D. A. a R. BIZIOS. *Biological interactions on materials surfaces: understanding and controlling protein, cell, and tissue responses*. Dordrecht: Springer, c2009, xx, 429 s. ISBN 978-0-387-98160-4.
- RAMAKRISHNA, S. *Biomaterials: a nano approach*. Boca Raton: CRC Press, c2010, xxii, 350 s. ISBN 978-1-4200-4781-3.
- RATNER, B. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, c2004, xii, 851 s. ISBN 0-12-582463-7.
- RULÍK, M. *Mikrobiální biofilmy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, 447 s. ISBN 978-80-244-2747-8.

- RUSZCZAK, Z. 2003. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online], roč. 55, č. 12, s. 1679–1698. [vid. 25. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2003.08.007
- SANO, A., M. MAEDAA, S. NAGAHARAA, T. OCHIYAB, K. HONMAC, H. ITOHC, T MIYATAY a K. FUJIOKA. 2003. Atelocollagen for protein and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online], roč. 55, s. 1651-1677. [vid. 25. March 2013]. Dostupné z doi:10.1016/j.addr.2003.08.005
- SEBENDA, J. a M. HUDLICKY. 1999. Otto Wichterle (1913-1998): The father of soft contact lenses. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online], roč. 37, č. 9, s. 1221–1223. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1099-0518(19990501)37:9<1221::AID-POLA1>3.0.CO;2-C
- SEO, S., D. PH, Y. CHOI a T. AKAIKE. 2006. Alginate / Galactosylated Chitosan / Heparin Scaffold As a., roč. 12, č. 1.
- SHI, D. *Biomaterials and tissue engineering*. 1st ed. Berlin: Springer, 2004, xi, 246 s. ISBN 3-540-22203-0.
- SCHINDLER, J. *Ze života bakterií*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2008, 143 s., [16] s. obr. příl. ISBN 978-80-200-1666-9.
- SILVER, F. H. a D. L. CHRISTIANSEN. *Biomaterials science and biocompatibility*. New York: Springer, c1999, x, 342 s. ISBN 0-387-98711-8.
- SIONKOWSKA, A. 2011. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science* [online], roč. 36, č. 9, s. 1254–1276. [vid. 3. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003
- SIONKOWSKA, A., J. SKOPINSKA-WISNIEWSKA a M. WISNIEWSKI. 2009. Collagen–synthetic polymer interactions in solution and in thin films. *Journal of Molecular Liquids* [online], roč. 145, č. 3, s. 135–138. [vid. 25. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2008.06.005
- SNUSTAD, D., M. J. SIMMONS, J. RELICHOVÁ a J. G. MENDEL. *Genetika*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2009, xxi, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

- SPRING, K. R. 2003. Fluorescence Microscopy. [online], Dostupné z: doi:10.1081/E-EOE
- ŠMARDA, J. *Genetika pro gymnázia*. 1. vyd. Praha: Fortuna, 2003, 143 s. ISBN 80-7168-851-7.
- THARANATHAN, R. N. 2005. Starch--value addition by modification. *Critical reviews in food science and nutrition* [online], roč. 45, č. 5, s. 371–84. Dostupné z: doi:10.1080/10408390590967702
- TIAN, H., Z. TANG, X. ZHUANG, X. CHEN a X. JING. 2012. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science* [online], roč. 37, č. 2, s. 237–280. [vid. 28. February 2013]. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004
- ULERY, B. D., L. S. NAIR a C. T. LAURENCIN. 2011. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *Journal of polymer science. Part B, Polymer physics* [online], roč. 49, č. 12, s. 832–864. [vid. 7. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1002/polb.22259
- VAN HEST, J. C. M. 2007. Biosynthetic-Synthetic Polymer Conjugates. *Polymer Reviews* [online], roč. 47, č. 1, s. 63–92. [vid. 8. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1080/15583720601109578
- VASCONCELOS, A., G. FREDDI a A. CAVACO-PAULO. 2009. Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules* [online], roč. 10, č. 4, s. 1019. Dostupné z: doi:10.1021/bm9002927
- VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
- VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, xxii, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- *Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154)*. Molecular Probes, 2002. Dostupné z URL: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp13154.pdf>
- WANG, X., Y. XIA, L. LIU, M. LIU, N. GU, H. GUANG a F. ZHANG. 2010. Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of

cytotoxicity of five prosthodontic materials. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* [online], roč. 95, č. 2, s. 357–64. [vid. 28. February 2013]. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.31723

