

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

NAVÁZÁNÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK NA KRYTY RAN
Z KYSELINY HYALURONOVÉ

Bc. Kateřina Horešovská

Diplomová práce

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

BINDING OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES TO
HYALURONIC ACID WOUND DRESSINGS

Bc. Kateřina Horešovská

Diploma Thesis

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Horešovská**
Osobní číslo: **C17529**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Technologie organických specialit**
Název tématu: **Navázání biologicky aktivních látek na kryty ran z kyseliny hyaluronové**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Literární rešerše v oblasti zvláknění a přípravě krytů ran z kyseliny hyaluronové, způsoby navázání biologicky aktivní látky a další možné modifikace krytů ran pro zlepšení mechanických a biologických vlastností.
2. Navázání vybraných biologicky aktivních látek na staplová mikrovlákna z kyseliny hyaluronové, vývoj metody fixace na vlákno a vývoj metody pro detekci.
3. Sepsání diplomové práce.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Radim Hrdina, CSc.

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce:

28. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

10. května 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10.5.2019

Bc. Kateřina Horešovská

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. Ing. Radimovi Hrdinovi, CSc. za vedení, cenné rady a připomínky při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za stanovení biologické aktivity krytů ran a doc. Ing. Anně Krejčové, Ph.D. za stanovení obsahu stříbra a zinku v krytech. Děkuji rovněž Centru materiálů a nanotechnologií za provedení SEM analýzy za finanční podpory MŠMT a Evropské unie prostřednictvím projektů LM2015082, a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001829. Poděkovat bych chtěla i Ing. Fouzy Ramadan Ali Alafid za pomoc v laboratoři a praktické rady, doc. Ing. Ladislavu Burgertovi, CSc. za pomoc při zpracovávání krytů. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině, která mi umožnila studium a po celou dobu mi byla velkou oporou.

Anotace:

Tato diplomová práce je věnována krytům ran z kyseliny hyaluronové. V první části jsou zhodnoceny dosavadní poznatky o kyselině hyaluronové, jejích vlastnostech a možnostech jejího zvláknování. V této části jsou uvedeny i typy a vlastnosti krytů ran použitelných v lékařské praxi, typy ran a průběh procesu hojení rány. Druhá část této práce je věnována přípravě krytů a jejich modifikací z kyseliny hyaluronové, na které jsou poté různými metodami navazovány biologicky aktivní látky. Kryty jsou posléze vyhodnoceny na antimikrobiální účinnost, proti klasickým bakteriím. Množství navázané aktivní látky je vyhodnoceno za pomoci analytických metod.

Klíčová slova: vlákna z kyseliny hyaluronové, biologicky aktivní látky, kryty ran, mokré zvláknování, antimikrobiální účinnost, staplová vlákna

Annotation

This diploma thesis is focused to wound dressing from hyaluronic acid. In the first part, knowledge about hyaluronic acid, properties and possibilities of spinning are collected. This part also includes information about types and properties of wound dressings used in medical practice, types of wounds and how the wound healing process works. The second part of this work is focused to the preparation of wound dressings and their modifications from hyaluronic acid. Biologically active substances are then fixed on these dressings by a different methods. Dressings are afterwards evaluated for antimicrobial activity against typical bacteria. The amount of fixed active substance is evaluated using analytical methods.

Keywords: fiber from hyaluronic acid, wound healing covers, wet spinning, antimicrobial activity, staple fibers

Obsah

1	Teoretická část.....	13
1.1	Kryty ran	13
1.1.1	Historie.....	13
1.1.2	Současný přístup.....	15
1.1.3	Rozdělení moderních krytů ran	16
1.1.4	Kontrolovaný systém pro dodávání léčivé látky	22
1.2	Hojení ran	24
1.2.1	Klasifikace ran	24
1.2.2	Fáze procesu hojení	25
1.2.3	Faktory ovlivňující hojení ran.....	28
1.2.4	Faktory zhoršující hojení.....	29
1.3	Kyselina hyaluronová.....	30
1.3.1	Výskyt.....	30
1.3.2	Fyzikálně-chemické a strukturní vlastnosti.....	31
1.3.3	Výroba.....	33
1.3.4	Farmakokinetika	33
1.3.5	Degradace a eliminace.....	33
1.3.6	Možnosti modifikace HA.....	34
1.3.7	Role HA při hojení ran.....	36
1.3.8	Zvláknění kyseliny hyaluronové	37
1.3.9	Rozdělení vláken	40
1.3.10	Vytvořeno na Fakultě chemicko-technologické, Univerzita Pardubice	42
1.3.11	Contipro a.s.....	45
1.4	Biologicky aktivní látky.....	46
1.4.1	Kanabidiol	46
1.4.2	Kurkumin.....	48
1.4.3	Apigenin	50
1.4.4	Stříbro a zinek	52

2	Experimentální část a získané výsledky	54
2.1	Použité přístroje	54
2.2	Zvláknění kyseliny hyaluronové	55
2.2.1	Postup zvláknění	55
2.2.2	SEM snímky	56
2.3	Acetylace vláken pro kryty ran	58
2.3.1	Postup	59
2.3.2	SEM snímky	60
2.3.3	NMR spektra	62
2.4	Syntéza Apigeninu	64
2.4.1	Postup přípravy	64
2.5	Navázání biologicky aktivních látek	65
2.5.1	Postup pro proces namáčení	65
2.5.2	Postup pro proces nástřik	65
2.5.3	Postup pro proces kapičkování	67
2.5.4	Optická detekce biologicky aktivní látky (CBD a kurkuminu)	68
2.5.5	Navázání stříbra a zinku	68
2.6	Vyhodnocení navázaného množství aktivních látek	70
2.6.1	Kalibrační křivka CBD a kurkuminu	70
2.6.2	Vyhodnocení kanabidiolu a kurkuminu	73
2.6.3	Výsledky vyhodnocování kanabidiolu a kurkuminu	74
2.6.4	Vyhodnocení stříbra a zinku	83
2.7	Stanovení biologické aktivity krytů ran	85
3	Závěr	92
4	Budoucí práce	93
5	Seznam literatury	94

Seznam ilustrací, tabulek a grafů:

Obrázek 1- Hydrokoloidní krytí ^[21]	17
Obrázek 2 - Hydrogelové kryty ran ^[29]	19
Obrázek 3 - Pěnové obvazy ^[31]	20
Obrázek 4 - Kryt ran s aktivním stříbrem ^[39]	22
Obrázek 5 - Fáze hojení ran ^[61]	26
Obrázek 6 - Struktura kyseliny hyaluronové.....	30
Obrázek 7 - Struktura HA se znázorněnými vodíkovými vazbami ^[87]	32
Obrázek 8 - Variace mokrého zvlákňování ^[110]	38
Obrázek 9 - Sestava pro electrospinning ^[117]	39
Obrázek 10 - Sestava pro electro-blowing ^[112]	40
Obrázek 11 - Porovnání mikrovlákn a nanovlákn ^[122]	42
Obrázek 12 - Porovnání lidského vlasu a nanovlákn ^[123]	42
Obrázek 13 - Struktura CBD a THC.....	46
Obrázek 14 - Struktura kurkuminu	48
Obrázek 15 - Metabolizace kurkuminu ^[142]	49
Obrázek 16 - Struktura Apigeninu	50
Obrázek 17 - Biosyntéza Apigeninu ^[148]	51
Obrázek 18 - Kryt ran ze staplových mikrovlákn z HA	56
Obrázek 19 – SEM, staplové vlákno nativní HA 200 µm.....	56
Obrázek 20 – SEM, staplové vlákno nativní HA 20 µm.....	57
Obrázek 21 – SEM, staplové vlákno nativní HA 2 µm.....	57
Obrázek 22 – Struktura HA se zaměřením na amidovou skupinu	58
Obrázek 23 - Kryt ran z acetylovaných staplových vlákn HA	59
Obrázek 24 - Kryt ran ze silně acetylovaných staplových vlákn HA.....	60
Obrázek 25 - Nativní (vlevo) a acetylovaná (vpravo) staplová vlákna HA 200 µm	60
Obrázek 26 - Nativní (vlevo) a silně acetylovaná (vpravo) staplová vlákna HA 200 µm.....	61
Obrázek 27 - Nativní (vlevo) a acetylovaná (vpravo) staplová vlákna HA 20 µm	61
Obrázek 28 - Nativní (vlevo) a silně acetylovaná (vpravo) staplová vlákna HA 20 µm.....	62
Obrázek 29 - NMR spektrum nativní HA (prášek).....	62
Obrázek 30 - NMR spektrum acetylované HA (kryt rozpuštěn)	63
Obrázek 31 - NMR spektrum silně acetylované HA (kryt rozpuštěn)	63
Obrázek 32 - Oxidace naringenin na apigenin.....	64
Obrázek 33 - Sloupcová kolona (apigenin)	64
Obrázek 34 - Rozprašovač s balonkem ^[160]	66
Obrázek 35 - Rozprašovací tryska (technologie v praxi) ^[161]	66
Obrázek 36 - Detail inkoustové trysky ^[162]	67
Obrázek 37 - Uspořádání vlákn se stříbrem ^[163]	68
Obrázek 38 - Schéma krytu ran ze tří vrstev.....	69
Obrázek 39 - Emisní spektrum kurkuminu	72
Obrázek 40 - Excitační spektrum kurkuminu.....	73
Obrázek 41 - Technika namáčení po 1 hodině	75
Obrázek 42 - Technika namáčení po 3 hodinách.....	76
Obrázek 43 - Technika namáčení po 5 hodinách.....	76

Obrázek 44 – SEM, staplová vlákna HA s CBD (kapičkování) 200 μm	81
Obrázek 45 – SEM, staplová vlákna HA s CBD (kapičkování) 20 μm a 2 μm	81
Obrázek 46 – SEM, staplová vlákna s CBD a kurkuminem (kapičkování) 200 μm	82
Obrázek 47 – SEM, staplová vlákna s CBD a kurkuminem (kapičkování) 20 μm a 2 μm	82
Obrázek 48 - Porovnání barvy krytu se stříbrem a zinkem.....	84
Obrázek 49 - SEM snímek staplových vláken s vrstvou stříbra a vrstvou aktivní látky 20 μm	84
Obrázek 50 - SEM snímek staplových vláken s vrstvou stříbra a vrstvou aktivní látky 200 μm	85
Obrázek 51 - Antimikrobiální testování, HA a Escherichia coli.....	87
Obrázek 52 - Antimikrobiální testování, HA+CBD a Escherichia coli	88
Obrázek 53 - Antimirkobiální testování, HA+CBD a Escherichia coli	88
Obrázek 54 - Antimikrobiálního testování, HA+CBD+kurkumin a Escherichi coli	89
Obrázek 55 - Antimikrobiální testování, HA+CBD+kurkumin a Staphylococcus aureus.....	89
Obrázek 56 - Antimikrobiálního testování, HA+CBD+kurkumin+Ag a Staphylococcus aureus	90
Obrázek 57 - Antimikrobiálního testování, HA+CBD+Ag a Staphylococcus aureus.....	90
Obrázek 58 - Antimikrobiálního testování, HA+CBD+Ag a Candida albicans	91
Tabulka 1 - Vyhodnocení množství CBD navázaného namáčením	75
Tabulka 2 - Vyhodnocené množství navázaných aktivních látek nástřikem.....	77
Tabulka 3 - Vyhodnocení množství navázaných látek nakapáním	79
Tabulka 4 - Zhodnocení celkové úspěšnosti	80
Tabulka 5 - Výsledky antimikrobiálního testování.....	86
Graf 1 - UV/Vis spektrum kanabidiolu	70
Graf 2 - Kalibrační křivka kanabidiolu	71
Graf 3 - UV/Vis spektrum kurkuminu	71
Graf 4 – Kalibrační křivka kurkuminu.....	72
Graf 5 - Množství CBD navázané namáčením.....	74
Graf 6 - Množství CBD navázaného nástřikem	77
Graf 7 - Množství CBD navázané nakapáním.....	78

Seznam použitých zkratk:

TDDS (transdermal delivery system) - nosič léčivé látky pro transdermální použití

HA (hyaluronic acid) – kyselina hyaluronová

HDA dialdehyd hyaluronové kyseliny

LDL (low density lipoprotein) – nízkodenzitní lipoprotein

CBD (cannabidiol) – kanabidiol

THC (tetrahydrocannabinol) - delta-9-tetrahydrokanabinol

GIT gastrointestinální trakt

IPA propan-2-ol

Úvod

Napříč celou historií můžeme nalézt různé variace, které se používaly k léčení ran. Od dob obětování bohům jsme se v historii posunuli dále, začali zkoumat lidské tělo a možnosti jeho léčení jinými než duchovními praktikami. Stejně tak, jako se vyvíjela civilizace, vyvíjely se i materiály a technologie léčení ran. Fantazii se meze nekladly, a díky pokroku bylo vyvinuto více než 3000 produktů pro léčbu různých typů ran, které se liší tím, že se zaměřují na různé aspekty hojivého procesu. Je to velká rozmanitá skupina přírodních i synteticky připravených látek.^[1]

Na základě předešlých znalostí v oblasti kyseliny hyaluronové a jejího zvláknování na Ústavu organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, které se ústav věnuje již přes 15 let, byla v rámci této diplomové práce dále zkoumána problematika navázání biologicky aktivních látek na staplová mikrovlákná z kyseliny hyaluronové, resp. hyaluronanu sodného. Kyselina hyaluronová se v této práci díky svým unikátním vlastnostem stala nosným materiálem (krytem ran) pro biologicky aktivní látky, které by mohly posloužit pro usnadnění hojení určitých typů špatně hojitelných ran.

Na námi vytvořené kryty ran byly různými metodami navázány biologicky aktivní látky a následně se zkoumalo zachycené množství na krytu. Pod vedením Ing. Ivety Brožkové, Ph.D. na katedře biologických a biochemických věd FCHT Univerzity Pardubice byly otestovány kryty s obsahem biologicky aktivní látky na jejich antimikrobiální účinek. Výsledky jsou důležité pro potvrzení antimikrobiálního účinku, ale také pro správnou optimalizaci účinku celého krytu.

1 Teoretická část

1.1 Kryty ran

1.1.1 Historie

Nejstarší dochovaný záznam léčby ran byl nalezen na hliněných tabulkách v Mezopotámii v období 2500 před naším letopočtem. V této době péče o rány fungovala na principu pokus a omyl a to za použití primitivních starodávných technik. ^[2]

Ve starobylém Egyptě byla péče o rány duchovní praktikou, léčitelé byli přesvědčeni, že otevřená rána byla vstupní bod pro špinavé subjekty, a proto vyžadovala použití repelentu ve formě stolice od oslů. Rána musela být zabalena, aby byla zajištěna celistvost ducha člověka. Ačkoli byl tento postup nechutný, stolice obsahovala řadu antibiotických látek a proteinů (například trypsin), které pomáhali při léčbě. ^[3]

Ve starověkém Řecku byla situace jiná, zde největší lékař starověku Hippokratés používal pro otevřené rány především víno a ocet. V těchto tekutinách vyvařil vlnu a dále ji používal jako obyčejnou gázu. I ve slavném eposu od Homéra jsou popsány způsoby, jakými se léčila zranění z bitev. ^[4]

Zajímavý pohled na léčení ran můžeme vidět i v čínské historii. Jejich holistický přístup k léčení, zajišťoval jakousi souhru mezi léčením fyzické i duchovní stránky. Starobylá Čína se díky tomu může chlubit tisíci možnostmi, jak léčit rány. V nalezených dokumentech se nejčastěji se dočteme o různých postupech většinou zahrnujících bronzové nástroje, zelený čaj, lékořici, nasáklé houby, různé typy anestetik, antiseptik a další bylinné prášky, které byly použity k podpoře hojení, pomoc při debridementu a pomoc při odvrácení infekce. Jako gázu většinou používali nasáklé hedvábí. ^[5]

Jak bylo výše zmíněno, nejčastěji bylo léčení ran prováděno za pomoci upravených gáz. Samotný termín gáza, zahrnuje dva typy materiálů. Prvním typem je tkaná textilie, která je 100% přírodní bavlněnou tkaninou. Druhým typem je netkaná textilie, která se týká modernějších syntetických obvazů. Jsou vyrobené z umělých vláken nebo směsí syntetických vláken.

U tkaných gáz můžeme nalézt hned několik problémů. Textilie se při výrobním procesu zpracovává pomocí řezů. Nedokonalé řezy způsobují otřepy materiálu a tyto otřepy mohou zůstat v loži rány ve chvíli, kdy jsou gázy odstraněny. Tyto otřepy jsou absorbentní a mají tendenci se držet na ráně, což má za následek trauma po odstranění. Tkané gázy způsobují, že rychle rána vysychá a látka je tudíž zachycena do rány.^[6] Až donedávna se považovala suchá rána za optimální pro hojení a odstranění vloženého suchého materiálu bylo považováno za formu fyzického debridementu. Zvrat přišel až v šedesátých letech dvacátého století, kdy byla prezentována práce Wintera na prasatech, která poukazovala na fakt, že vlhké rány se hojí daleko rychleji a kvalitněji.^{[7][8]}

I přes neselektivní způsob fyzického debridementu, traumatizace poranění rány a výsledné bolesti, je suchá gáza stále nejpoužívanější na světě.^[9]

Problémy s přilnavostí obvazů na ránu se začaly blíže zkoumat během první světové války. Společnost Lumiere začala vyrábět první nepřilnavé obvazy, které byly spojením dvou vrstev. První vrstva byla bavlněné pletivo obsahující parafin a balzám pro kontakt s ránou, zatímco druhá obsahovala gázu, která zajišťovala odvodnění.^[10]

Tento vícevrstvý formát nadále tvoří základ pro dnešní použití, každá vrstva má na starosti specifické funkce. Zpravidla jedna vrstva slouží pro mechanickou integritu a druhá vrstva pro absorpci tekutiny.

Dalším velkým pokrokem bylo během druhé světové války využití sterilizovaného celofánu (ve kterém se převážely transfuze). Sterilizovaný celofán výborně fungoval na rány způsobené popálením a na hluboké řezné rány. Velkou výhodou bylo také to, že sterilizovaný celofán byl polopropustný pro vodu. Rány se hojily rychleji a bolest ustoupila hned po několika hodinách od aplikace takto upraveného celofánu.^[11] Během druhé světové války byly použity i další materiály, mezi něž patřily materiály adherentní, neporézní, plastifikované, polyvinylové, polymerní fólie spojené s polštářky z bavlny v první pomoci.

Současné semipermeabilní fólie umožňují výměnu plynů, vody a zabraňují migraci bakterií do rány. Běžně používaným příkladem může sloužit značka BANDAID[®], která začala vyrábět adhezivní obvazy v roce 1920 poté, co zaměstnanec společnosti Johnson & Johnson, Earle Dickson, vyrobil prototypový obvaz, který jeho

ženě umožnil péči o rány bez pomoci lékaře. V roce 1938 pak představil Johnson & Johnson sterilní obvazy. ^[12]

1.1.2 Současný přístup

Primární funkcí moderních obvazů na rány je především usnadnění hojení rány, než jeho pokrytí. Tyto obvazy jsou zaměřeny na udržení rány před dehydratací a na podporu hojení. Na základě příčiny a typu rány jsou na trhu k dispozici četné produkty, což činí výběr velmi obtížným úkolem. Moderní obvazy na rány jsou obvykle založeny na syntetických polymerech a jsou klasifikovány jako pasivní, interaktivní a bioaktivní produkty.

Pasivní produkty jsou neokluzivní, mezi něž patří gázové obvazy a tylové obvazy, které se používají k zakrytí rány. Interaktivní obvazy jsou semi-okluzivní nebo okluzivní, dostupné ve formě filmů, pěny, hydrogelu a hydrokoloidů. Tyto obvazy působí jako bariéra proti pronikání bakterií do prostředí rány, ale zároveň slouží jako permeabilní membrána pro vodu. ^{[13][14]}

Vlastnosti, ideálního krytu ran:

- Schopnost udržet vlhkost v místě poranění.
- Odstranění přebytečného exsudátu.
- Bez částic a toxických kontaminantů.
- Netoxické a nealergenní.
- Možnost ochrany rány před dalším traumatem.
- Odstranění, aniž by došlo k úrazu rány.
- Nepropustný pro bakterie.
- Tepelná izolace.
- Umožňující výměnu plynů.
- Pohodlné a přizpůsobivé.
- Nákladově efektivní.
- Dlouhá životnost. ^[15]

1.1.3 Rozdělení moderních krytů ran

Obvazy se klasifikují řadou způsobů v závislosti na jejich funkci v poranění (debridement, antibakteriální, absorpční, adhezivní), typu materiálu použitého k výrobě obvazu (např. hydrokoloid, alginát, kolagen) nebo dle fyzikální formy obvazu (mast, film, pěna, gel).

Obvazy se dále dělí na primární, sekundární a ostrovní obvazy. Obvazy, které jsou fyzicky v kontaktu s povrchem rány, se označují jako primární. Ty jsou dále pokryty sekundárními obvazy. Ostrovní obvazy mají centrální absorpční oblast, která je obklopena adhezivní částí.

Mezi další klasifikační kritéria patří tradiční obvazy, moderní obvazy, produkty pro náhradu kůže a zařízení pro hojení ran.

Kritéria klasifikace mohou být užitečná při výběru daného obvazu, problémem v rozhodování může být fakt, že mnoho obvazů splňuje vícero kritérií najednou.

V této práci budou moderní obvazy rozděleny dle typu materiálu (hydrokoloid, alginát, hydrogel), který byl použit pro výrobu obvazu a jeho fyzické formy (fólie, pěny).^{[16][17]}

1.1.3.1 Hydrokoloidní kryty ran

Hydrokoloidní obvazy patří mezi nejpoužívanější interaktivní obvazy. Pojem „hydrokoloid“ popisuje skupinu produktů pro léčbu ran získaných z koloidních materiálů (gelových činidel) kombinovaných s jinými materiály, jako jsou elastomery a lepidla. Jsou tedy tvořeny dvěma vrstvami - vnitřní koloidní vrstvou a vnější propustnou vrstvou pro vodu. Typická činidla tvořící gel zahrnují karboxymethylcelulosu (CMC), želatiny a pektin.

Hydrokoloidní obvazy jsou klinicky užitečné, protože na rozdíl od jiných obvazů ulpívají na vlhkých i suchých místech. Mají vynikající vlastnosti jako je nepropustnost pro vodní páru, nepropustnost pro bakterie a mají výborné vlastnosti debridementu. Tyto typy obvazů se používají pro lehké až mírně exsudující rány, jako jsou otlaky, drobné popáleniny a traumatické poranění. Používají se také k léčbě vředů na nohou, kde se zdá, že nefungují klasické metody léčení.^{[18][19]}

Hydrokoloidní obvazy se často doporučují v pediatrické léčbě a to hlavně díky absenci bolesti při odstraňování krytu. Tato schopnost je dána vytvořením gelu ve chvíli,

kdy se hydrokoloidní kryt stýká s exsudátem rány. Vytváří se vlhké prostředí, které, jak už bylo několikrát výše zmíněno, pomáhá s hojením. Velikou výhodou pro pacienty je také to, že s hydrokoloidním krytem nemusí mít obavy z kontaminace při denních hygienických úkonech. Při speciálních léčbách, jako je třeba vřed diabetické nohy, je nutná častá kontrola. ^{[15][20]}

Příklady hydrokoloidních obvazů zahrnují Granuflex™ a Aquacel™ (Conva Tec, Hounslow, UK), Comfeel™ (Coloplast, Peterborough, UK) a Tegaderm™ (3M Healthcare, Loughborough, UK). Vyskytují se ve formě tenkých vrstev a fólií nebo jako kompozitní obvazy v kombinaci s jinými materiály, jako jsou algináty.



Obrázek 1- Hydrokoloidní krytí ^[21]

1.1.3.2 Alginátové kryty ran

Alginátové obvazy se vyrábějí z vápenatých a sodných solí kyseliny alginové, což je polysacharid obsahující jednotky kyseliny manuronové a kyseliny guluronové. Obvazy se vyskytují buď ve formě lyofilizovaných porézních listů (pěn) nebo jako pružná vlákna, která jsou speciálně využívána pro rány.

Použití alginátů jako obvazů vychází především z jejich schopnosti tvořit gely, a to díky přímému kontaktu s exsudáty rány. Mohou absorbovat 15 až 20 násobek své hmotnosti tekutin a jsou vhodné pro vysoce exsudující rány. Vysoká absorpce probíhá prostřednictvím silné tvorby hydrofilního gelu, který vzniká díky výměně mezi ionty přítomné v alginátovém vlákně a ionty přítomné v exsudátu. Vrstva gelu omezuje sekreci ran a minimalizuje bakteriální kontaminaci. ^{[15] [22] [23]} Pomáhá také udržovat optimální obsah vlhkosti a teplotu hojení.

Schopnost vápenatých iontů vytvářet síťové vazby polymeru kyseliny alginové činí obvazy alginátu vápenatého ideálním materiálem jako základ pro tkáňové inženýrství.^[24] Ionty vápníku hrají fyziologickou roli při mechanismu srážení během prvního stupně hojení ran, proto je uvolňování těchto iontů z alginátových ob vazů velice výhodné.^[25]

Vlákna, které se zachytí v ráně, jsou snadno biologicky odbouratelné a mohou být vyčištěny fyziologickým roztokem. Následné odstranění proto nezničí granulační tkáň, takže změna obvazu je prakticky bezbolestná.^[26] Vzhledem k tomu, že alginátové obvazy vyžadují účinnou hodnotu vlhkosti, nemohou být použity pro suché rány a rány, které jsou pokryty tvrdou nekrotickou tkání. To proto, že by mohly ránu dehydratovat a oddálit hojení, což je jejich hlavní nevýhodou.^[15]

Algináty bohaté na mannuronát, jako je SorbsanTM (Maersk, Suffolk, UK), tvoří při hydrataci měkké ohebné gely, zatímco ty, které jsou bohaté na kyselinu guluronovou, jako je KaltostatTM (Conva Tec), tvoří po absorpci exsudátu rány pevnější gely. Některé obsahují vlákninu alginátu vápenatého, jako je TegagenTM (3M Healthcare). Comfeel PlusTM je kombinovaný hydrokoloidní / alginátový obvaz.

1.1.3.3 Hydrogelové kryty ran

Hydrogely jsou nerozpustné, botnavé, hydrofilní materiály vyrobené ze syntetických polymerů, jako jsou polymetakryláty a polyvinylpyrrolidin. Některé obvazy jako Nu-gelTM (Johnson & Johnson, Ascot, UK) a PurilonTM (Coloplast) jsou kombinace hydrogel / alginát.

Hydrogely mohou být aplikovány buď jako amorfni gel nebo jako elastické, pevné listy nebo fólie. Pro přípravu fólií jsou polymerní složky zesíťovány tak, že fyzicky zachycují vodu. Listy mohou po kontaktu s hnisavými ranami absorbovat a zadržovat značný objem vody. Ve chvíli kdy se aplikují na ránu jako gel nebo hydrogelové obvazy obvykle vyžadují sekundární pokrytí, jakou je například gáza, a musí být často měněny. Listy však sekundární krytí nepotřebují.^[27]

Hydrogelové obvazy obsahují značné množství vody (70–90%) a v důsledku toho nemohou absorbovat mnoho exsudátu. Z tohoto důvodu se používají pro lehké až středně vyzářující rány. Akumulace tekutin může vést k maceraci kůže a bakteriální proliferaci, která způsobuje zápach v infikovaných ranách. Hydrogely mají nízkou mechanickou pevnost, a proto je obtížné s nimi manipulovat.^[27]

Jsou vhodné pro čištění suchých nebo nekrotických ran rehydratací mrtvých tkání a zvýšení debridementu. Hydrogelové obvazy jsou nereaktivní s biologickou tkání, propustné pro metabolity a jsou nedráždivé.^[28] Hydrogely také podporují vlhkost hojení, jsou nepřilnavé a chladí povrch rány, což může vést k výraznému snížení bolesti, a proto má vysokou přijatelnost pro pacienta.



Obrázek 2 - Hydrogelové kryty ran^[29]

1.1.3.4 Pěnové kryty ran

Pěnové obvazy jsou vyráběny buď jako polyuretanová nebo silikonová pěna. Přenášejí páry vlhkosti, kyslík a poskytují tepelnou izolaci lůžku rány. Polyuretanové pěny se skládají ze dvou nebo tří vrstev, včetně hydrofilního kontaktního povrchu rány a hydrofobního podkladu, což je činí vysoce savými. Vrstvy také zabráňují přilnutí, když je rána suchá, nadměrné ztrátě tekutin, bakteriálnímu poškození či kontaminaci.^{[30][15]}

Pěnové obvazy udržují vlhké prostředí kolem rány, zajišťují tepelnou izolaci a jsou vhodné pro nošení. Jsou vysoce savé, absorbance je řízena vlastnostmi pěny, jako je textura, tloušťka a velikost pórů. Struktura otevřených pórů také poskytuje vysokou rychlost přenosu vlhkosti par.

Používají se jako primární obvazy na rány pro absorpci a izolaci. Sekundární obvaz se obvykle nevyžaduje. Pěnové obvazy nejsou vhodné pro suché epitelizační rány nebo suché jizvy, protože se na rozdíl od polymerních fólií spoléhají na exsudáty, aby se dosáhlo optimálního prostředí pro hojení ran.^[30]



Obrázek 3 - Pěnové obvazy ^[31]

1.1.3.5 Bioaktivní kryty ran

Tyto obvazy jsou vyrobeny z biomateriálů, které hrají aktivní roli v procesu hojení ran. Bioaktivní obvazy na hojení ran zahrnují také produkty tkáňového inženýrství získané z přírodních tkání nebo umělých zdrojů. ^[32]

Polymery jako jsou kolagen, kyselina hyaluronová, chitosan, algináty a elastin, mohou v obvazech fungovat samostatně nebo v kombinaci s jiným polymerem. Biomateriály mají tu výhodu, že jsou součástí přirozené tkáňové matrice, jsou biologicky odbouratelné a některé hrají aktivní roli v normálním hojení ran a tvorbě nových tkání. ^[33] Všechny tyto vlastnosti z nich činí atraktivní výběr z biokompatibilního a toxikologického hlediska. Kryt může být také spojen s léčivou látkou, čímž slouží jako systém pro dodávání léčiva.

1.1.3.6 Antimikrobiální kryty ran

Hlavním úkolem těchto krytů je dodání biologicky aktivních látek přímo do rány. Nejlepším příkladem jsou antibiotika nebo antibakteriální látky, které slouží jako prevence nebo boj proti infekcím, zejména u vředů diabetických nohou, chirurgických a úrazových zranění, kde výskyt infekcí může být vysoký v důsledku snížené rezistence způsobené extrémním úrazem. ^[34]

Mezi běžná antibiotika začleněná do obvazů pro dodání přímo do rány patří dialkylkarbamoylchlorid. Další aktivní látkou je stříbro používané ve většině moderních

obvazů. Moderní obvazy impregnované stříbrem, které jsou k dispozici pro léčebnou praxi, zahrnují vláknitý hydrokoloid, polyuretanovou pěnovou fólii a silikonové gely.

Také jód má výbornou schopnost snížit mikrobiologickou zátěž při chronických ranách. Klinicky se používá buď jako povidon-jód (komplex polyvinylpyrrolidon-jód), jodoform (sloučenina jódu spojená s neiontovým povrchově aktivním činidlem), nebo jako jodid karboxylové kyseliny (trojrozměrná škrobová mřížka obsahující 0,9% jódu). Jód má dobré absorpční vlastnosti. Jód se pomalu uvolňuje a podle toho jak se tekutina vstřebává, snižuje se bakteriální zátěž a rána se postupně zbavuje i nečistot. Tento způsob působení usnadňuje dodání a udržení konstantní hladiny jódu v loži rány. ^[15]

Dalšími používanými aktivními látkami jsou gentamycin z kolagenových hub, ofloxacinu ze silikonových gelových listů a minocyklin z obvazů chitosanového filmu. Některé nové antimikrobiální obvazy na hojení ran zahrnují lyofilizované fibrinové disky pro dodání tetracyklinu a systém na bázi kyseliny mléčné. ^{[35][36]}

Dodávání antibiotik do míst lokálního poranění může být výhodnou možností pro systémové podávání z několika důvodů. Jedním z nich může být fakt, že antibiotické dávky potřebné k dosažení dostatečné účinnosti často vedou k toxickým reakcím, jako je kumulativní toxicita aminoglykosidů v uších, ledvinách i v dalších orgánech. ^[37]

Použití obvazů k dodání antibiotik do míst poranění může poskytnout tkáňovou kompatibilitu a nízký výskyt bakterií. Lokální dodávání z obvazů může překonat problém neúčinné systémové antibiotické terapie, která je výsledkem špatného krevního oběhu v končetinách u vředů diabetické nohy. ^[38]



Obrázek 4 - Kryt ran s aktivním stříbrem ^[39]

1.1.3.7 Kryty ran z polymerních látek

Nejmodernější kryty ran jsou vyrobeny z polymerů. Většina z nich slouží jako nosiče pro léčivou látku, zabezpečují dodání léčiva do místa poranění a také její postupné uvolňování. Tato skupina krytů se prolíná i s ostatními skupinami. Pro řízené dodávání léčiva do ran se používají hydrogely, jako je polylaktid-ko-glykolid, polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol, polyhydroxyalkylmethakryláty, polyuretanová pěna, a obvazy na bázi hydrokolidů a alginátu.

Další polymerní kryty vhodné pro dodávání léčiva do ran zahrnují nové formulace připravené z polymerních biomateriálů, jako je kyselina hyaluronová, kolagen a chitosan. I syntetické polymery zde mají své zastoupení a to především kryty sloužící jako botnavé pro řízené dodání léčiv. Můžeme zde zahrnout silikonové gelové listy, kyselinu mléčnou.

1.1.4 Kontrolovaný systém pro dodávání léčivé látky

Jak už bylo výše několikrát zmíněno, kryty ran mohou fungovat jako dodávací systém pro léčivé látky. Řízené uvolňování léčivé látky k danému cíli obecně zahrnuje prodloužení účinku aktivního léčiva v průběhu času tím, že umožňuje kontinuální uvolňování z polymerní dávkové formy. ^[40]

Použití hydrofilních polymerů jako ob vazů s řízeným uvolňováním mohou být vynikajícím prostředkem pro dodávání léků do míst poranění konzistentním a trvalým způsobem po dlouhou dobu léčení bez nutnosti časté výměny ob vazů. ^[41] Takovéto kryty jsou snadno biologicky odbouratelné, a proto jsou snadno dostupné.

Uvolňování léčiva z polymerních formulací je řízeno jedním nebo více fyzikálními postupy, které zahrnují několik procesů:

- Hydrataci polymeru kapalinami.
- Botnání za vzniku gelu.
- Difuzi léčiva přes nabobtnalý gel.
- případnou erozi polymerního gelu. ^{[42][43]}

Dochází tedy k tomu, že při kontaktu suchého polymerního ob vazů s vlhkým povrchem rány proniká exsudát rány do polymerního řetězce. To způsobuje vysokou míru hydratace a následné nabobtnání krytu za vzniku gelu na povrchu rány. ^[44] Stejně jako u všech polymerů je proces botnání způsoben solvatací polymerních řetězců, což vede ke zvýšení vzdálenosti mezi jednotlivými molekulami polymeru. Bylo prokázáno, že ve vodném prostředí polymer také podléhá relaxačnímu procesu, jehož výsledkem je pomalá přímá eroze (neboli rozpouštění) hydratovaného polymeru. ^{[45] [46]} Bylo zjištěno, že botnání i eroze působilo současně na ránu, přičemž každý z procesů přispívá k celkovému uvolňovacímu mechanismu. Obecně se však rychlost uvolňování léčiva stanoví rychlostí difúze disolučního média (exsudátů) do polymerní matrice. Faktory, jako je eroze polymerní matrice po difúzi vody a botnání v jiných dávkových formách jsou hlavním důvodem pro odchylky od druhé odmocniny časové kinetiky. ^[47]

Byly proto navrženy různé modely pro výzkum mechanismů s řízeným uvolňováním léčiv, které kombinují difúzi, nabobtnání a erozi. ^[48] Tyto modely jsou založeny na pronikání vody do suché matrice a rozpouštění polymeru na základě teorie polymerů v roztoku. ^{[49][50]}

1.2 Hojení ran

Poranění je definováno jako narušení kontinuity epiteliální výstelky kůže nebo sliznice v důsledku fyzického nebo tepelného poškození. Podle délky trvání a povahy hojivého procesu je rána klasifikována jako akutní či chronická.^[51]

1.2.1 Klasifikace ran

Akutní rána je zranění kůže, ke kterému dochází náhle v důsledku nehody nebo chirurgického zranění. Léčí se v předvídatelném a předpokládaném časovém rámci, obvykle v rozmezí 8-12 týdnů (v závislosti na velikosti, hloubce a rozsahu poškození v epidermis a dermis vrstvě pokožky).^[52] Akutní rány bývají nejčastěji mechanického typu, zahrnují pronikavé rány způsobené ostrými předměty, výstřely ze zbraně a chirurgické rány způsobené chirurgickými řezy například při odstraňování nádorů. Další kategorie akutních ran zahrnuje popáleniny a chemická zranění, která vznikají z různých zdrojů, jako jsou záření, elektřina, korozivní chemikálie a tepelné zdroje. Teplota zdroje a doba expozice ovlivňují stupeň tepelného popálení.^[53] Popáleniny obvykle vyžadují odbornou péči kvůli souvisejícímu traumatu.

Chronické rány jsou takové, které neprochází normálním stupněm hojení a nemohou být zahojeny řádným a včasným způsobem. Tyto rány se hojí déle než 12 týdnů a často se znovu vrací.^[54] Rány se obvykle nezahojí pořádně a to v důsledku různých faktorů v organismu, které prodlužují délku jedné nebo více hojivých fází. Mezi tyto faktory patří infekce, tkáňová hypoxie, nekróza, exsudát a nadměrné hladiny zánětlivých cytokinů.^[55] Výsledkem je tedy narušení přirozeného postupu procesu léčení. Mezi chronické rány také patří dekubitové vředy (proleženiny nebo otlaky) a vředy nohou (venózní, ischemické nebo traumatické).^[54]

Posledním typem jsou tzv. **komplexní rány** (také nazývané komplikované rány). Jsou speciálním druhem a jsou nejčastěji definovány jako kombinace infekce a tkáňového defektu. Příčina defektu se vyvíjí v důsledku traumatické nebo postinfekční etiologie nebo rozsáhlé resekce tkáně (operativní odstranění orgánu, např. u nádorových onemocnění). Každá rána je kontaminována bez ohledu na příčinu, velikost, umístění. Zda se infekce vyvíjí či nikoliv závisí na virulenci, počtu a typu mikroorganismů, jakož i na místním krevním zásobení a přirozené rezistenci pacienta. Typická charakteristika infekce je pět příznaků, které byly dobře zdokumentovány: zarudnutí, teplo, bolest, edém

a ztráta nebo omezená funkce v postižené části. Frekvence infekcí rány závisí na typu nebo chirurgické technice a umístění rány. Další kritéria zohledněná při klasifikaci ran zahrnují etiologii, stupeň kontaminace, morfologické charakteristiky a komunikaci s dutými nebo pevnými orgány. ^{[56][57]}

Podle stupně kontaminace jsou rány rozděleny do tří skupin takto:

- aseptické rány (operace kostí a kloubů)
- kontaminované rány (operace břicha a plic)
- septické rány (abscesy, operace střev, atd.)

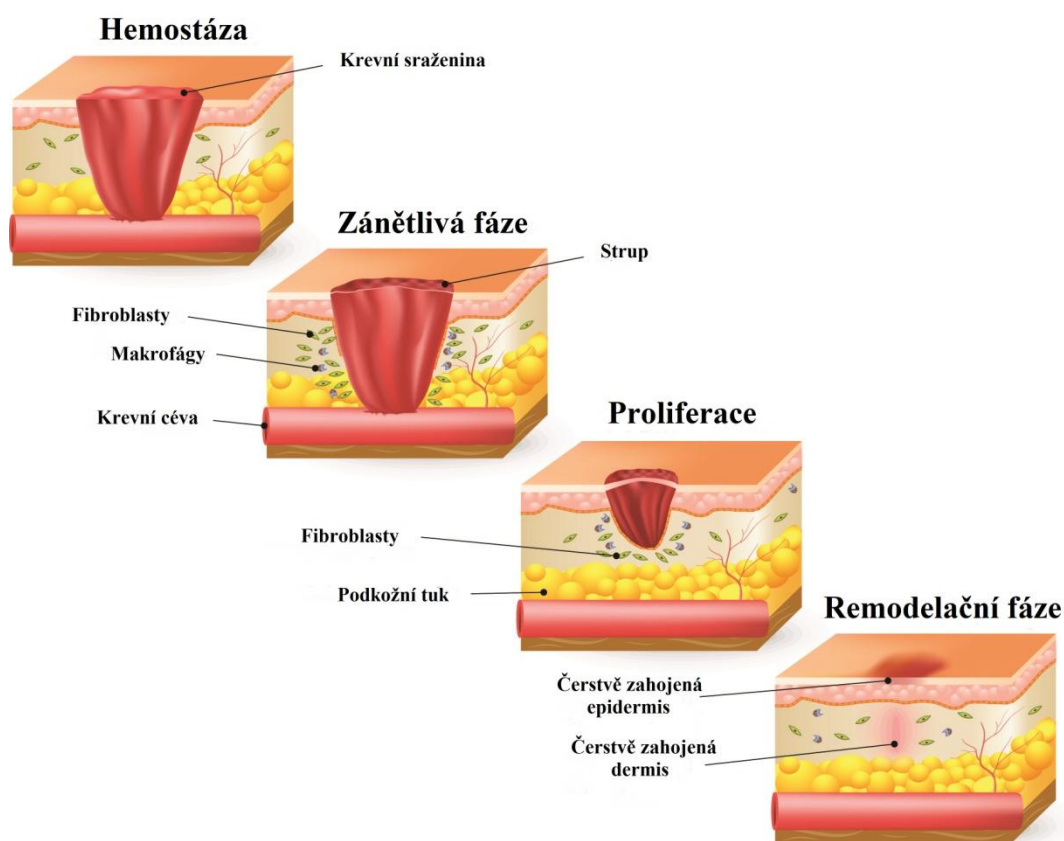
Rány mohou být také označovány jako uzavřené, kde podkladová tkáň byla traumatizována, ale kůže nebyla oddělena, nebo jako otevřená, kde byla vrstva kůže poškozena vystavenou podkladovou tkání. ^{[58][59]}

Zranění i hojení ran se odehrává ve všech tkáních i orgánech těla. Mnoho z těchto hojících postupů je společných pro všechny tkáně. Celý proces hojení je kontinuální, ale můžeme ho rozdělit do několika fází, pro snazší pochopení fyziologických procesů, které probíhají v raně a v jejím okolí. Léčení je komplexní proces zahrnující koordinované interakce mezi různými imunologickými a biologickými systémy. Zahrnuje kaskádu pečlivě a přesně regulovaných kroků a událostí, které musí následovat v jasně daném postupu. ^[60]

1.2.2 Fáze procesu hojení

Nejčastěji se celý proces léčení rozděluje podle času do čtyř na sobě závislých fází:

- a) koagulace a hemostáza (fáze začínající ihned po poranění)
- b) zánětlivá fáze (také začínající bezprostředně po poranění)
- c) proliferace (začíná v průběhu dnů po poranění, zahrnuje procesy hojení)
- d) remodelační fáze (dochází k dozrání a tvorbě jizev, může trvat až rok) ^[60]



Obrázek 5 - Fáze hojení ran ^[61]

Koagulace a hemostáza. Jak již bylo výše zmíněno, dochází k nim ve chvíli poranění. Hlavním úkolem je zabránit krvácení. Je to hlavní ochranný cévní systém, respektive způsob, jak ochránit cévy tak, aby nebyla porušena funkce životně důležitých orgánů. ^[62] Základem této fáze je vytvoření fibrinové sítě, která zachytává okolím se pohybující erythrocyty, leukocyty a trombocyty z krevního řečiště. Vytvoří se trombus. Fibrinová síť vzniká polymerizací fibrinu, který se vzniká z plazmatické bílkoviny fibrinogenu, který je tvořen v játrech. ^[63] Cytoplazma trombocytů obsahuje α -granulocyty naplněné růstovými faktory a cytokiny. Tyto molekuly působí jako promotory v kaskádě hojení ran aktivací a přitahováním neutrofilů a později makrofágů, endotelových buněk a fibroblastů. Krevní destičky také obsahují vasoaktivní aminy (jako je serotonin), které zapříčiňují vasodilataci a zvýšenou propustnost cév, což vede k vytvoření edému, který je důležitý pro další fáze hojení. ^[64]