- WHITFORD, D. *Proteins: structure and function*. Hoboken, NJ: J. Wiley & Sons, c2005, xiv, 528 s. ISBN 0-471-49893-9.
- WILLIAMS, D. F. 2003. Biomaterials and tissue engineering in reconstructive surgery., roč. 28, č. August, s. 563–574
- ZHANG W., P. K. CHU, J. JI, Y. ZHANG, R. K.Y. FU a Q. YAN. Antibacterial properties of plasma-modified and triclosan or bronopol coated polyethylene. *Polymer* 2006 [online], 47, 931-937. [vid. 23. May 2013]. Dostupné z 10.1016/j.polymer.2005.12.009

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BzCl	Benzylchlorid	Benzyl chloride
ECM	Extracelulární matrix	Extracellular matrix
FAD	Správa jídla a léčiv	Food and Drug Administration
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PE	Polyethylen	Polyethylene
PET	Polyethylentereftalát	Polyethylene terephthalate
PGA	Polyglykolová kyselina	Poly(glycolic acid)
PLA	Polymléčná kyselina	Poly(lactid acid)
PMMA	Polymethylmethakrylát	Polymethyl methacrylate
rpm	Otáčky za minutu	Revolutions per minute

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Strukturní vzorec celulózy (Nair, Laurencin 2006).....	16
Obrázek 2 – Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové (Nair, Laurencin 2006).....	17
Obrázek 3 – Fibroblast v pojivové tkáni (Alberts et al. 2004).....	22
Obrázek 4 – Schéma molekuly kolagenu (Sano 2003).....	24
Obrázek 5 – Organizace a struktura kolagenu (Alberts et al. 2004).....	25
Obrázek 6 – Růst minerálů na vláknech kolagenu (Ferreira et al. 2012).....	27
Obrázek 7 – Antibakteriální aktivita (Albritton et al. 2008).....	30
Obrázek 8 – Princip vzniku a vývoje biofilmu (Rulík et al. 2011).....	33
Obrázek 9 – Zásobní láhev média (Invitrogen protocol)	34
Obrázek 10 – Linerární závislost viability buněk a absorpance (Vybrant Protocol, 2002).....	36
Obrázek 11 – Princip fluorescence (Ishikawa-Ankerhold et al. 2012).....	38
Obrázek 12 – Ukázka připraveného kolagenového filmu.....	40
Obrázek 13 – Ukázka buněčné linie HaCaT.....	41
Obrázek 14 – Struktura barviva Hoechst (Invitrogen protocol, 2005).....	43
Obrázek 15 – Emisní a excitační spektrum barviva Hoechst	44
Obrázek 16 – Princip diskové difúzní metody (Hudzicki, 2009)	45
Obrázek 17 – Výsledné snímky fluorescenční mikroskopie.....	50
Obrázek 18 – Ilustrativní vzorky podrobené antibakteriálnímu testu.....	51

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1- Viabilita buněk kultivovaných za přítomnosti účinných antibakteriálních látek v různých koncentracích	47
Tabulka 2 - Viabilita buněk kultivovaných za přítomnosti extraktu <i>Allium schoenoprasum</i> v různých koncentracích.....	49
Tabulka 3 – Výsledky antibakteriálního testu polyfenolických látek	52

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Cytotoxicita kolagenových filmů s antibakteriálními látkami.....	46
Graf 2 - Cytotoxicita kolagenových film s extraktem <i>A. schoenoprasum</i>	48