Zánětlivá fáze následuje po vytvoření trombu. Hlavním úkolem této fáze je vytvořit imunitní bariéru proti invazivním mikroorganismům. Je možné ji rozdělit do dvou samostatných fází a to jsou časná zánětlivá fáze a pozdní zánětlivá fáze.^[65]

Při časně fázi zánětlivého procesu dochází k aktivaci komplementované kaskády a iniciaci molekulárních pochodů vedoucích k infiltraci místa poranění. Neutrofilů, jejichž hlavní funkcí je prevence infekce, začínají být přitahovány do místa poranění během 24-36 hodin po poranění a to různými chemoatraktivními činidly. Při dostatečném množství neutrofilů dochází k útoku za účelem zničení a odstranění bakterií, cizích látek a poškození tkáně. Tento proces je velmi důležitý pro následné fáze hojení, protože akutní rány, které nebyly řádně "očišťeny" se dále hojit nebudou.^[56] Aktivita neutrofilů se mění v průběhu hojení. Jakmile jsou patogenní bakterie odstraněny, hlavní úkol je splněn a neutrofilů jsou z rány odstraněny. Extruzí se dostávají neutrofilů na povrch, kde se odstraní redundantní buňky apoptózou a následným odlupováním.^{[60][66]} Součástí pozdější fáze je fagocytóza zapříčiněna makrofágy. Nedostatek makrofágů v ráně způsobuje závažné poruchy hojení způsobené špatným odbouráváním, zpožděnou proliferací a zráním fibroblastů a také zpožděnou angiogenezi, což má za následek nedostatečnou fibrózu a slabě zahojenou ránu. Poslední buňky, které vstupují do místa rány v pozdní zánětlivé fázi, jsou lymfocyty přitahované 72 h po poranění působením interleukinu-1 (IL-1), složek komplementu a produktů rozkladu imunoglobulinů G (IgG). IL-1 hraje důležitou roli v regulaci kolagenázy, která je později potřebná pro remodelaci kolagenu, produkci složek extracelulárního matrixu a jejich degradaci.^{[63][67]}

Proliferační fáze nastává, když je dosaženo hemostázy, hojení se posouvá směrem k opravě tkáně. Proliferační fáze přichází bezprostředně po fázi zánětlivé, od poškození tkáně to je druhý až třetí den a trvá přibližně dva týdny. Hlavním znakem je migrace fibroblastů a depozice nově syntetizované extracelulární matrice, která působí jako náhrada za prozatímní síť složenou z fibrinu a fibronektinu. Na makroskopické úrovni lze tuto fázi hojení rány považovat za hojnou tvorbu granulační tkáně.^[68] Fibroblasty a myofibroblasty jsou v okolní tkáni stimulovány k proliferaci během prvních 3 dnů. Poté migrují do rány a jsou přitahovány faktory, které jsou uvolňovány zánětlivými buňkami a destičkami. Jakmile jsou fibroblasty v ráně, hojně proliferují a produkují matricové proteiny hyaluronan, fibronektin, proteoglykany a prokolageny.^[69] Ke konci prvního týdne od poranění dochází hromadění matrixu, fibroblasty se mění na

speciální myofibroblasty a svazky aktinů se připojují k fibronektinu a kolagenu. Díky kontrakci ran dochází ke stahování buněčného rozšíření a následně jsou redundantní fibroblasty zničeny apoptózou.^[70] Velice důležité, pro celý proces hojení a především proliferační a remodelační část, jsou kolageny. Neporaněná dermis obsahuje 80% kolagenu typu 1 a 20 % kolagenu typu 3, poraněná dermis má až 40% kolagenu typu 3.^[56] Syntéza kolagenu je dána fibroblasty.

Finální fází je **Remodelační fáze**. Ta je zodpovědná za vývoj nového epitelu a konečnou tvorbu jizvy. Syntéza extracelulární matrice v proliferačních a remodelačních fázích je zahájena současně s vývojem granulační tkáně. Tato fáze může trvat 1 až 2 roky nebo i déle. Remodelace akutní rány je přísně kontrolována regulačními mechanismy s cílem udržet křehkou rovnováhu mezi degradací a syntézou, což vede k normálnímu hojení. Spolu s maturací intracelulární matrice se zvětšuje průměr svazků kolagenu a degraduje se kyselina hyaluronová a fibronektin. Kolagenová vlákna se postupně dostanou na 80% původní pevnosti ve srovnání s nepoškozenou tkání. Získaná konečná síla závisí na lokalizaci opravy a její délce, ale původní síla tkáně nemůže být nikdy získána.^[56]

Během celého hojení dochází k několika dalším procesům, které se nedají jednoznačně zahrnout do výše zmíněných fází. Jedním z nich je vylučování exsudátu. **Exsudát** je zánětlivá extravaskulární tekutina, v podstatě jde o krev zbarvenou červených krvinek a krevních destiček. Exsudát má klíčovou roli ve všech fázích hojení, kontinuálně zavlažuje ránu a udržuje ji vlhkou, poskytuje živiny a příznivé podmínky pro migraci a mitózu epitelálních buněk. Exsudát také dodává do rány leukocyty, které pomáhají kontrolovat bakterie a snižují možný výskyt infekce na povrchu rány.^[71] U některých chronických ran může docházet k nadměrné tvorbě exsudátu. Přebytný exsudát je výsledkem edému způsobeného zánětem.

1.2.3 Faktory ovlivňující hojení ran

Mezi tyto faktory můžeme zahrnout **vlhkost**. Několikrát už bylo výše zmíněno, že vlhká rána podporuje buněčné pohyby a urychluje hojící proces, zatímco suchá kůže brání pohybu epidermálních buněk a hojení ran prodlužuje. Obvazy na rány by měly poskytovat dostatečné procento vlhkosti v místě poranění, aby se podpořilo hojení ran a přenesly přebytečné exsudáty z místa poranění a tím se chránila rána před infekcí.^[72]

Jedním z nejdůležitějších faktorů je **kyslík**. Kyslík je životně důležitou živinou pro buněčný metabolismus, poskytuje energii pro správnou buněčnou funkci a syntézu proteinů. Bylo zjištěno, že na okrajích rány je vyšší obsah kyslíku, z čehož bylo vyvozeno, že rostoucí tkáně jsou závislé na kyslíku. Syntéza kolagenu, základní krok v procesu opravy ran, který poskytuje matrici pro remodelaci tkáně, má mnoho posttranslačních kroků, které závisí hlavně na přítomnosti kyslíku. Prolylhydroxyláza, lysyl oxidasa a lysylhydroxyláza jsou primárními enzymy potřebnými k přeměně prolinu na hydroxyprolin, který umožňuje, aby prokolagenové řetězce měly svou konfiguraci šroubovice. Jakmile jsou vytvořeny, jsou kolagenová vlákna uspořádána do lineárních fibril a podepřena zesílením. Všechny tyto procesy v zásadě závisí na přítomnosti O₂ v mikroprostředí rány. Vliv kyslíku na prevenci proti mikrobiální infekci v místě poranění během procesu opravy je klíčovou otázkou pro ochranu proti mikrobům. Mikrobiální infekce ran podstatně zdržuje proces hojení a tím způsobuje vážné škodlivé následky, kdy je třeba ránu neustále čistit.^{[73] [74]}

1.2.4 Faktory zhoršující hojení

Mezi takovéto faktory může patřit nadměrné množství exsudátu, který může způsobit měkčení a to i zdravé tkáně v okolí rány. I takový pach a skvrny způsobené exsudátem mohou přispět nepohodlí a nepříjemnému stavu samotného pacienta.^[75]

Dalším faktorem může být vnik cizího tělesa hluboko do rány. Takovéto těleso může způsobit zánětlivé reakce, které samozřejmě zdržují proces hojení. Zánětlivé reakce mohou způsobovat granulomy nebo abscesy. Při nedostatečném opatření může dojít k infekci rány a to následně vede k zánětům. Bylo prokázáno, že přítomnost patogenních bakterií jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* a některé druhy *Proteus*, *Clostridium* a *Coliform*, zhoršují celý proces hojení.^[75]

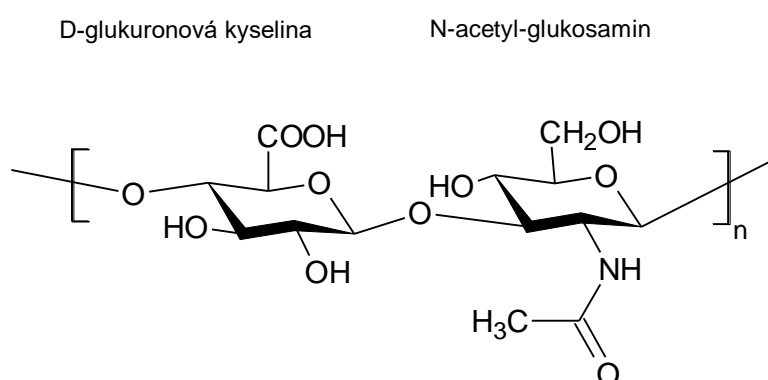
Debridement je název pro odstranění nekrotické tkáně nebo cizího předmětu z rány. Nedostatečné očištění by také mohlo vést k zánětlivé reakci a následným závažným problémům. Pro debridement rány se používá několik metod, které zahrnují: chirurgické odstranění skalpelem a nůžkami, hydroterapii nebo zavlažování ran a autolytické odstranění rehydratací nekrotické tkáně, například použitím hydrogelových obvazů, enzymatického odstranění za použití kolagenáz odvozených od bakterií nebo

přípravků, jako je streptokináza .^[76] Problémem může být i sekundární debridement, neboli nechtěný, ke kterému dochází při strhnutí suchých náplastí nebo obvazů.

1.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je lineární nerozvětvený polysacharid, patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Má chemickou strukturu lineárního polyelektrolytu složenou z pravidelně se opakujících disacharidových jednotek obsahujících glukuronovou kyselinu a N-acetyl-glukosamin. Tyto základní cukry jsou mezi sebou spojeny střídavými glykosidickými vazbami β -1->4 a β -1->3.

HA je schopna interagovat se specifickými buněčnými receptory, které jej mohou selektivně rozpoznávat a vázat.^[77] Specifické molekuly a receptory, které interagují s HA, se účastní přenosu buněčného signálu; Příkladem buněčných složek, které se vážou na HA, jsou molekuly, jako je agrekan, versican a neurokan a receptory zahrnující CD44, RHAMM, TSG6, GHAP a LYVE-1. Mezi těmito receptory se zdá, že CD44 a RHAMM získaly větší pozornost, protože se zjistilo, že se podílejí na rakovinových metastázách.^[78]



Obrázek 6 - Struktura kyseliny hyaluronové

1.3.1 Výskyt

HA obvykle existuje ve vysoké molekulové hmotnosti, v synoviální tekutině obklopuje klouby, chrupavky a tkáň oka a kůže.^[79] V těle se HA vyskytuje ve formě soli, hyaluronátu a nachází se ve vysokých koncentracích v několika měkkých pojivových tkáních, včetně kůže, pupeční šňůry, extracelulární tekutiny a sklivce. Významná množství HA jsou také nalezena v plicích, ledvin, mozku a svalových tkání.^[79] Kyselina hyaluronová může být získána ze širokého spektra tkání a zvířat a její struktura, pokud je

purifikována, je identická v celém druhu. HA byla izolována z různorodých prostředí, z červů druhu *Ascaris*, z krys, králíků, a samozřejmě i ze člověka.^{[80][81][82]}

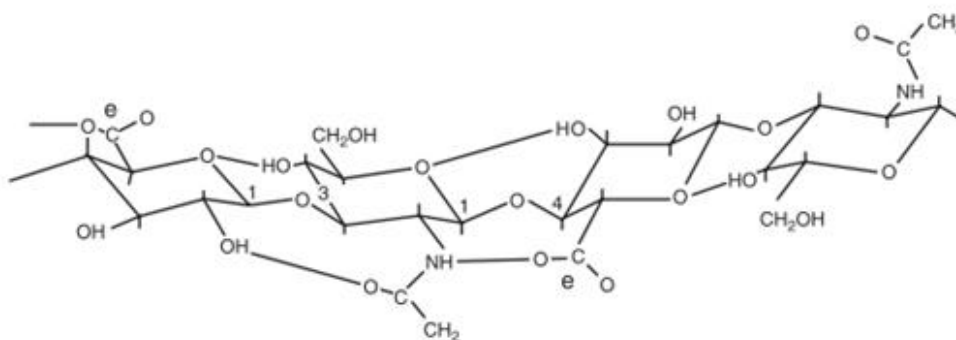
1.3.2 Fyzikálně-chemické a strukturní vlastnosti

HA vytváří neskupující polymery, které, když jsou extrahovány, typicky váží několik milionů daltonů^[83] a mohou se skládat z více než 30 000 opakujících se jednotek, jako takové jsou jednou z větších složek extracelulární matrice. Počet opakovaných disacharidů v dokončené molekule hyaluronanu může dosáhnout 10 000 nebo více, molekulová hmotnost ~ 4 miliony daltonů (každý disacharid je ~ 400 daltonů). Průměrná délka disacharidu je ~ 1 nm. Molekula hyaluronanu s 10 000 opakováními by tedy mohla být rozšířena o 10 μm, pokud by se narovнала od začátku ke konci, přičemž délka by se přibližně rovnala průměru lidského erytrocytu.^[84]

Primární a sekundární hydroxylové skupiny jsou mírně kyselé a mohou být ionizovány alkalickou ionizací, například hydroxidem sodným. Karboxylová skupina je ze skupiny středních kyselin, neutralizované alkaliemi na alkalické kyseliny nebo soli, vznikají pak hyaluronáty například hyaluronát sodný. Směs soli a volné kyseliny se označuje jako hyaluronan.

Molekula kyseliny hyaluronové je snadno rozpustná ve vodě za vzniku viskózní kapaliny nebo gelu, který se chová jako lubrikant. Viskozita souvisí s délkou řetězců; delší řetězce jsou více zapleteny a mají tak zvýšenou viskozitu.^[85] Současně molekula s velkým řetězcem vykazuje hygroskopické vlastnosti a adsorbuje vodu z bezprostředního prostředí, tvořící gel při nízkých koncentracích a materiálům tak dodává homeostatické vlastnosti.^[86]

Ve fyziologickém roztoku je základ molekuly hyaluronátu vyztužen kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových vazeb a interakcí s rozpouštědlem. Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní plochu, zatímco rovníkové postranní řetězce tvoří více polární hydrofilní plochu, čímž se vytváří struktura zkrouceného pásu. Terciární struktura je stabilizována přítomností intermolekulárních vodíkových vazeb. Hydrofobní a vodíkové vazebné interakce v kombinaci s protikladem elektrostatického odpuzování umožňují agregaci velkého počtu molekul, což vede k tvorbě molekulárních sítí (matrič) HA.^[87]



Obrázek 7 - Struktura HA se znázorněnými vodíkovými vazbami^[87]

Roztoky hyaluronátu vykazují velmi neobvyklé reologické vlastnosti, mimořádnou mazivost a jsou velmi hydrofilní. V roztoku má polymerní řetězec formu expandované, náhodné cívky. Tyto řetězce se navzájem zaplétají již při velmi nízkých koncentracích, což může přispět k neobvyklým reologickým vlastnostem. Při vyšších koncentracích mají roztoky extrémně vysokou, ale smykově závislou viskozitu. Názorný příklad 1% roztok připomíná formou želé, ale když je pod tlakem, pohybuje se snadno a může být podáván pomocí jehly s velice úzkým otvorem. Z těchto důvodů můžeme HA nazvat „pseudo-plastickým“ materiálem. Existují důkazy o tom, že hyaluronát odděluje většinu povrchů tkáně, které se posouvají podél sebe. Mimořádně kluzké vlastnosti hyaluronátu ukázaly, že snižují pooperační tvorbu adheze po abdominální a ortopedické operaci. Jak bylo zmíněno, polymer v roztoku zaujímá ztuženou šroubovicovou konfiguraci, kterou lze přičíst vodíkové vazbě mezi hydroxylovými skupinami v řetězci. Výsledkem je vytvoření struktury jednodušší šroubovice, která zachycuje přibližně 1000 krát větší hmotnost ve vodě. ^[84].

Hydroxylové skupiny v řetězci hyaluronátu, přesněji v opakujících se jednotkách D-glukuronové kyseliny, mají redukční vlastnosti.^[88] Kyselina hyaluronová se tedy chová jako redukující sacharid.

Hyaluronan je za fyziologických podmínek zcela ionizován. Také slouží jako lapač volných radikálů a jako antioxidant. Tyto funkce hyaluronátu mohou být zvláště potřebné ve fyziologii kůže, jako ochrana proti slunečnímu záření. ^[89]

1.3.3 Výroba

Kyselina hyaluronová se v průmyslovém měřítku vyrábí především za pomoci bakterií. Mohou ji produkovat geneticky upravené kmeny například *Escherichia coli* nebo i jiné. Ve firmě Contipro a.s je výroba biotechnologickým způsobem, HA se získává fermentací z buněčných stěn bakterií druhu *Streptococcus zooepidemicus*.^{[90][91]}

1.3.4 Farmakokinetika

Normální systémová kinetika HA je dobře zavedena u několika druhů včetně člověka. Odstranění HA z organismu je velmi účinné, s poločasem 2–6 minut a celkový normální obrat 10–100 mg/den u dospělého člověka. Hlavní příjem z krve probíhá v endotelových buňkách jater. Důkazy o roli ledvin v eliminaci HA se však akumuluji. Nedávno publikovaná data naznačují, že eliminační kinetika HA ze systémové cirkulace může být ovlivněna řadou faktorů, saturací eliminace způsobené zvýšeným lymfatickým vstupem HA do oběhu, změnou průtoku krve přes vylučovací orgán a konkurence s jinými makromolekulárními látkami, jako je chondroitin sulfát nebo proteoglykany. Mnoho z těchto faktorů může být funkčních během různých chorobných stavů, a proto může částečně vysvětlit pozorované rozdíly mezi normální a patologickou kinetikou HA. Normální a patologický obrat hyaluronanu z oběhu byl stanoven u mnoha různých druhů, včetně člověka mnoha různými autory používajícími různé techniky.^[92]

1.3.5 Degradace a eliminace

U savců je degradace HA způsobena třemi typy enzymů: *hyaluronidázy* (neboli *hyázy*), *β -d-glukuronidázy* a *β -N-acetylhexosaminidázy*. V celém těle se tyto enzymy nacházejí v různých formách, intracelulárně především. Obecně *hyázy* štěpí vysokomolekulární kyslinu hyaluronovou na menší oligosacharidy, zatímco další enzymy *β -d-glukuronidáza* a *β -N-acetylhexosaminidáza* dále degradují oligosacharidové fragmenty odstraněním neredukujících terminálních cukrů. Produkty degradace hyaluronanu, oligosacharidů a hyaluronanu s velmi nízkou molekulovou hmotností vykazují proangiogenní vlastnosti.^[77]

Přímým měřením HA z moči lze vypočítat, že přibližně 1% normálního denního obratu HA ze systémové cirkulace u člověka se filtruje ledvinami. Podobné výsledky byly získány ve studiích na člověku^[93] a ve studii na králících.^[94] Extrakční poměr a totální clearance nad ledvinami u prasat je uváděn jako 14% a 41 ml/min., s použitím

metody měření přímo nad orgánem. V této studii bylo také zjištěno, že renální clearance byla přibližně trojnásobkem clearance moči.^[95]

Použitím metody měření rozdílu endogenní koncentrace v určitém orgánu, byl stanoven hepatosplanchnický extrakční poměr a clearance hyaluronanu u člověka 33% a 250 ml/min. Poměr jaterní extrakce a clearance byly také stanoveny u prasat měřením přímo nad orgánem a bylo zjištěno, že jsou 23% a 150 ml/min.^[95]

Při zjišťování vylučování zlomocí GIT bylo zjištěno, že celkové množství vylučované do žluče během 24 hodin je velmi nízké, 0,7% podané dávky. Podobně, celkové množství vylučování do stolice, do 100 hodin po podání, bylo také velmi malé, přibližně 0,5% podané dávky.^[93]

1.3.6 Možnosti modifikace HA

Přípravou nových materiálů na bázi HA byly dosaženy řadou chemických modifikací, které poskytují materiály s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Ty se mohou významně lišit od nativního polymeru, ale většina derivátů si zachovává biokompatibilitu a biologickou odbouratelnost nativní HA. Nejběžnější modifikace hyaluronanu je zesítnění za vzniku hydrogelového materiálu, které bylo provedeno za kyselých, neutrálních a alkalických podmínek. Bylo také navrženo několik metod pro funkcionalizaci hyaluronanu s postranními skupinami, které umožňují připojení reportérových skupin k produkci nových léků pro cílené a řízené uvolňování. Rovněž byla provedena příprava kompozitních materiálů, přičemž hyaluronan je naroubován na přírodní a syntetické polymery, čímž se získají zlepšené biomechanické a fyziologické vlastnosti.

Chemická struktura hyaluronanu má dvě nejčastěji používaná místa pro kovalentní modifikaci: karboxylové kyseliny a hydroxylové funkční skupiny. Reakce mohou být prováděny za použití heterogenní nebo homogenní. Heterogenní reakce se provádějí na předem vytvořených HA nosných základech, kde rychlost difúze může být přinejmenším stejně důležitá jako chemická kinetika, zatímco u homogenní metody se provádějí za použití HA roztoků. Heterogenní způsob má tu výhodu, že umožňuje tvarování produktu před zesítněním, zatímco druhý způsob poskytuje výhodu lepší kontroly chemického hlediska s větší homogenitou produktu.^[96]

1.3.6.1 Esterifikace

Příkladem může být materiál HYAFF®. Tento materiál vychází z esterifikace kyseliny hyaluronové, byl připraven alkylací amonné soli hyaluronanu alkylhalogenidem v roztoku dimethylformamidu (DMF). Při vyšších procentech esterifikace se výsledné materiály HYAFF® staly nerozpustné ve vodě. Tyto estery hyaluronanu mohou být extrudovány za vzniku membrán a vláken, lyofilizovány pro získání medicínské houby nebo zpracovány rozprašovacím sušením, extrakcí a odpařením za vzniku mikrokuliček.

Polymery vykazují dobrou mechanickou pevnost, když jsou suché, ale hydratované materiály jsou méně robustní. Stupeň esterifikace ovlivňuje velikost hydrofobních náplastí, které produkují síť polymerních řetězců, která je pevnější a stabilnější a méně náchylná k enzymatické degradaci.

Tyto materiály byly použity jako sítě a houby pro růst kultivovaných lidských fibroblastů a pro kultivaci chondrocytů a mezenchymálních buněk odvozených z kostní dřevě pro opravu defektů chrupavky a kostí.^{[97][98]}

1.3.6.2 Crosslinky s HA

Autocrosslinkový polymer (ACPTM, Fidia) je interně esterifikovaný derivát hyaluronanu s inter- a intramolekulárními vazbami mezi hydroxylovými a karboxylovými skupinami hyaluronanu. ACPTM může být lyofilizován na bílý prášek nebo hydratován na transparentní gel.^[99] Tento biomateriál byl použit jako bariéra pro redukci pooperačních adhezí a jako základ pro opravu růstu buněk tkáňových defektů.

Další formy autocrosslinkovaného HA představují syntézu derivátu HA-benzoyl cysteinu, který se může ve fyziologickém pufru samočinně sestavovat - interakcí a po oxidaci za vzniku chemického hydrogelu pomocí S-S můstků.^[100] Tyto gely mají tu výhodu, že jsou injikovatelné a in situ zesíťovatelné bez použití toxických zesíťovadel.

V roce 2012 byl uveden kompozit HA-Agarose, který byl vytvořen za použití epichlorhydrinu jako síťovacího činidla. Epoxidová skupina reaguje s funkční skupinou karboxylovou i hydroxylovou za vytvoření esterové a etherové vazby. Materiály byly následně zesíťeny za použití sušení pro výrobu nosných základů, které nabízí výhodu kontrolovaných rychlostí degradace.^[101]

1.3.6.3 Další použité reakční mechanismy

Neméně zajímavá je oxidace HA pomocí jodistanu za vzniku dialdehyd hyaluronové kyseliny (HDA), ta je následně navázána na chitosan pomocí Schiffových bází, které vytvoří vazby mezi aminoskupinami v chitosanových a aldehydových skupinách v HDA.^[102] Tyto možnosti nabízejí výhodu tvorby gelu a skeletu bez použití zesíťovacích činidel. Oxidovaná HA byla také úspěšně naočkována na hydroxyethylmethakrylát (HEMA) pro aplikaci při regeneraci plicních tkání.^[103]

1.3.7 Role HA při hojení ran

Řada biologických procesů zprostředkovaných hyaluronanem je důležitá při procesu hojení ran. Po poranění následuje hojení v sérii přísně regulovaných, sekvenčních událostí. Jedná se o hemostázu, zánětlivou fázi, proliferační fázi a remodelaci, jak bylo výše popsáno v kapitole 1.2.2. Hyaluronan má mnohostrannou úlohu při zprostředkování těchto buněčných a matricových procesů.

Primární funkcí hyaluronanu v epidermis je udržování extracelulárního prostoru a poskytnutí otevřené, hydratované struktury pro průchod živin.^[104]

V zánětlivé fázi se generuje mnoho faktorů potřebných pro následné kroky hojení ran. Ty zahrnují růstové faktory, cytokiny, eikosanoidy atd., ty dále napomáhají migraci zánětlivých buněk, fibroblastů a endotelových buněk do místa poranění. Tkáň v okolí rány v časně zánětlivé fázi je bohatá na hyaluronan, pravděpodobně díky zvýšené syntéze.^[105] Hyaluronan může působit jako promotor časného zánětu, který je důležitý v procesu hojení ran. Dochází ke zvýšení prozánětlivých cytosinů TNF- α , IL-1 β a IL-8 a to prostřednictvím CD44 mechanismu. Dále hyaluronát usnadňuje primární adhezi cytosin aktivovaných lymfocytů na endotel. Je zajímavé, že tento jev je omezen na mikrovaskulární endoteliální buňky. Velké endotelové buňky cévy tento jev nevykazují.^[106]

V proliferační fázi je matrice tkáně velmi bohatá na hyaluronan a může přispívat k různým buněčným funkcím, které jsou nezbytné pro obnovu tkáně. Ty zahrnují usnadnění buněčné migrace do provizorní matrice rány, buněčnou proliferaci a organizaci matrice granulární tkáně.^[107]

V **remodelační fázi** je nutné dostatečné množství kyseliny hyaluronové v ráně, bylo totiž dokázáno, že může snižovat ukládání kolagenu a tím snižovat zjizvení.^[108]

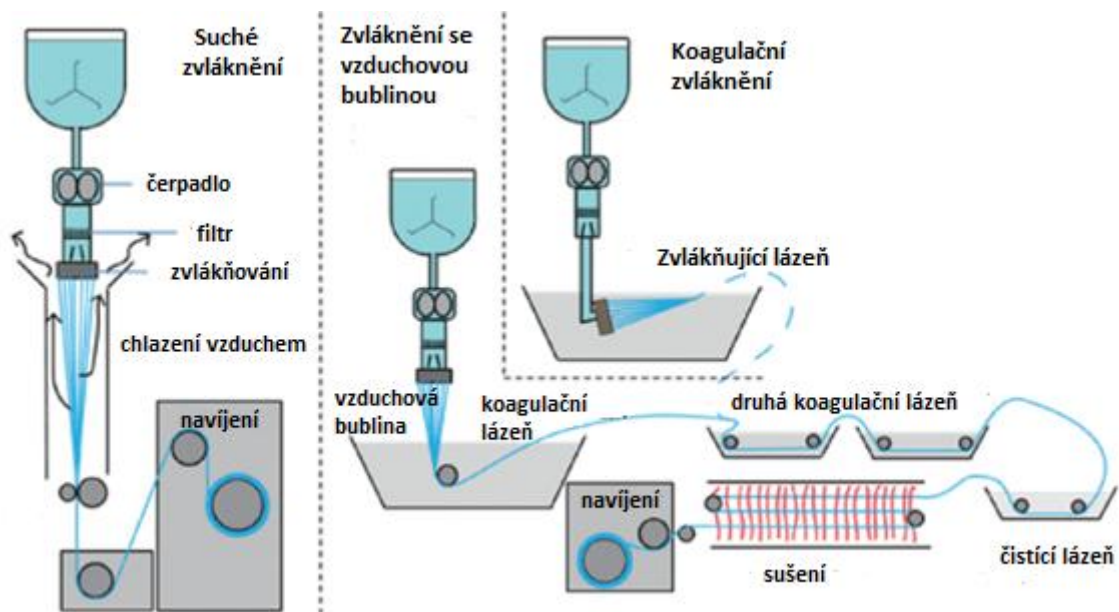
1.3.8 Zvláknění kyseliny hyaluronové

Vzhledem k tomu, že se kyselina hyaluronová stávala velice oblíbenou v mnoha lékařských, biomedicínských a dokonce i kosmetických přípravcích, začaly se zkoumat způsoby a možnosti jejího zvláknění.

1.3.8.1 Mokré a mokro-suché zvláknění

Polysacharidy lze použít pro přípravu vláken, za pomoci mokrého zvláknění, může být úspěšně použito tam, kde je polysacharidový roztok ve vhodném rozpouštědle extrudován přes různé typy trysek přímo do kapaliny ve které se látka nerozpouští, kde se tvoří vlákno nebo tenký film.^[109]

Při tomto procesu jsou polymerní řetězce rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle za vzniku viskózní tekutiny. Typické koncentrace roztoku se mohou pohybovat v rozmezí od 1% do 25% v závislosti na délce polymerních řetězců. Na zvláknění touto metodou existují tři doposud známé varianty. Ve všech variantách se polymerní roztok čerpá přes zvláknovací trysku a vlákna se vytvářejí buď odpařováním, nebo srážením. Rozpouštědlo musí být dostatečně těkavé, aby se rychle odpařilo a zanechalo za sebou postupně tuhnoucí vlákno pouze s malým množstvím zbytkového rozpouštědla. Zvláknovací tryška je ponořena nebo zavěšena těsně nad zvláknovací lázní a rozpouštědlo se vysráží z filamentu za použití nesolventního systému koagulantoru. Vlákna pak ztvrdnou a podstoupí několik kroků promývání a sušení před konečným navinutím.^[110]



Obrázek 8 - Variace mokrého zvláknění^[110]

Mokro-suchá varianta se používá u některých typů polyamidů nebo regenerované celulózy. V základě je proces obohacen o vzduchovou bublinu, kterou musí roztok projít poté, co vyjde z trysky.

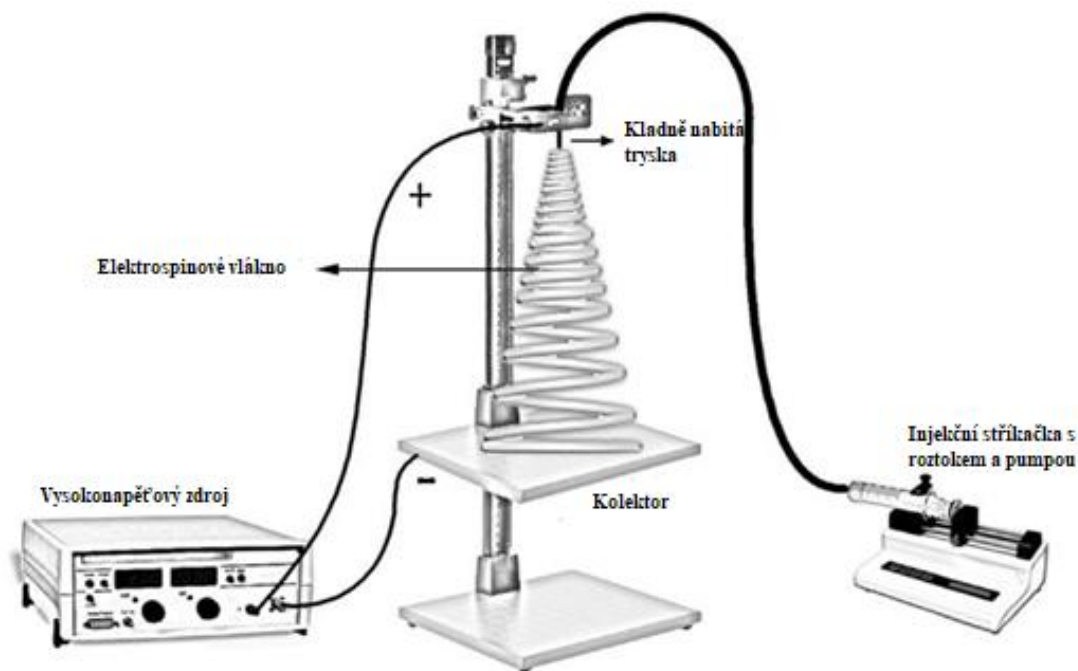
1.3.8.2 Elektrospinning

Proces elektrostatičkého zvláknování byl poprvé prokázán a patentován společností Formhals.^[111] Doposud bylo publikováno více než 60 patentů založených na procesech elektrospinningu a více než 200 článků týkajících se technologie elektrospinningu za posledních 10 let. Celkově byla většina elektromotorického výzkumu zaměřena na vývoj nanovláknenných membrán jako nových materiálů pro aplikace.^[112]

Elektrospinning je jednou z nejjednodušších a nejúčinnějších metod výroby vláken v mikroskopickém měřítku až nanoměřítku. Polymerní roztok, pokud je elektrostatičce nabitý, může produkovat netkaná polymerní vlákna v požadovaných rozměrech velikostí řízením fyzikálních vlastností roztoku polymeru a parametrů procesu zvláknování.^[113] Vzhledem k vysokému poměru povrchu k objemu nebo hmotnostnímu poměru získaných vláken byly tyto vláknité materiály aplikovány v biomedicínských aplikacích, jako je hojení ran, tkáňové inženýrství a dodávání léčiv. Mnoho syntetických a přírodních biopolymerů bylo nyní elektrospínováno do velmi jemných vláken.^[114]

Zařízení pro elektrospínové zvláknování zahrnuje několik komponent. V injekční stříkačce se nachází roztok HA, ta je napojena na automatické čerpadlo, které roztok

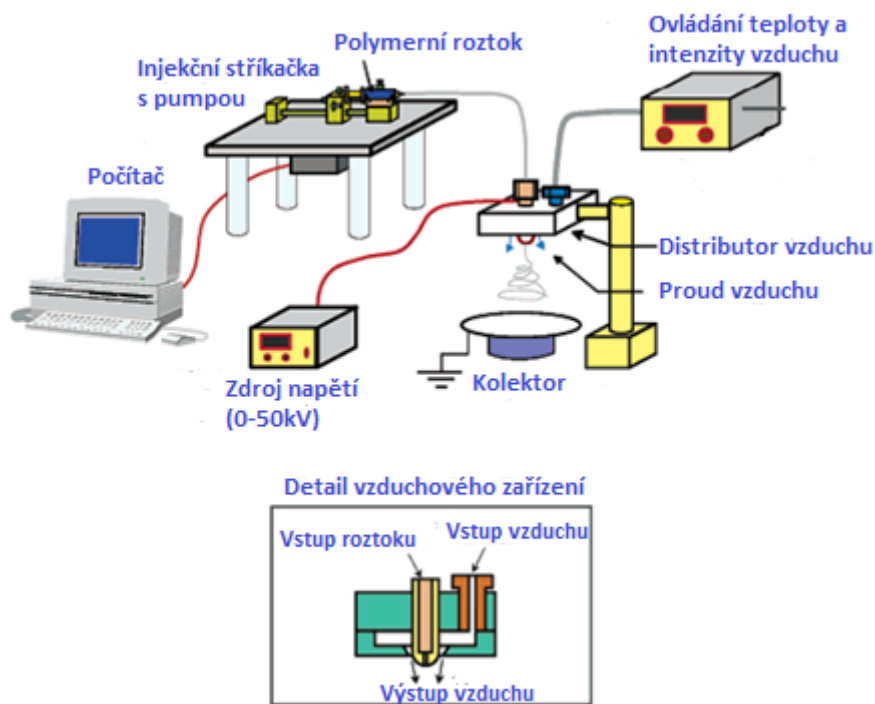
vhání do výstupního otvoru elektrody. Ta slouží jako zvlákňovací tryska, díky průměru trysky můžeme ovlivnit velikost vytvořených vláken (mikrovlákna nebo nanovlákna). Rychlost podávání roztoku se může pohybovat v rozmezí od 5 do 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Další komponentou je vysokonapěťové napájení, které bylo použito pro napájení napětí v rozsahu 0-40 kV. Sběrná deska se překryje hliníkovou fólií, která byla uzemněna, aby se shromáždily elektrovlákněné membrány HA.^{[115][116]}



Obrázek 9 - Sestava pro electrospinning^[117]

Dalšími kroky bylo například vylepšení základního roztoku kyseliny hyaluronové, byl použit například hydroxid amonný.^[118]

Kvůli špatné manipulaci s vysoko-viskózní kapalinou a velkým povrchovým napětím, kterým HA roztok disponuje, byl proces elektrospinningu vylepšen tzv. foukáním (blowing) a byl vytvořen proces elektro-blowing.^[112]



Obrázek 10 - Sestava pro electro-blowing^[112]

Jak můžeme vidět na obrázku č. 10, elektro-spinning sestava byla doplněna o přístroj pro foukání vzduchu, takže modifikované zařízení mělo dvě současně působící síly (elektrická síla a vzduchová smyková síla) pro výrobu nanovláken z polymerní tekutiny. Vzduchový systém se skládá ze dvou komponent - ohříváče a dmyhadla. Vzduch generovaný ventilátorem byl zahříván průchodem topnými články. Rozpouštědlo se rychleji odstraní a vzniká navíc větší přídavná tažná síla pro tvorbu vlákna.^[112]

1.3.9 Rozdělení vláken

Jednoduché dělení by bylo v závislosti na původu a tím by podskupiny byly pouze dvě (přírodní a uměle vytvořené vlákno). Jiné dělení, kterému bude věnována tato kapitola, je dělení podle délky a tloušťce řetězce.

1.3.9.1 Staplová vlákna

Termín staplová vlákna označuje vlákna, která jsou řezána na požadovanou délku. Umělá staplová vlákna mohou být řezána na délku vhodnou pro zpracování na bavlněném, vlněném nebo česaném spřádacím zařízení. Takováto vlákna mohou být upravena pro finální produkt na jednotnou délku, variabilní nebo náhodnou délku. Vlákno může být tvořeno protahovacími spojitými vlákny, což má za následek staplová vlákna s deformovanými částmi, které působí jako záhyby. Mohou být řezána z kontinuálních

rovných vláken pomocí rotačního řezáku nebo řezačky typu gilotiny, což vede k přímým staplovým vláknům. Dalším typem vláken mohou být taková, která jsou vyrobena lámáním kordu nebo svazku nekonečných kontinuálních vláken během operace roztahování, mající jednu nebo více zlomových zón, které jsou v předepsané vzdálenosti, čímž se vytvoří náhodná proměnlivá hmotnost vláken, která má průměrnou délku řezu řízenou zlomové zóny. Samozřejmě požadavky na stabilní výrobu vláken se liší podle požadavků na vláknové příze. ^[119]

1.3.9.2 Kontinuální vlákna

Termín kontinuální vlákno označuje takové vlákno, které je pružné a má relativně malý průměr s délkou delší, než je délka staplových vláken. Tyto vlákna mohou být převedena na multifilamentní nitě. Kontinuální filameny mohou být připraveny různými způsoby, mimo jiné i výše zmíněným elektrosponingem. ^[120]

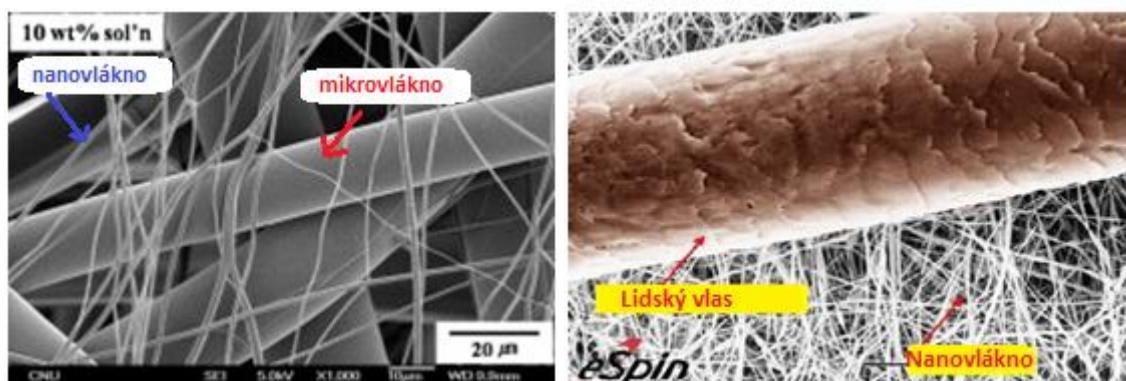
Zařízení pro výrobu takového kontinuálního vlákna bylo popsáno v kapitole 1.3.7.2. Polymer se roztaví v extrudéru a tavenina se přivádí čerpadly do spřádacího zařízení. Spřádání filamentů se provádí spřádacím zařízením schopným produkovat vlákno rychlostí alespoň 0,5 a až 15 gramů na otvor za minutu. Zařízení obsahuje směrem dolů směřující trysky nebo zvlákňovací trysky, které vytlačují roztavený polymer za vzniku požadovaných vláken. Zvlákňovací trysky jsou vhodně uspořádány v řadě vícenásobných řad rovnoběžných se skupinou vzduchových pistolí, které probíhají napříč přes podélný směr pohybu polohového povrchu. Volitelně každá zvlákňovací tryska produkuje alespoň dostatečný počet vláken pro přivádění jedné vzduchové pistole; alespoň 15 a výhodně 50 až 150 filamentů. Otvory zvlákňovacích trysek mohou mít průměry od 0,1 do 1,5 mm, výhodně od 0,3 do 1,2 mm, aby se vytvořily typické velikosti vláken. Rychlost roztaveného polymeru se obvykle pohybuje v rozmezí od 0,5 do 1,5 gramů za minutu na otvor. Teploty odstředování se obvykle pohybují v rozmezí od 250 do 350 ° C a samozřejmě jsou dány specifickým polymerním vláknem, které je vytlačováno. Extrudovaná vlákna jsou chlazena chladícím vzduchem. Kontinuální výztužné vlákno je předem navlhčeno první termoplastickou pryskyřicí a zavedeno do formy, kde je v kontaktu s druhou termoplastickou pryskyřicí extrudovanou z extrudéru v roztaveném stavu. Teplota matrice je pečlivě kontrolována tak, aby předem navlhčené vlákno a první pryskyřice nevytvrdly nebo neztuhly, dokud nejsou kontaktovány a smíchány s druhou termoplastovou pryskyřicí. Teplota směsi se potom řídí tak, aby se

vytvořil v podstatě ztuhlý profil předem tvarovaný. Krycí vrstva obsahující třetí termoplastickou pryskyřici se potom koextruduje na vnější povrch předběžného tvaru.^[119]

1.3.9.3 Mikro a nanovlákná

Mikrovlákná jsou charakteristická svou jemností pod 1dtex, neboli 1000 m vlákna má hmotnost pod 0,1 gram. Oproti tomu jsou nanovlákná charakterizována průměrem vlákna v jednotkách až stovkách nanometrů. Zde nemá cenu stanovovat jemnost v decitexech vzhledem k velikosti vláken. Mikrovlákná a nanovlákná, lze připravit různými metodami, ale nepropracovanější z nich je electrospinning (tento proces byl popsán v kapitole 1.3.7.2.^[121]

Rozdíl mezi mikrovláknem a nanovláknem můžeme vidět na obrázku 11. Nanovlákná je oproti mikrovlákně o hodně tenčí. Na obrázku 12 je pro ukázkou porovnáno nanovlákná s lidským vlasem.



Obrázek 11 - Porovnání mikrovlákná a nanovlákná^[122] Obrázek 12 - Porovnání lidského vlasu a nanovlákná^[123]

1.3.10 Vytvořeno na Fakultě chemicko-technologické, Univerzita Pardubice

Naše fakulta se už dříve zabývala vývojem vláken a to nejen z kyseliny hyaluronové. Tato kapitola je věnována patentům, které byly vytvořeny na Fakultě chemicko-technologické na Univerzitě v Pardubicích, za plnohodnotné spolupráce s firmou Contipro a.s. Dolní Dobrouč.

V roce 2012 byla zveřejněna přihláška k zahraniční průmyslové ochraně s číslem **WO 2012/089179**, která si nárokovala především přípravu vláken z *kyseliny hyaluronové* nebo jejich kovové sloučeniny. Příprava těchto vláken se děje za pomoci mokrého srážení

v koagulační lázni, ve které je alkohol s kyselinou. Následně se vlákna omyjí a vysuší. Ionty kovů, které zahrnuje patent, jsou Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Co^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . Tyto ionty se přidávají do spřádacího roztoku ve formě hydroxidu, uhličitanu nebo hydrogenuhličitanu, nechají se rozpustit a poté se zvlákní.

Název: Hyaluronic fibers, process of their preparation and use.

Inventoři: Burgert, Ladislav; Hrdina, Radim; Masek, David; Velebny, Vladimír.

Patenty získané na základě této přihlášky: CZ302994B6

KR1020140006851A

US20130309494A1

AR084642A1

EP02659035A1

EP02659035B1

ES2527546T3

JP2014502678A

DK2659035 T3

O rok později to byla přihláška **WO 2013/167098**, která se zabývala způsobem přípravy polysacharidových staplových vláken s následným použitím pro krytí ran. Vzhledem k tomu, že se polysacharidy netaví, nemohlo být využito metody „spunbond“. Proto se používá metoda tzv. mokrého zvláknění. Roztok polysacharidu ve vhodném rozpouštědle je protlačován různými typy trysek do lázně, ve které je nerozpouštědlo a dochází k srážení a formování vlákna. Tento dokument zahrnuje výrobu vláken z polysacharidů: *chitin*, *chitosan*, *schizophylan*, *xanthan*, *alginát*, *oxyceluloza*, *karboxymethylceluloza*, samozřejmě také jejich soli a různé směsi. Do dokumentu je zahrnuta i možnost metalizace vláken, ke které dochází v koagulační lázni, zrací lázni nebo kraticí lázni. Vzhledem k tomu, že charakteristická vlastnost staplových vláken je zkrácenost na určitou/neurčitou/náhodnou délku, dochází k řezání vláken buď ve zrací lázni, nebo se přesouvají do nové „kraticí“ lázně. Následně se vlákna promyjí alkoholem a usuší. Druhá část tohoto dokumentu se týká využití staplových vláken na krytí ran.

Vlákna se připraví postupem z první části a poté se vlákna odfiltrují, filtrační koláč se může dále zpracovat na požadovanou formu (slisováním nebo vložením třeba na polyamidovou tkaninu). Poté se promyje alkoholem a vysuší. Takovéto kryty ran jsou poté ve výhodné formě jako netkané textilie, mohou být nanесeny na vatě, papírovém materiálu nebo jiné podložce.

Název: *Method of preparation of polysaccharide fibers, wound covers that contain them, method of manufacturing of wound covers, and apparatus for preparation of polysaccharide fibers.*

Inventoři: Burgert, Ladislav; Hrdina, Radim; Velebny, Vladimir; Abdel-Lattif, Abdel Mohsen; Sulakova, Romana; Sobotka, Lubos; Betak, Jiri; Smirnou, Dzianis

Patenty získané na základě této přihlášky: CZ 304651 B6 20140820

KR 2015013281 A

US 20150119783 A1

Krom patentů můžeme nalézt i užitný vzor CZ **25712**, který byl zveřejněn v roce 2013. Podstatou toho dokumentu byla ochrana nového procesu výroby staplových mikrovláken obsahující *sulfadiazin stříbra* a samozřejmě možné použití pro kryty ran. Vlákna se připraví mokřým zvlákněním, jak už bylo několikrát výše probráno. Sulfadiazin stříbra se přidává do roztoku rozpuštěného polysacharidu (ve všech ukázkových příkladech byla použita kyselina hyaluronová), množství sulfadiazinu stříbrného bylo 2% nebo 4% (vzhledem k hmotnosti použité HA). Po usušení bylo pomocí metody optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem stanoveno množství stříbra.

Název: *Staplová mikrovlákna, kryty ran a bandáže.*

Inventoři: Burgert Ladislav, Hrdina Radim

Získaný užitný vzor: CZ 2013-25712

1.3.11 Contipro a.s

Česká společnost začínala v roce 1990 pod názvem „Connective tissue products“ (z čehož později vyšel název Contipro), tehdy se společnost věnovala výrobě produktů pojivových tkání na obyčejných kuchyňských robotech. V roce 1998 došlo k přelomu a začal se produkovat hyaluronan, který byl v první fázi využíván pouze pro veterinární účely. Vznikl velice úspěšný produkt Bonharen[®] a následně celá další řada veterinárních produktů. V roce 2004 se otevřel trh humanitní medicíny, první produkt, který na tento trh zavítal, byl Hyiodine[®]. Od té doby se společnost Contipro začala zabývat i dalšími vývoji a výzkumy, a díky tomu můžeme dnes nalézt okolo 60 aktivních patentů této společnosti a mnoho dalších vědeckých prací. A to nejsou jen patenty z oblasti kyseliny hyaluronové, ale také polysacharidů nebo technologických postupů pro výrobu.

Společnost Contipro a.s. vlastní patenty na přípravu staplových vláken, kontinuálních vláken, ale také nanovláken z kyseliny hyaluronové, nebo jejich směsí s jinými polymerními látkami. Díky neustálému výzkumu a vývoji v oblasti kyseliny hyaluronové je tato firma na vrcholu výroby HA pro celý svět a je tzv. leading company.

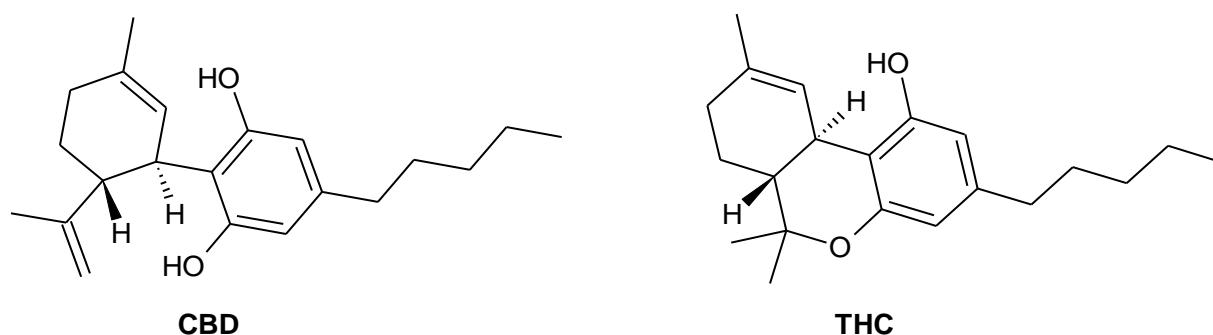
[91]

1.4 Biologicky aktivní látky

V této kapitole budou popsány jednotlivé aktivní látky, které jsme se rozhodli na kyselinu hyaluronovou navázat a to většinou z důvodu jejich vlastností a účinků na lidský organismus.

1.4.1 Kanabidiol

Kanabidiol (CBD) stejně jako Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) pocházejí z rostliny zvané *Cannabis* nebo česky konopí. THC se studuje už léta, ale poslední dobou se začala pozornost přesouvat ke kanabidiolu. Poprvé byl izolován z rostliny konopí koncem třicátých let a počátkem čtyřicátých let a jeho struktura byla objasněna až v roce 1963.^[124]



Obrázek 13 - Struktura CBD a THC

I přesto, že si jsou struktury CBD a THC velmi podobné, významně se liší jejich konformace. Zatímco THC existuje v planární konformaci, CBD přijímá konformaci, ve které jsou tyto dva kruhy více či méně v pravém úhlu k sobě. Výsledkem toho je, že CBD se neváže nebo neaktivuje receptor CB1, to je schopno aktivovat pouze THC. Díky této změně v konformaci má velmi nízkou afinitu pro oba známé kanabinoidní receptory (CB1 a CB2), CBD je tedy naprosto bez psychoaktivity na rozdíl od THC, což je psychoaktivní princip konopí.^{[125][126]}

Před podávání lidem bylo nutno provést mnoho *in vivo* i *in vitro* testů. V širokém rozsahu koncentrací nebyly zjištěny významné vedlejší nebo toxické účinky. Ani akutní podávání různými cestami nevedlo u lidí k žádnému významnému toxickému účinku. Kromě toho chronické podávání CBD po dobu jednoho měsíce zdravým dobrovolníkům (denní dávky v rozmezí od 10 do 400 mg) nevyvolalo žádné významné abnormality.

CBD má velmi nízkou toxicitu. LD₅₀ při intravenózním podání opici rodu *rhesus* byla 212 mg/kg. ^{[127][128]}

CBD sice nemá psychoaktivní účinky, za to má mnoho farmakologických účinků, díky kterým je právě tak moc zkoumanou látkou dnešní doby. Mezi nejčasněji zjištěnými farmakologickými účinky byly **antikonvulzivní účinky**. Ty byly už v sedmdesátých letech zjištěny při experimentování na zvířatech- účinky CBD byly srovnatelné s účinky difenylhydantion (DPH) a dalších léků, které jsou klinicky účinné při velkých záchvatech. Bylo také zjištěno, že CBD zvyšuje antikonvulzivní účinnost DPH a fenobarbitalu. ^[129]

Oba enantiomery CBD jsou antikonvulzivní. Je ale pravděpodobné, že fungují různými mechanismy. Zatímco přirozený (-)CBD se neváže na centrální kanabinoidní receptor CB1, bylo prokázáno, že syntetický (+)CBD se v malé míře váže na CB1. Mechanismus (-)CBD antikonvulzivní aktivity není přesně znám. ^[130]

Dalšími účinky CBD jsou **sedativní a anti-úzkostní**. Při orálně podávaným CBD myším bylo zjištěno, že sedativní účinnost (SD₅₀) byla 4,72 mg/kg. Také bylo zlepšeno učení se, vyhýbání se stresu ve stresových situacích, snížil se výskyt vředů vyvolaných stresem u myší. ^[131]

Farmakokinetika CBD je poměrně komplikovaná. Při intravenózním podání je CBD rychle distribuován, následuje prodloužená eliminace (terminální poločas = 9h). Po perorálním podání se CBD sotva absorbuje. Orální biologická dostupnost se pohybuje mezi 13% a 19%, což může být způsobeno efektem prvního průchodu. ^[127]

Jedna z nejdůležitějších schopností pro naši práci je **protizánětlivost**. Existuje mnoho studií, které dokazují protizánětlivý účinek, příkladem může být práce Costa, a spol. z roku 2004 (*Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw*). V této práci byly vyvolány záněty a edémy myším a následně léčeny za pomoci CBD. ^[132]

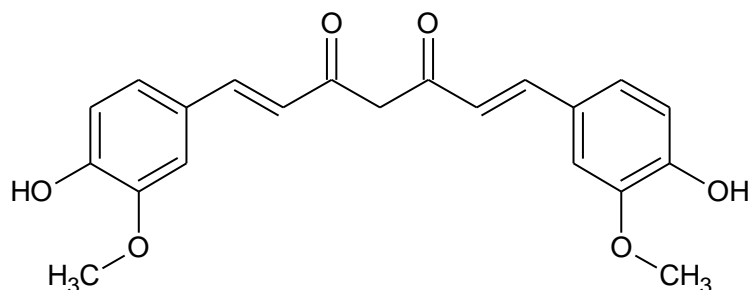
Další vlastnosti jsou **antidepresivní, antipsychotické a antioxidační**. ^[133]

Kanabidiol se také zkoumá v léčení dalších nemocí a to jsou například epilepsie, cukrovka, bipolární poruchy, schizofrenie a dokonce existují i studie věnující se možnosti použití CBD proti určitým druhům rakovině. ^{[134][135][136]}

Dnes se dají výrobky s CBD koupit po celé České republice, od formy olejíčků, přes kapky až po pasty. Většina z nich slibuje vyléčení především kožních problémů. V USA je, od začátku roku 2019, mezi mládeží velice populární HappyTea[®], což je prášek, který se vsype do jakéhokoli nápoje a poté vypije. V jednom takovém balíčku je přesně 10mg CBD, toto množství uživatelé slibuje potlačení úzkosti, deprese, stresu, ale také potlačení bolesti přírodní cestou. ^[137]

1.4.2 Kurkumin

Také jinak nazýváno přírodní žlut³, kurkumová žlut³, turmerova žlut³. V dnešní době můžeme toto barvivo nalézt především v oddenkách rostlin rodu kurkuma, ale také jako syntetické barvivo, které se využívá v potravinářství (označení E100).



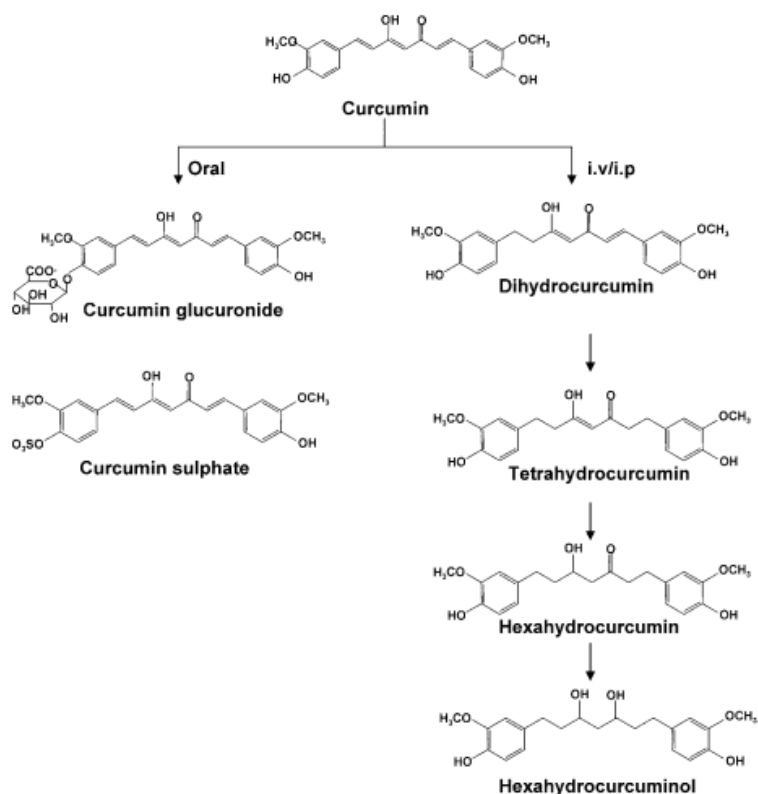
Obrázek 14 - Struktura kurkuminu

Kurkuma, odvozená z rostliny *Curcuma longa*, je zlato-barevné koření běžně používané na indickém subkontinentu, nejen pro zdravotní péči, ale také v potravinářství. Kurkuma je žlutá právě díky barvivu *kurkumin*, ten byl nejprve izolován před dvěma stoletími, a jeho struktura jako diferuloylmethan byla stanovena v roce 1910. Mnohé terapeutické účinky, díky kterým se kurkuma tak hojně využívala, byly díky rozsáhlým výzkumům připsány především kurkuminu. Bylo prokázáno, že kurkumin vykazuje antioxidační, analgetické, antiseptické, protizánětlivé, antivirové, antibakteriální, fungicidní a protirakovinové účinky, a má tak potenciál proti různým maligním onemocněním, cukrovce, alergiím, artritidě, Alzheimerově chorobě a dalším chronickým onemocněním. Tyto účinky jsou zprostředkovány regulací různých transkripčních faktorů, růstových faktorů, zánětlivých cytokinů, protein kináz a dalších enzymů. ^[138]

Kurkumin je hydrofobní, snadno rozpustný v dimethylsulfoxidu, acetonu, ethanolu a olejích. Má absorpční maxima kolem 420 nm. V kyselém prostředí se barva

kurkuminu mění ze žluté na tmavočervenou (v této formě se používá pro různé náboženské obřady).

Při perorálním podání se kurkumin metabolizuje na kurkumin-glukuronid a kurkumin-sulfonát. Když je podáván jinou cestou metabolizuje se na tetrahydrokurkumin, hexahydrokurkumin a hexahydrokurkuminol. Bylo prokázáno, že tetrahydrokurkumin je aktivní pouze v některých systémech. Aktivita ostatních metabolitů kurkuminu není známa. [139] [140] [141]



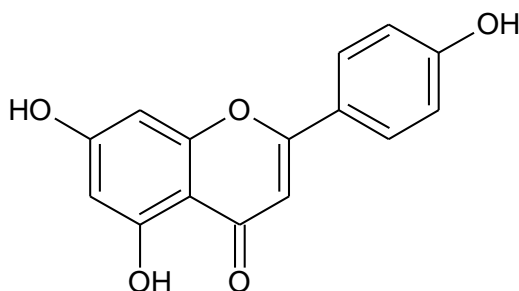
Obrázek 15 - Metabolizace kurkuminu^[142]

Kurkumin působí jako výborné protizánětlivé činidlo, a dodnes se používá na mazání při domácím ošetřování ran. V podstatě potlačuje aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, který reguluje expresi prozánětlivých genových produktů. Také snižuje expresi COX-2, enzymu spojeného s většinou typů zánětů, inhibuje expresi dalšího prozánětlivého enzymu 5-LOX. Kurkumin snižuje expresi různých adhezivních molekul buněčného povrchu, které jsou spojeny se zánětem, snižuje expresi různých zánětlivých cytokinů, včetně TNF, IL-1, IL-6, IL-8 a chemokinů. Bylo prokázáno, že kurkumin

inhibuje působení TNF, jednoho z nejvíce prozánětlivých cytokinů. A v nespolední řadě je to silný antioxidant, což může přispět k jeho protizánětlivému působení. ^[143]

1.4.3 Apigenin

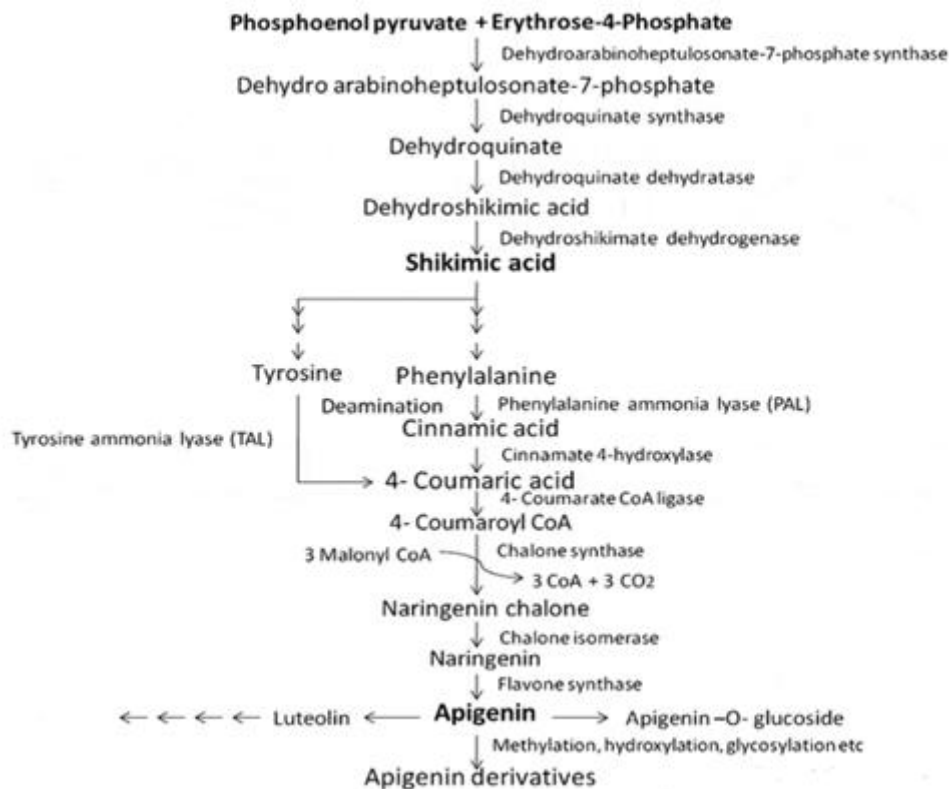
Apigenin patří do skupiny **flavonoidů**. Tyto látky jsou již více než století známy jako rostlinné produkty. Chemicky jsou to polyfenolické sloučeniny, které je možno nalézt ve všech potravinách rostlinného původu. ^[144]



Obrázek 16 - Struktura Apigeninu

Apigenin, chemicky známý jako 5, 7-dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-4H-chromen-4-one, je aglykonem několika přirozeně se vyskytujících glykosidů. Je to žlutá krystalická látka a používala se k barvení vlny. ^[145]

Apigenin je syntetizován v řadě rostlin jako sekundární metabolitů. Můžeme ho nalézt v petrželi, celeru, cibuli, pomeranči, kukuřici, rýži, některých typech tráv. Kdybychom se zaměřili na bylinky, najdeme Apigenin v heřmánku lékařském a třezalce tečkované. ^[146] Všechny flavonoidy jsou v podstatě syntetizovány rostlin z jedné základní dráhy nazývané cesta *shikimové kyseliny*. Tato cesta převádí jednoduchý sacharidový prekurzor erythrose-4-fosfát (E4P) a fosfoenolpyruvát (PEP) na aromatické aminokyseliny. Nejpočetnější třídy flavonoidů v rostlinách jsou odvozeny od deaminace fenylalaninu a tyrosinu na kyselinu skořicovou. Ta podléhá několika následným biosyntetickým syntézám, které produkují **Naringenin**. ^{[146] [147]}



Obrázek 17 - Biosyntéza Apigeninu^[148]

Apigenin se v posledních letech začal studovat blíže a ukázal se jako velmi prospěšný a zdraví podporující prostředek. Jeho nízká toxicita a pozoruhodně silné farmaceutické účinky proti řadě onemocnění by mohly být dále využívány.^[148] Většina těchto biologických účinků in vitro i in vivo souvisí s jeho antioxidačními a antigenotoxickými účinky a také s odstraňováním volných radikálů.

Apigenin má velice silné antioxidační účinky, které mají pravděpodobně významný vliv na cévní systém. Kyslíkové radikály mohou oxidovat LDL, které poškozují endoteliální stěnu a tím podporují aterosklerotické změny. Několik klinických studií ukázalo, že příjem flavonoidů chrání před koronárním onemocněním srdce. Apigenin se tedy považuje za látku s anti-aterosklerotickými účinky.^[149]

Jak bylo už výše zmíněno Apigenin má také protizánětlivé účinky, ty jsou způsobené inhibicí cyklooxygenázových a 5-lipoxygenázových pochodů. Cyklooxygenáza a lipoxygenáza hrají důležitou roli jako zánětlivé mediátory. Podílí se na uvolňování kyseliny arachidonové, což je výchozí bod pro celkovou zánětlivou reakci.^[150]

Antioxidační systémy nejsou často dostatečné a reaktivní kyslík z okolí může být impulsem pro karcinogenezi. Takováto forma kyslíku může poškodit DNA a rozdělení buněk, které následně vede k mutacím. Apigenin a ještě tři další flavonoidy mohou karcinogenezi inhibovat a jako silné antioxidanty ji potlačit. ^[151]

Pro naše využití jsou jedny z nejdůležitějších účinky antivirové a antibakteriální. Antivirové účinky obecně flavonoidů byly prokázány už v roce 1998. ^[152] I přesto, že se dodnes neprokázal jasny příspěvek flavonoidů proti viru HIV, na které byly testy nejvíce zaměřeny kvůli velkému rozšíření v osmdesátých letech, byly popsány inhibiční aktivity reverzní transkriptázy a antiproteázy. Bylo také zjištěnou ve své glykonové formě jsou flavonoidy více inhibiční na rotaviry než ty, které byly ve formě aglykonu (necukerný radikálový zbytek). ^[153]

Mezi další terapeutické účinky patří antiosteoporotické účinky, antitrombotické, dokonce byly popsány i účinky proti úzkosti. ^{[154] [155]}

1.4.4 Stříbro a zinek

Účinky stříbra jsou známé už od nepaměti a jeho užití v medicíně taktéž. Jeho časté používání bylo pozastaveno až objevením antibiotik. Jeho terapeutické použití se omezilo, ale v 60. letech minulého století byl zaznamenán velký nárůst opětovného používání. Dnes je prokázáno, že stříbro má účinek bakteriostatický. Tento účinek je vyvolán poškozením syntézy DNA bakterií, denaturaci RNA, a tím dochází k inhibici replikace bakteriálních buněk. Stříbro tedy tlumí zánětlivé reakce, efektivně působí na široké spektrum aerobních a anaerobních bakterií, gramnegativní mikroby, grampozitivní mikroby, na plísňe, kvasinky a viry. ^[156]

Toxicita stříbra k humánním buňkám je nízká. V roce 1999 bylo v USA zakázáno prodej produktů s koloidním stříbrem, hlavním důvodem bylo několik případů tzv. „blue peoples“, což byli dlouholetí uživatelé koloidního stříbra většinou ve formě kapek. ^[157] V České republice je koloidní stříbropovoleno pro zevní užití.

V dnešní době se zabudovává do různých materiálů sloužících k rehabilitačním, preventivním nebo léčebným účelům, a to ve formě nanočástic. Existuje několik

možností jak stříbro do materiálů zabudovat a je i několik variant, jak poté stříbro funguje.

Zinek je důležitý pro velké množství biochemických a fyziologických procesů v živých organismech. Hlavním zdrojem pro člověka je potrava, dobrým zdrojem jsou mořští živočichové, červené maso, ale také obilniny a ořechy. Deficit zinku může být vrozený nebo získaný (v důsledku nedostatečného příjmu z potravy). Při nedostatku dochází k různým onemocněním GIT, chronickým, nádorovým onemocněním. Při neléčených stavech může dojít až k onemocnění zvané srpkovitá anémie.

Tento biogenní prvek ovlivňuje téměř všechny aspekty imunitního systému. V závislosti na cílové buňce může být efekt zinku buď *inhibiční*, jako je tomu u degradace mastocytů, nebo uvolnění mediátorů trombocytů. Druhý efekt je *stimulační*, příkladem může být cytotoxická aktivita NK buněk nebo chemotaxe neutrofilů.

Už malé změny koncentrací v lidském organismu může vést k atrofii brzlíku, jehož funkcí je dozrávání T-lymfocytů (jejich hlavním úkolem je specifická buněčná imunita). B-lymfocyty jsou na koncentraci zinku méně závislé, ale i jejich produkce a vývoj může být narušen. Z toho vyplývá, že zinek je důležitý nejen pro imunitní systém, ale také funguje jako věrná podpora antioxidantních systémů. ^[158]

2 Experimentální část a získané výsledky

2.1 Použité přístroje

NMR spektra

Spektra ¹H NMR byla zaznamenána na přístroji *Bruker Avance III* pracujícím při 500 MHz ve společnosti Contipro a.s.

UV/Vis spektroskopie

Měření byla prováděna na UV-viditelném spektrofotometru *Perkin-Elmer Lambda 35* (při laboratorní metodě) za použití křemenných kyvet s optickou dráhou 1 cm.

Emisní a excitační spektra

Emisní a excitační spektra byla měřena na spektrofluorimetru *Perkin-Elmer LS55* vybaveném komerčním nízkoteplotním příslušenstvím a speciální kyvetou, která je komerčně dostupná.

Skenovací elektronová mikroskopie

Snímky vzorků byly provedeny na elektronovém rastrovacím mikroskopu v CPN Ltd., elektronovém mikroskopu *Tuscan VEGA II LSU* (Tuscan USA Inc.) za následujících podmínek: vysoké napětí 5 kV, pracovní vzdálenost 4,4 mm, sekundární elektrony zobrazovacího módu, vysoká teplota ve vakuu. SC7620 Mini Sputter Coater (Quorum Technologies, UK) aplikoval 15 nm vrstvy zlatých částic na vzorek. Vzorky byly odprášeny po dobu 120 s proudem 18 mA. Snímky byly zhotoveny za těchto podmínek: napětí 2,44–10 kV, detektor: SE. zvětšení 300–20000 krát, vysoké vakuum, vzdálenost mezi vzorkem a objektivem: 4 - 5 mm.

Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Stanovení stříbra, zinku a vápníku bylo provedeno za pomoci sekvenčního optického emisního spektrometru s ionizací v indukčně vázaném plazmatu značky *Integra XL2* (GBC Austrálie) s použitím keramického V-groove zmlžovače a cyklonické mlžné komory (Glass Expansion, Austrálie)

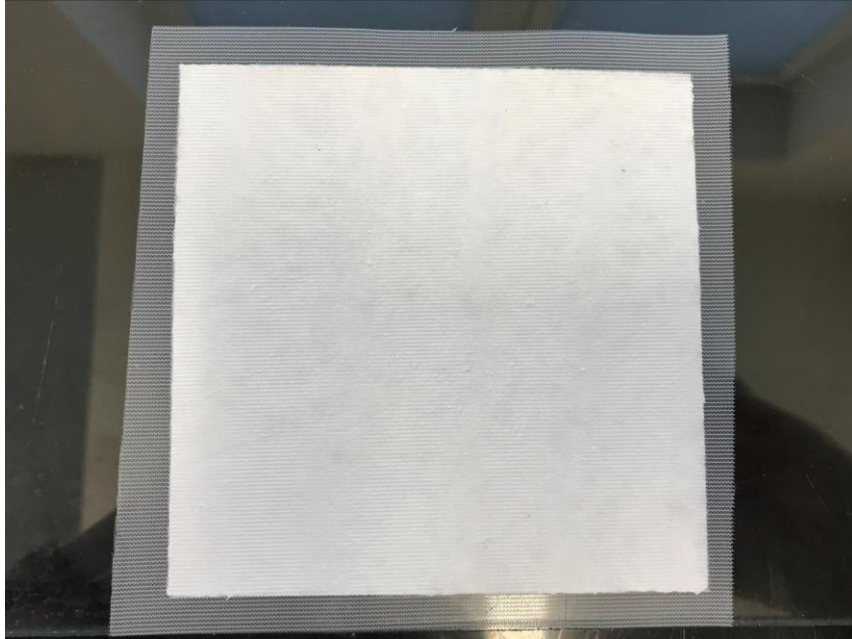
2.2 Zvláknění kyseliny hyaluronové

Kryty ran byly vytvořeny na naší Fakultě chemicko-technologické, přesněji na Oddělení syntetických polymerů, vláken a textilní chemie za pomoci doc. Ing. Ladislava Burgerta, CSc. Byly připraveny podle dokumentu **WO 2012/089179**, který byl již výše zmíněn v kapitole 1.3.10.

Kyselina hyaluronová, přesněji řečeno hyaluronan sodný, který byl použit v celé diplomové práci byl ze společnosti Contipro a.s. ve formě jemného bílého prášku a s molekulovou hmotností 1,7 MDa.

2.2.1 Postup zvláknění

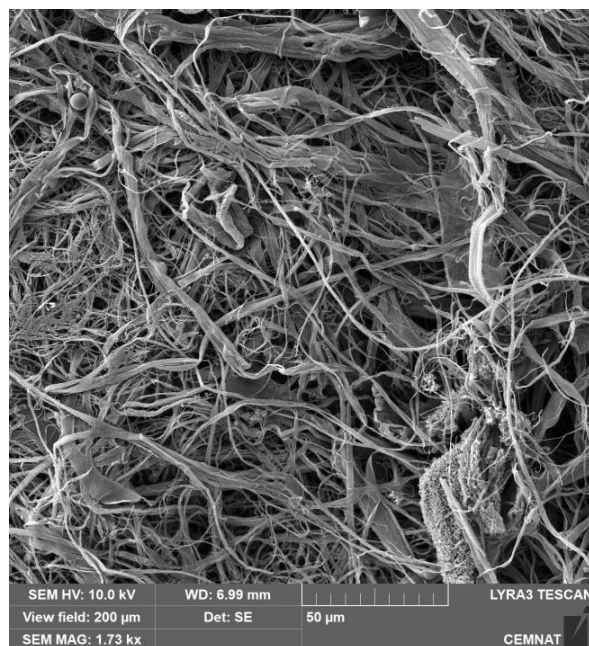
Za intenzivního míchání byl rozpuštěn 1 g hyaluronanu sodného v 100 ml destilované vody. Rozpuštění trvalo většinou přes noc, dokud se nevytvořil homogenní, dobře tekoucí viskózní roztok vhodný pro zvláknování. Připravený polymerní roztok byl dále zvlákněn za pomoci mokrého zvláknování. Roztok byl vstříkáván tryskou o průměru 0,4 mm do zvláknovací lázně, která obsahovala 500 ml propan-2-ol. Zvláknovací lázeň byla míchána dispergátorem Heidolph DIAX 900 při otáčkách 2500 za minutu. Takto vzniklé mikrovlákno bylo po zvláknění celého roztoku odebráno ze zvláknující lázně a přesunuto do lázně zrací. Tato lázeň obsahovala také propan-2-ol. Zde byla vlákna 60 minut ponechána, aby došlo k finální koagulaci. Po 60 minutách byla vlákna pokrácena v mixéru Eta-Ergo. Vlákna se poté vložila do speciálně upravené formy, kde byla připravena polyamidová pletenina. Roztok byl odfiltrován, získaný filtrační koláč byl slisován a usušen přilaboratorní teplotě. Na obrázku 18 je vidět konečná forma krytu na rány z kyseliny hyaluronové.



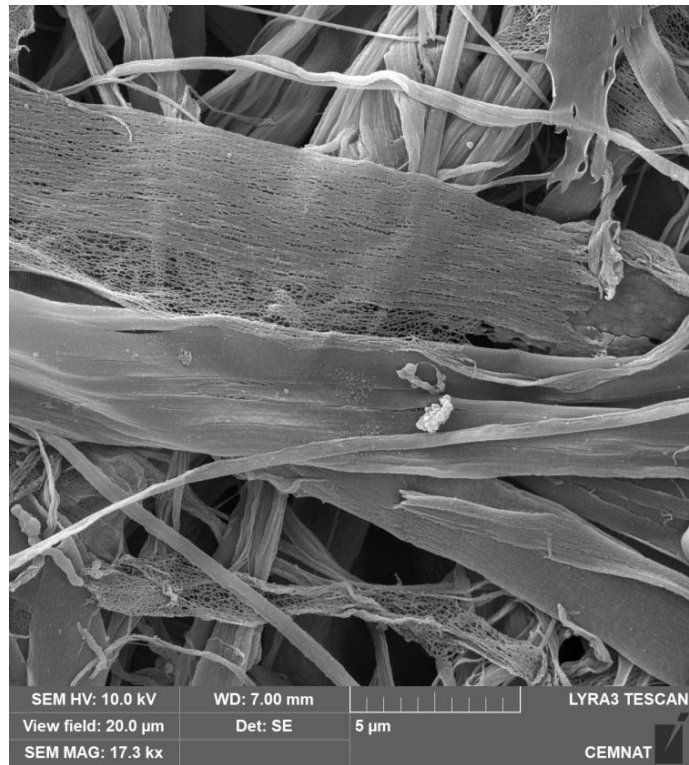
Obrázek 18 - Kryt ran ze staplových mikrovláken z HA

2.2.2 SEM snímky

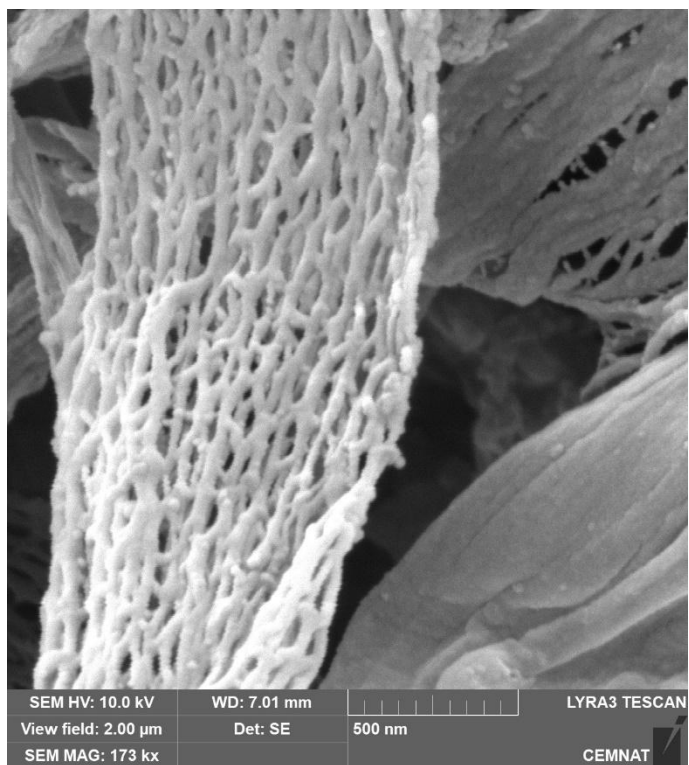
Díky spolupráci s Centrem materiálů a nanotechnologií na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice, byly provedeny snímky těchto a dále studovaných vláken za pomoci Rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM). Každý vzorek byl před měřením pokryt 16 nm vrstvou zlata s využitím planetární rotace a každý ze vzorků byl vyfocen na polích o velikosti strany scanu 2,20 a 200 μm .



Obrázek 19 – SEM, staplové vlákno nativní HA 200 μm



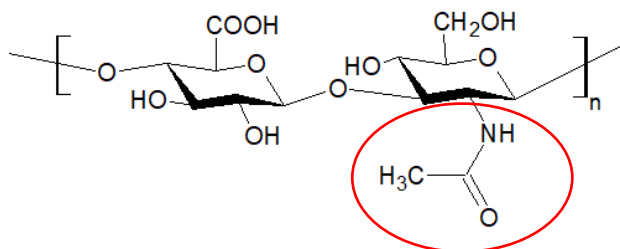
Obrázek 20 – SEM, staplové vlákno nativní HA 20 µm



Obrázek 21 – SEM, staplové vlákno nativní HA 2 µm

2.3 Acetylace vláken pro kryty ran

Zavádění acetylové skupiny do kyseliny hyaluronové má podle našeho názoru několik opodstatnění. Kyselina hyaluronová obsahuje sekundární amidovou skupinu, která při okolních podmínkách hydrolyzuje na skupinu aminovou.



Obrázek 22 – Struktura HA se zaměřením na amidovou skupinu

Polymer kyseliny hyaluronové má díky své struktuře (obrázek 22) a mnohým vodíkovým vazbám, které se v tomto polymeru vytváří (obrázek 7), rovinnou strukturu. Při bližším zaměření dochází k tomu, že rovinná 2D molekula se díky vytvoření skupiny $-NH_2$ (vytvoří se hybridizace sp^3) mění na molekulu prostorovou 3D. Díky této „nepatrné“ změně dochází ke změně mechanických vlastností, jako je pružnost a ohebnost vlákna. Vlákna jsou poté křehká a neohebná. Tomuto procesu se tedy snažíme zabránit a to zavedením acetylové skupiny na skupiny $-NH_2$.

Navázání dalších acetylových skupin na kryty ran má i další výhodu. Většina z patogenních bakterií způsobujících infekci ran u člověka vyžaduje hodnotu $pH > 6$ a jejich růst je při nižších hodnotách pH inhibován. Námi navázané acetylové skupiny, krom zamezení křehnutí a praskání vláken, zajišťují snižování pH v ráně díky uvolňující se kyselině octové. Snižující se pH vytváří prostředí, které není vhodné pro růst a množení bakterií. Už snížení na $pH 5,5$ zvyšuje aktivitu takovýchto krytí proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím.

2.3.1 Postup

Přes noc se nechal za intenzivního míchní rozpustit hyaluronan sodný 1 g ve 100 ml destilované vody. K homogennímu roztoku se přidaly 2 ml (2 % obj. vzhledem k vodě) acetanhydridu. Po zamíchání bych roztok připraven ke zvláknění. Použil se stejný postup jako u vytvoření krytu z čistého hyaluronanu. Ve zrací lázni byla vlákna ponechána opět 60 minut a poté zpracována stejným způsobem.

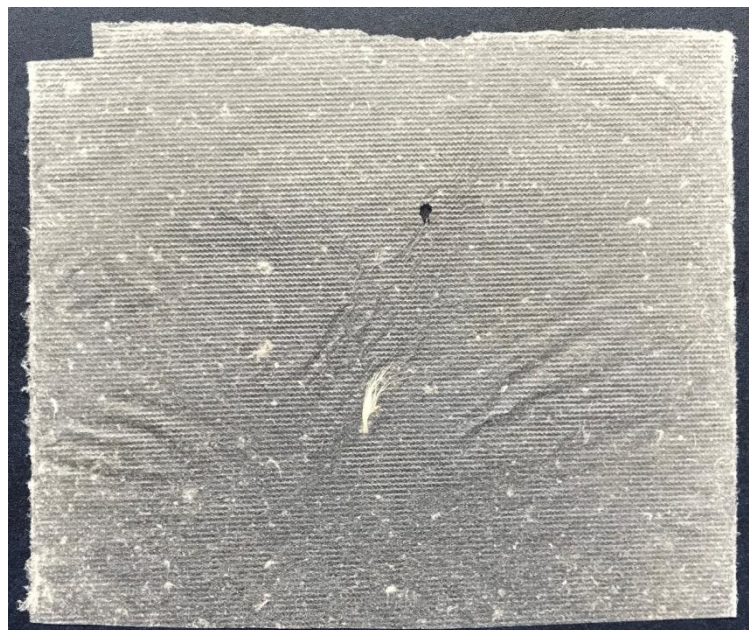
Po vytvoření krytu ran s 2 % (v/v) acetanhydridu byla vytvořena ještě jedna várka krytů, do které se přidávalo 10 % obj. acetanhydridu (10 ml).

Vzniklá vlákna s 2 % acetanhydridu, byla o trošku lepivější než z čisté HA, ale práce s roztokem byla horší než s čistou HA. U vláken s 10 % acetanhydridu, byl problém s lepivostí veliký. Při přesouvání vláken z koagulační lázně do lázně dozrávací se vytvořil jeden velký chuchvalec vláken, proto bylo nutné s 10 % acetanhydridu nechat vlákna v dozrávací lázni o dalších 60 minut déle. Nakonec se vlákna rozdělila a byla zpracována jako v přechozím postupu.

Na snímku 23 je vyfoceno krytí na ránu s obsahem 2 % acetanhydridu (pracovní název „acetylovaná HA“). Na snímku 24 jsou vlákna s 10 % obsahem acetanhydridu (pracovní název „silně acetylovaná HA“).



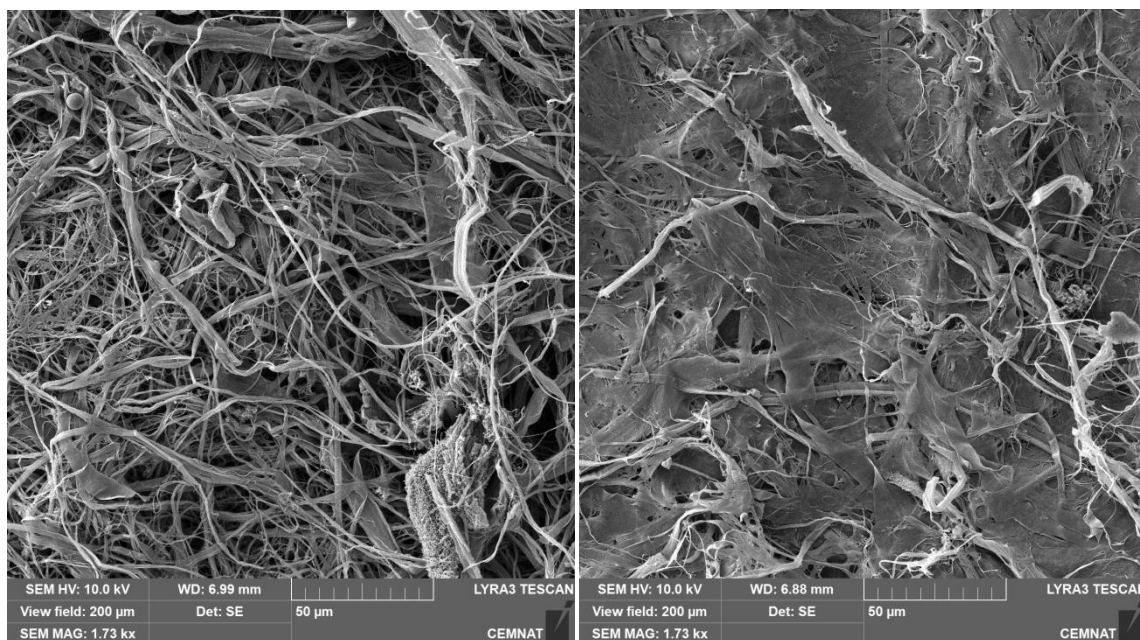
Obrázek 23 - Krytí ran z acetylovaných staplových vláken HA



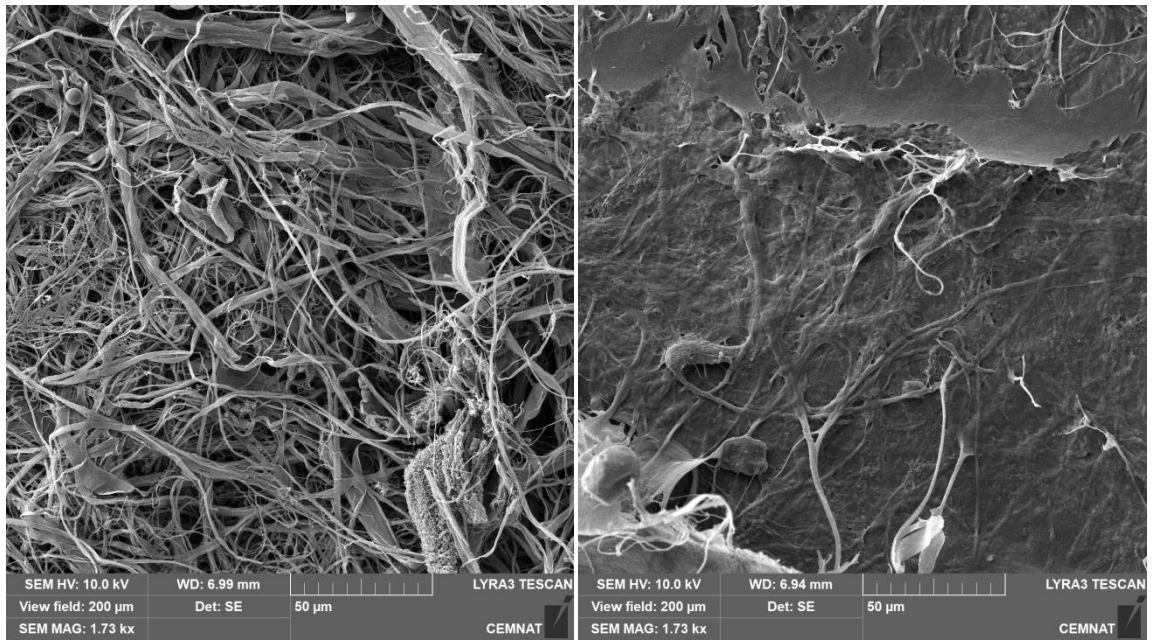
Obrázek 24 - Kryt ran ze silně acetylovaných staplových vláken HA

2.3.2 SEM snímky

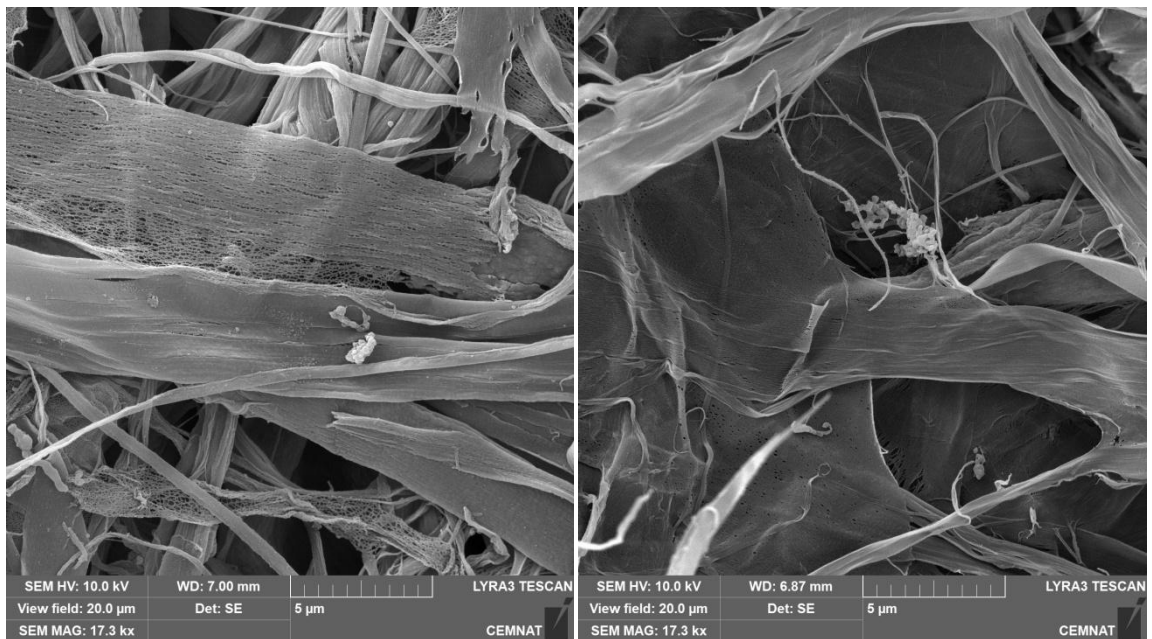
I tyto kryty byly zpracovány za pomoci SEM. Na snímcích 25 až 28 můžeme vidět vlákna z acetylované a silně acetylované HA vůči krytu z nativní HA. Největší rozdíl lze vidět na přiblížení 200 μm .



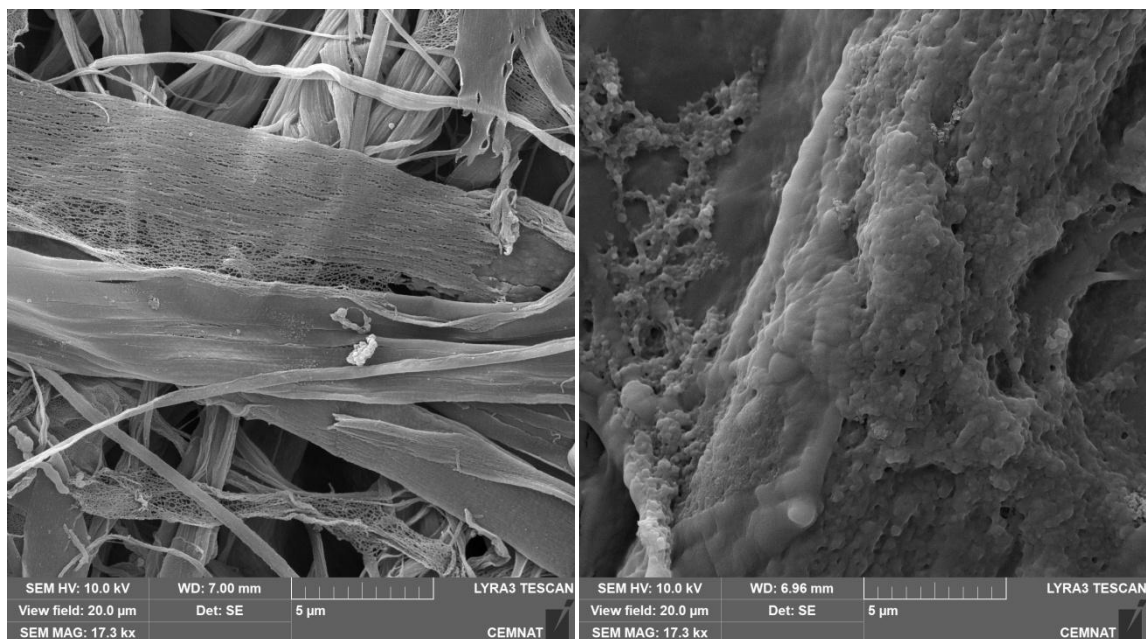
Obrázek 25 - Nativní (vlevo) a acetylovaná (vpravo) staplová vlákna HA 200 μm



Obrázek 26 - Nativní (vlevo) a silně acetylovaná (vpravo) staplová vlákna HA 200 μm



Obrázek 27 - Nativní (vlevo) a acetylovaná (vpravo) staplová vlákna HA 20 μm

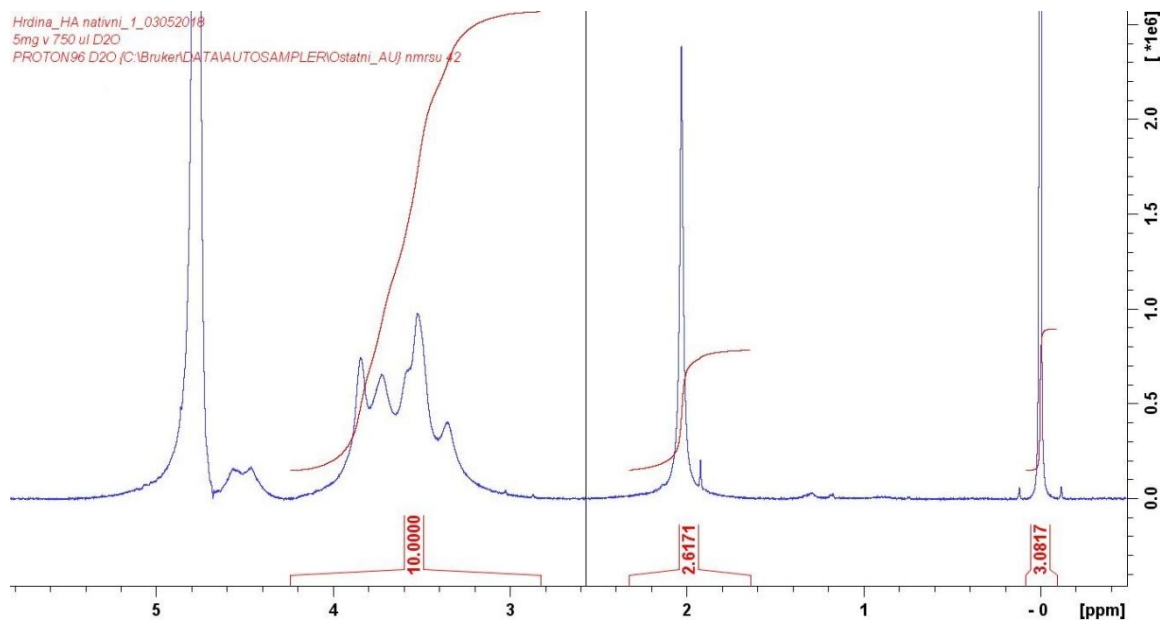


Obrázek 28 - Nativní (vlevo) a silně acetylovaná (vpravo) staplová vlákna HA 20 μm

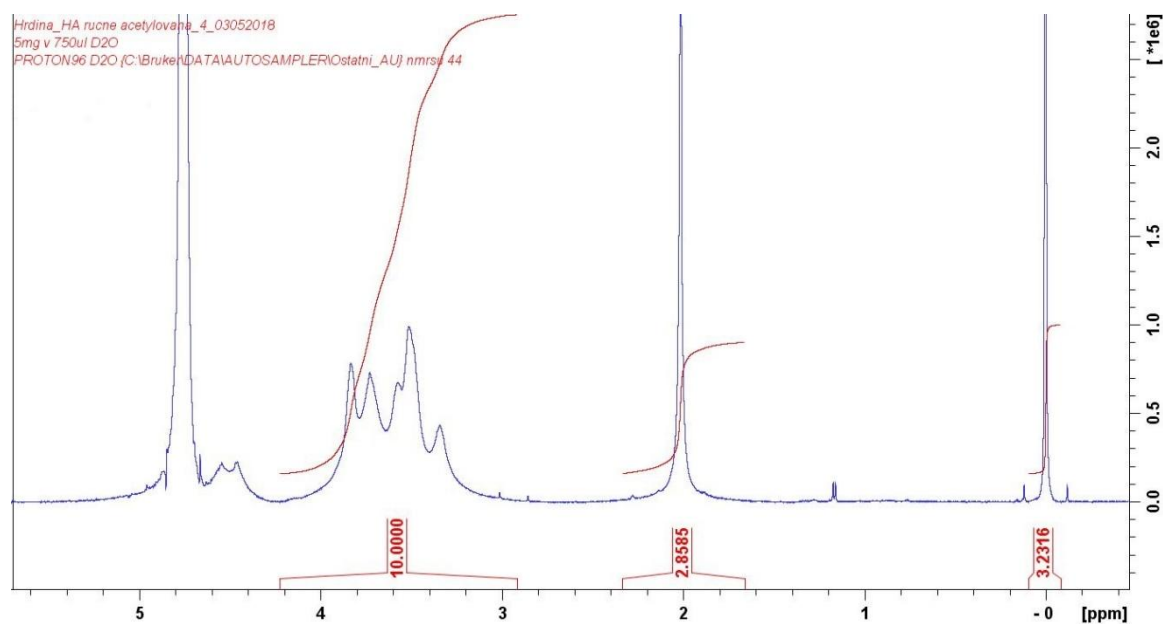
Při přiblížení 200 μm můžeme u silně acetylované HA zřetelně vidět, jak jsou vlákna v acetylovaných krytech slepená blíže k sobě a tvoří víceméně jednotnou síť.

2.3.3 NMR spektra

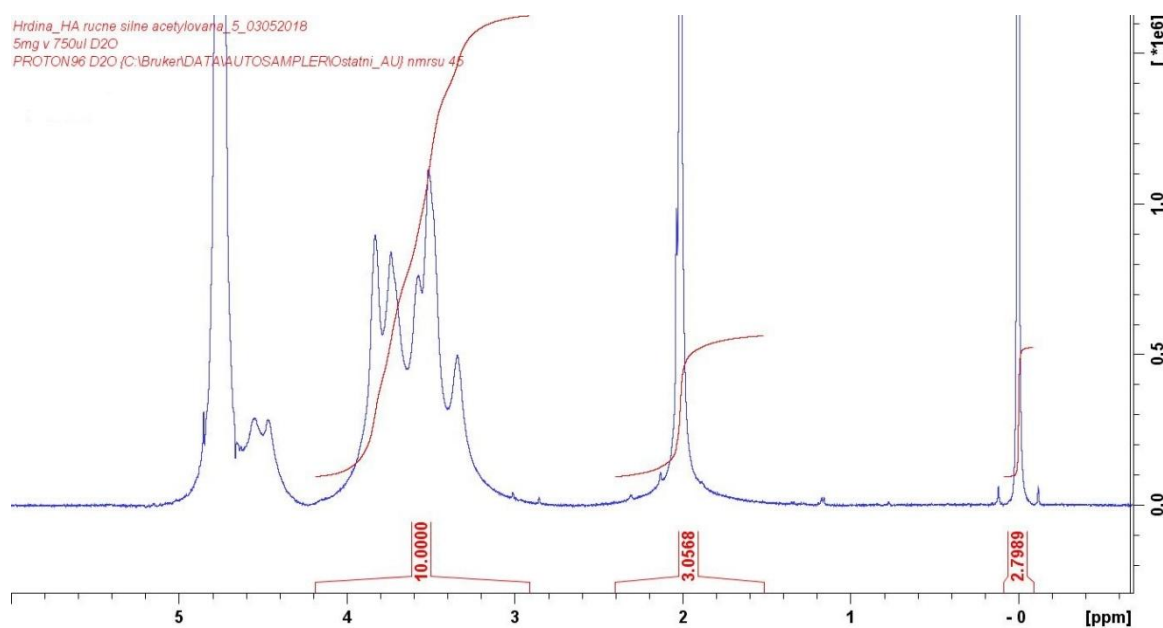
NMR spektra (^1H) byla proměřena ve společnosti Contipro a.s. Pro účely NMR analýz bylo 5 mg derivátu HA suspendováno v D_2O .



Obrázek 29 - NMR spektrum nativní HA (prášek)



Obrázek 30 - NMR spektrum acetylované HA (kryt rozpuštěn)

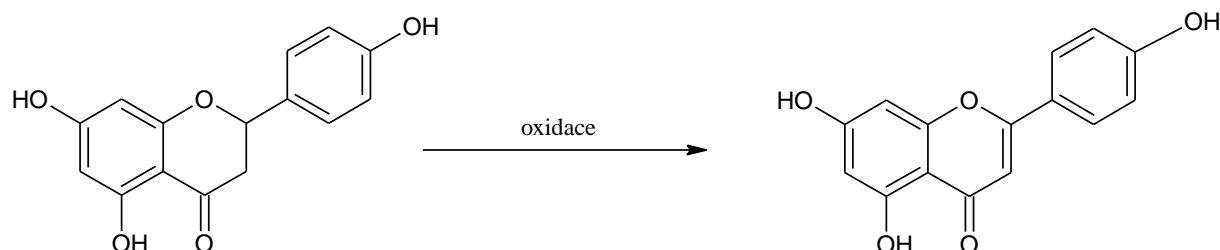


Obrázek 31 - NMR spektrum silně acetylované HA (kryt rozpuštěn)

Podle NMR spekter můžeme vidět nárůst acetylových skupin. V oblasti okolo 2 ppm je pík skupiny $-\text{CH}_3$, která pochází z acetylové funkční skupiny. V nativní kyselině hyaluronové, která byla dodána ve formě prášku ve společnosti Contipra obsahovala 2,6171; acetylovaná 2,8585 a silně acetylovaná 3,0568. Bylo potvrzeno určité zvýšení množství acetylových skupin, což může velice pomoci při hojení (vysvětleno na začátku kapitoly 2.3). Signál od 3 do 4 ppm byl ručně stanoven na 10, protože je to počet vodíků v cyklech na jedné jednotce HA.

2.4 Syntéza Apigeninu

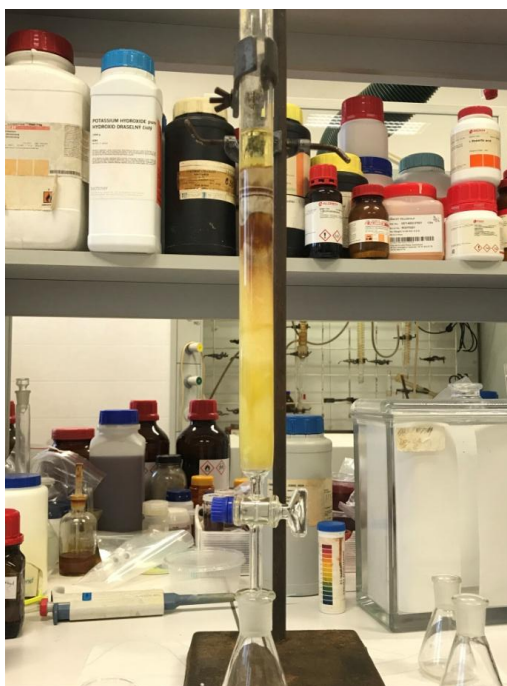
Apigenin, vzhledem ke své ceně byl syntetizován v laboratoři. Jeho příprava vychází z Naringeninů, který je možno izolovat z rostlin. Jedná se o oxidaci za pomoci jódu.



Obrázek 32 - Oxidace naringeninů na apigenin

2.4.1 Postup přípravy

Naringenin (2 g, 7.3 mmol) a 1,84 g I_2 se rozpustí v 10 ml pyridinu. Reakční směs je zahřívána na 90-100°C po dobu 4 hodin. Po zchlazení se roztok přefiltruje a filtrát je podroben sloupcové chromatografii (SiO_2 , Ether : CH_2Cl_2 1:3). Výsledkem dle předpisu měl být Apigenin ve výtěžku 1.85 g (93 %) ve formě bílých krystalků.^[159]



Obrázek 33 - Sloupcová kolona (apigenin)

I přesto, že byl dodržen postup, bylo připraveno pouhých 0,15 gramů. Toto množství bylo následně podrobena elementární analýze a byla zjištěna přítomnost dusíku. Vzhledem k malému výtěžku nebyla látka dále pročištěna ani dále měřena a od dalších pokusů bylo upuštěno.

2.5 Navázání biologicky aktivních látek

Mezi námi použité látky, které byly na HA kryty ran navázány, byl kanabidiol a kurkumin. Jak bylo už výše zmíněno, kyselina hyaluronová tvoří tzv. netkanou textílii. Aby zvlákněná HA pracovala jako TDDS, jako nosič léčivé látky, bylo nutno na ni aktivní látku pouze nanést a ne ji zabudovávat do řetězce, myšleno kovalentní vazbou. Takové nanesení muselo probíhat bez přítomnosti vody, protože kyselina hyaluronová by se v ní rozpustila. Většina tedy námi použitých látek byla rozpustná v alkoholech, použití propan-2-olu byla nejlepší volba.

Procesy, kterými byla látka (CBD a kurkumin) na kryty nanášena:

- 1) Namáčení
- 2) Nástřik
- 3) Kapičkování

Kanabidiol jsme měli od firmy XMED21, Praha. Kurkumin jsme objednali ze společnosti Sigma-Aldrich.

2.5.1 Postup pro proces namáčení

Vytvořený kryt ran, jako je na obrázku 18 o celkové hmotnosti 0,72 gramů byl namáčen ve 2% (m/m) roztoku CBD (1 gram rozpuštěn v 50 ml propan-2-olu (IPA) a lehce zahřán na 50°C pro lepší rozpustnost). Celý kryt byl rozstříhnut na 3 stejné části a každý byl ponechán při laboratorní teplotě v petriho misce po různou dobu. První část byla v roztoku namáčená po dobu 1 hodiny, druhá část 3 hodiny a třetí část 5 hodin.

2.5.2 Postup pro proces nástřik

Kryt ran z HA o hmotnosti 0,68 gramů byl za pomoci rozprašovače (Fisher-scientific - obrázek číslo 34). Tímto rozprašovačem bylo na krytí z HA rozprašeno 2% (m/m) roztok CBD v IPA. Nástříknuto bylo dohromady 15 ml tohoto roztoku na celý kryt.



Obrázek 34 - Rozprašovač s balonkem^[160]

V praxi by krytí přijíždělo na páse do rozprašovací komory, kde by trysky (jako na obrázku 35) rozprašovaly roztok biologicky aktivní látky na krytí. Velkou výhodou by bylo použití vyteplené komory přibližně k teplotě odpařování použitého rozpouštědla. Při opuštění rozprašovací komory a dovysušení rozpouštědla by se už krytí jen nakouskovalo.

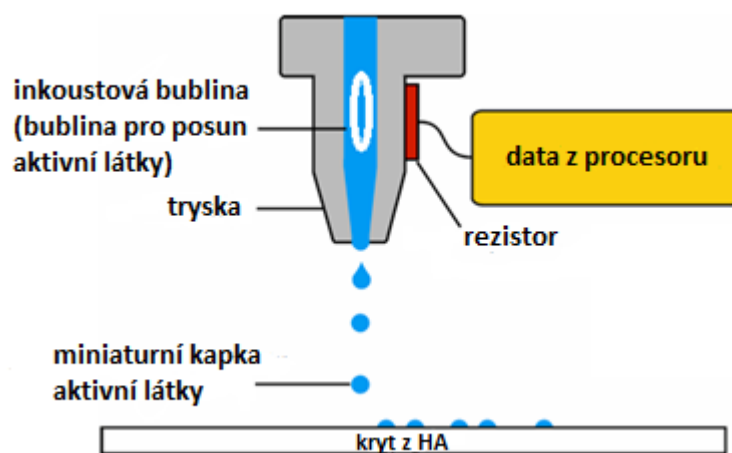


Obrázek 35 - Rozprašovací tryska (technologie v praxi)^[161]

2.5.3 Postup pro proces kapičkování

I pro tento proces bylo využito krytí z HA. Hmotnost krytu byla 0,71 gramů. U nástřiku bylo využito celkově 36 ml roztoku 2% (m/m) CBD. Roztok byl postupně, za pomoci injekční jehly s průměrem 1 mm, nakapičkován na kryt. Kapičky dopadaly v malých kapičkách v rozestupech cca 2-3 mm.

V průmyslovém měřítku by tato technologie mohla fungovat snadno na upravené polygrafické tiskárně. Místo papíru by sloužilo krytí a namísto barvy v zásobnících (cartrige) by se použil roztok s biologicky aktivní látkou. Na obrázku 36 je detail jedné trysky v tiskárně.



Obrázek 36 - Detail inkoustové trysky^[162]

Uvnitř trysky pracuje malý rezistor, který produkuje určitou teplotu (u inkoustu je to okolo 100°C). To způsobí, že se aktivní látka (u obyčejné tiskárny inkoust) rychle rozpíná a následně může uniknout pouze tryskou. Miniaturní kapka je vysokou rychlostí "vstřelena" přímo do krytu (do papíru). Následnými chemickými procesy dojde k fixaci aktivní látky (inkoustu) v místě, kde došlo k dotyku s krytem (papírem), tak že se nerozpíje.^[162]

2.5.4 Optická detekce biologicky aktivní látky (CBD a kurkuminu)

Roztok kanabidiolu je v zásadě bezbarvý, a proto byl problém s jistotou říct, na kterých místech byl roztok nástřikem rozprášen nebo nakapíčkován. Pro lepší orientaci bylo zvoleno barvivo, které bylo rozpustné ve stejných rozpouštědlech jako CBD a nebylo rozpustné ve vodě. Když už jsme zvolili víceméně přírodní biologicky aktivní látku, zvolili jsme i barvivo přírodní, jehož biologické vlastnosti pro lidský organismus byly jen výhodou. Tyto vlastnosti jsou popsány kapitole 1.4.2.

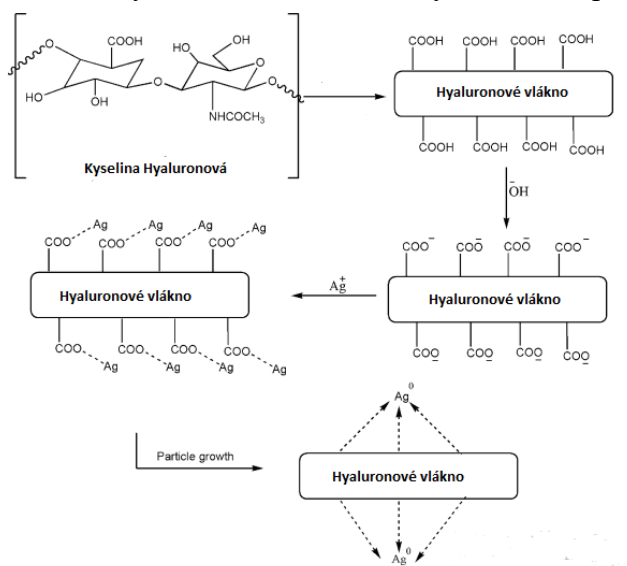
Do každého roztoku CBD bylo přidáno přesně 0,02 gramů kurkuminu (2% (m/m) vůči CBD). Aktivní látka (CBD) byla „označkována“. Roztok získal sytě oranžovou barvu a identifikace aktivní látky CBD byla poté na krytu snazší.

2.5.5 Navázání stříbra a zinku

Pro navázání těchto látek byly použity dvě metody. První metoda spočívala v přidání stříbra nebo zinku do zrcí lázně. Druhá metoda byla provedena pro získání porovnání množství navázaného zinku a stříbra. Druhá metoda spočívala ve vytvoření roztoku stříbra/zinku a nakapání na kryt.

2.5.5.1 Rozpuštění stříbra a zinku ve zrcí lázni

Při této metodě přípravy, docházelo k vytvoření už rovnou vláken s navázaným zinkem/stříbrem. V podstatě se vytvořilo vlákno, které bylo svázáno přes stříbro.



Obrázek 37 - Uspořádání vláken se stříbrem^[163]

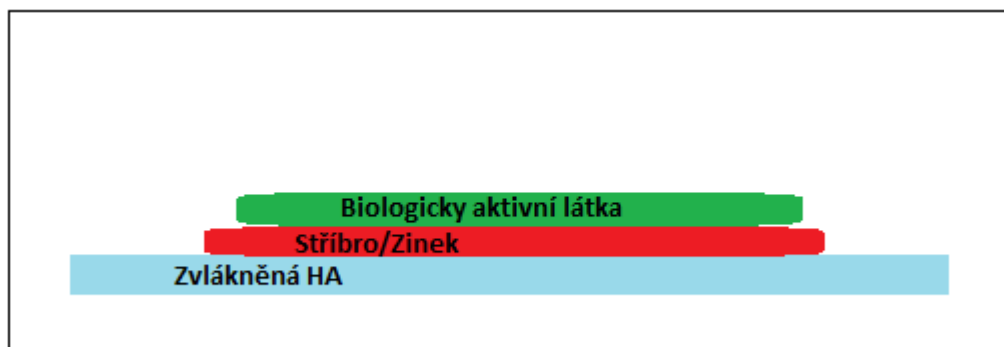
Ústav organické chemie a technologie vyrobil vlákna se stříbrnými nanočásticemi už dříve. Jako stříbrná sůl byl použit dusičnan stříbrný^[163] a sulfadiazin stříbra^[164].

Postup pro navázání stříbra: Hyaluronan sodný (1g) byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Homogenní, dobře tekoucí viskózní roztok byl zvlákněn za pomoci trysky o průměru 0,4 mm do zvláknovací lázně, která obsahovala 500 ml propan-2-ol. Zvláknovací lázeň byla míchána dispergátorem Heidolph DIAX 900 při otáčkách 2500 za minutu. Takto vzniklé mikrovláknno bylo po zvláknění celého roztoku odebráno ze zvláknující lázně a přesunuto do lázně zrací. **Tato lázeň obsahovala 0,1 g jodidu stříbrného** a 500 ml propan-2-olu (IPA). Zde byla vlákna 60 minut ponechána, aby došlo k finální koagulaci. Po 60 minutách byla vlákna pokrácena v mixéru Eta-Ergo. Vlákna se poté vložila do speciálně upravené formy, kde byla připravena polyamidová pletenina. Roztok byl odfiltrován, získaný filtrační koláč byl slisován a usušen při laboratorní teplotě.

Postup pro navázání zinku: Celý postup byl totožný jako u navázání stříbra, jenom do zrací lázně byl přidán **chlorid zinečnatý 0,1 g**.

2.5.5.2 Nanosení stříbra a zinku na krytí

Tento postup nám posloužil jako referenční k vytvořeným vláknům se zabudovaným stříbrem/zinkem. Došlo k vytvoření krytu ran, který měl tři vrstvy. Spodní vrstva byla z kyseliny hyaluronové (zvlákněné) na ní byla nanosená vrstva stříbra/zinku a jako svrchní vrstva byla ta s aktivní látkou. Obrázek 38 ukazuje schéma, jak takový kryt teoreticky vypadá.



Obrázek 38 - Schéma krytu ran ze tří vrstev

Postup pro nanesení stříbra: Na vytvořený kryt o hmotnosti 0,68 g byl postupně nakapikován roztok jodidu stříbrného (0,1 g v 30 ml IPA). Použito bylo 18 ml roztoku. Kryt s vrstvou stříbra se poté nechali vysušit za laboratorní teploty na vzduchu.

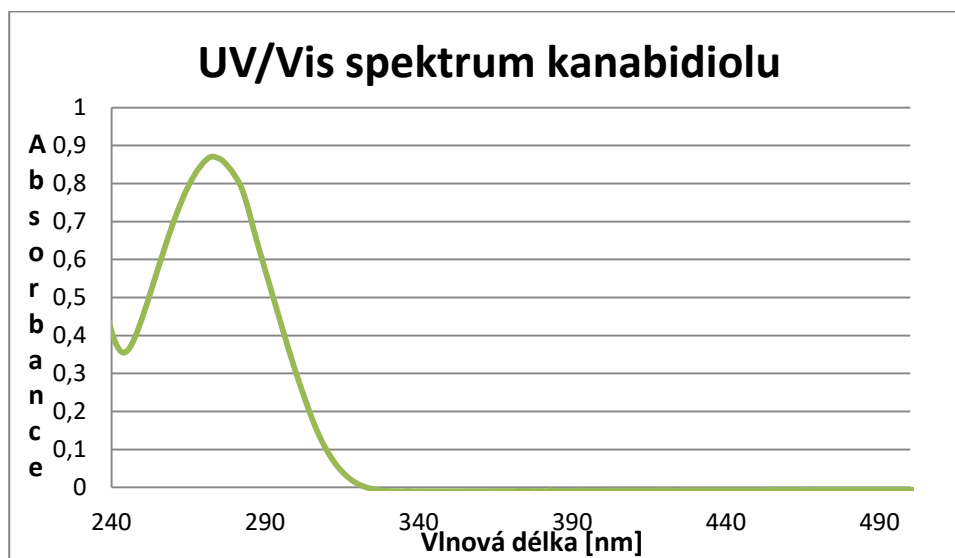
Postup pro nanesení zinku: Kryt s váhou 0,69 g byl použit jako podklad a na něj byl nakapikován roztok chloridu zinečnatého (0,1 g v 30 ml IPA). Použito bylo 20 ml roztoku.

2.6 Vyhodnocení navázaného množství aktivních látek

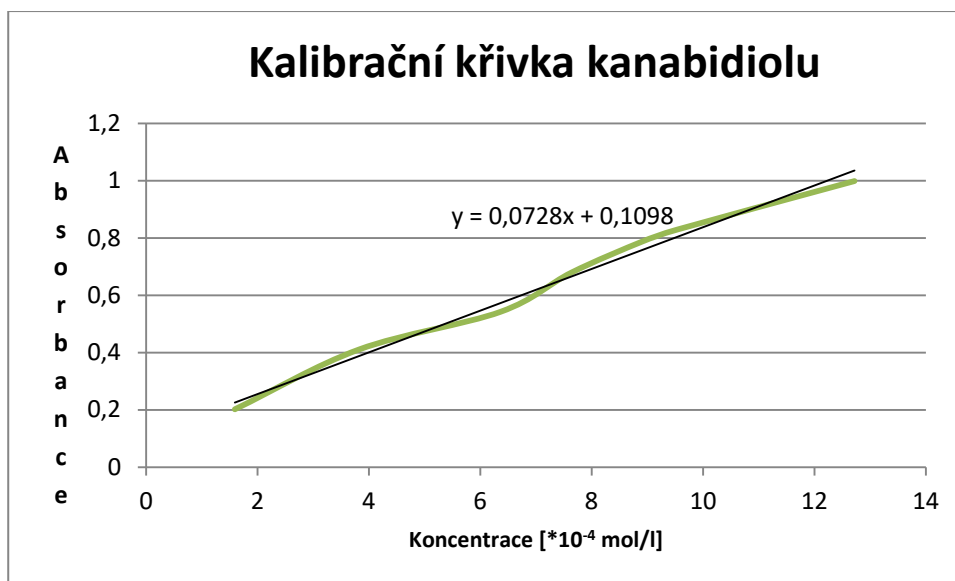
Velice důležitým faktorem, podle něhož můžeme rozpoznat, který proces byl úspěšný, je množství navázané látky na krytí z HA. Množství CBD bylo vyhodnoceno pomocí UV/Vis spektroskopie.

2.6.1 Kalibrační křivka CBD a kurkuminu

Kalibrační křivka pro kanabidiol byla sestavena ze 7 vzorků s takovou koncentrací, aby absorbance byla od 0 do 1. Kanabidiol má absorpční maximum při 273 nm.

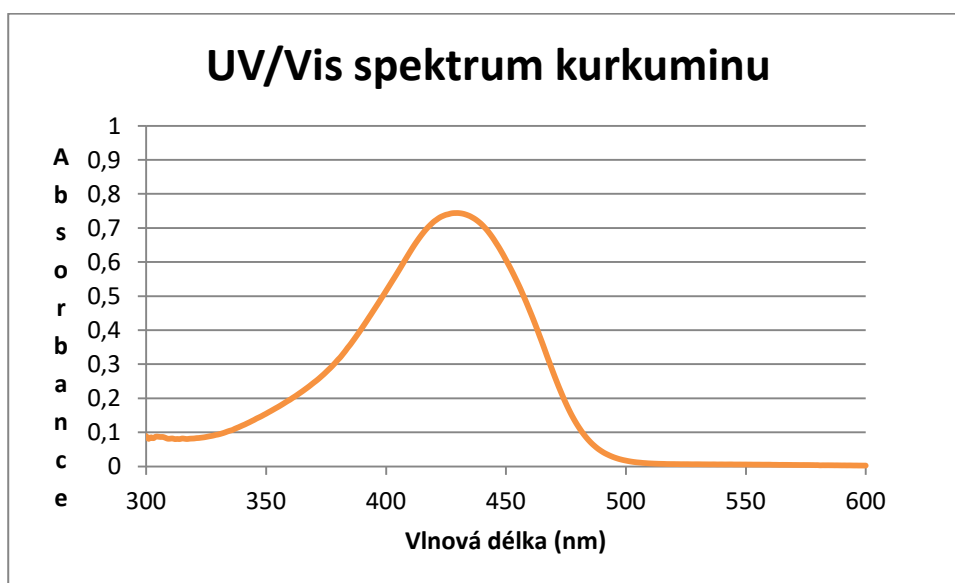


Graf 1 - UV/Vis spektrum kanabidiolu

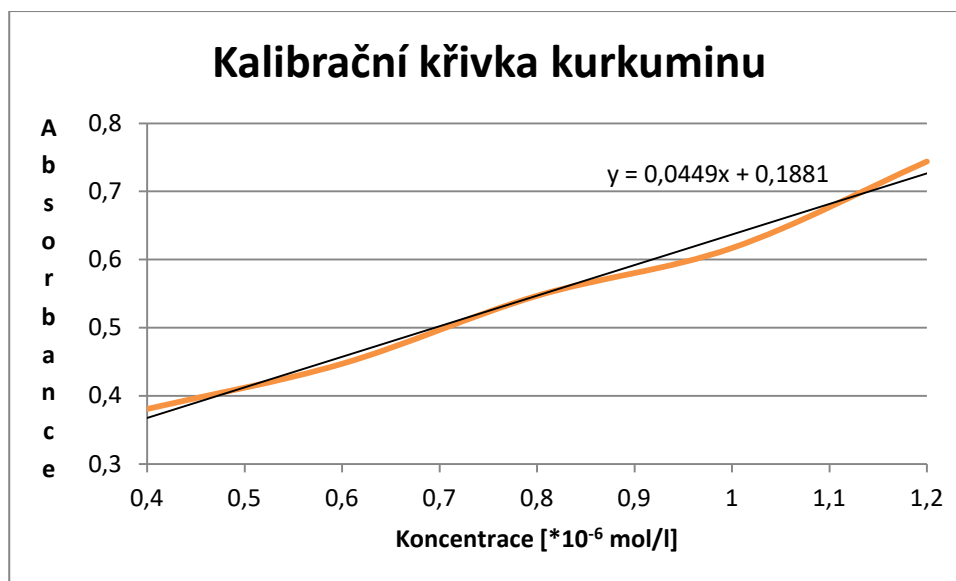


Graf 2 - Kalibrační křivka kanabidiolu

Kurkumin má absorpční maximum při 429 nm vlnové délky (graf 3). Kalibrační křivka kurkuminu, v grafu 4, byla sestavena z 8 kalibračních vzorků.

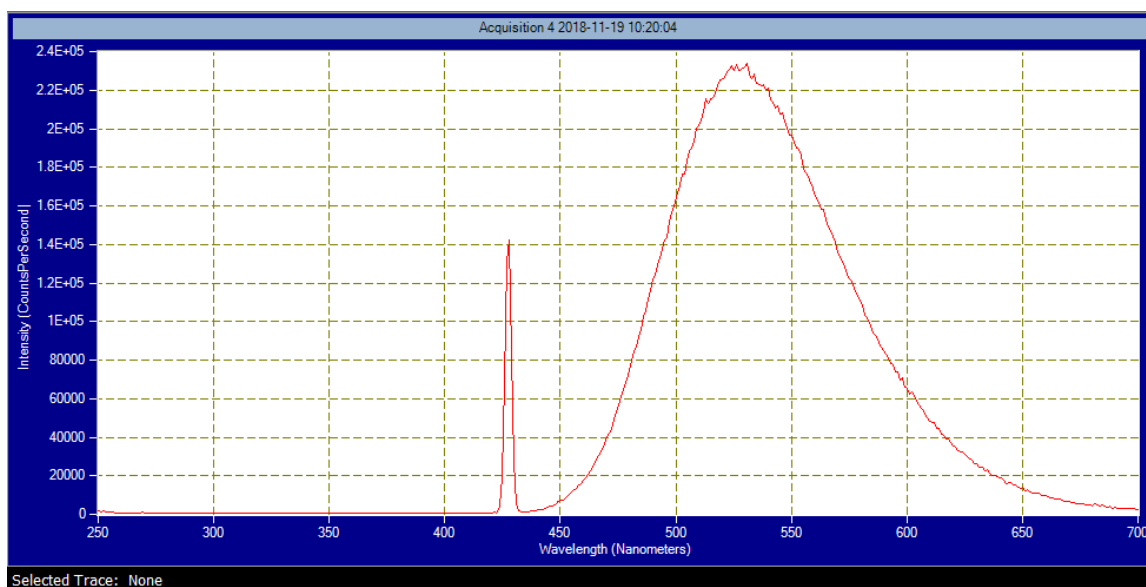


Graf 3 - UV/Vis spektrum kurkuminu

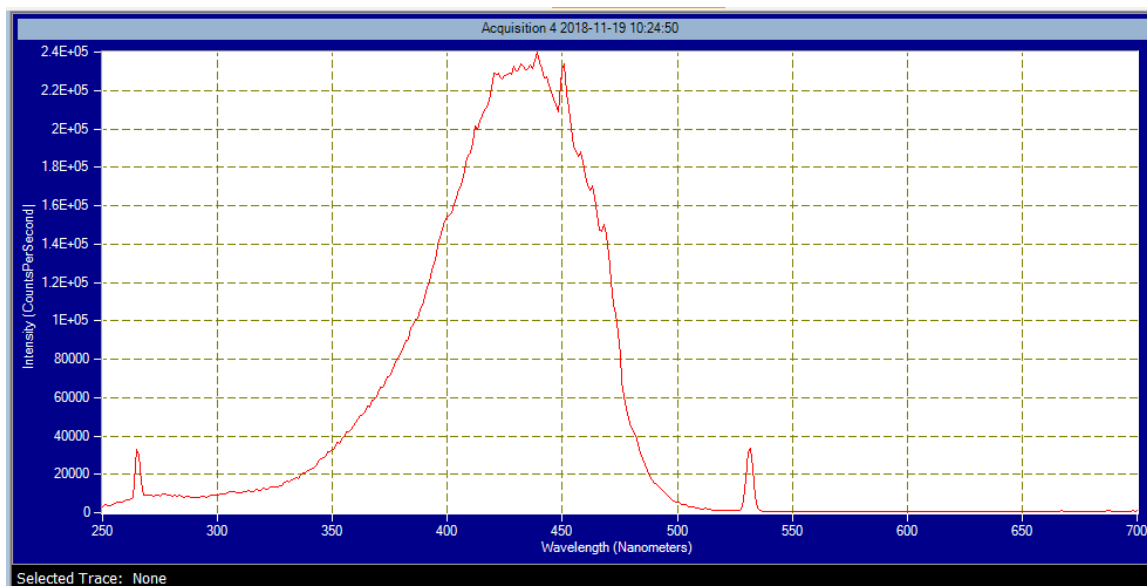


Graf 4 – Kalibrační křivka kurkuminu

Protože byl kurkumin použit jako barvivo, bylo nutné proměřit i emisní a excitační spektrum (viz obrázek 39 a 40).



Obrázek 39 - Emisní spektrum kurkuminu



Obrázek 40 - Excitační spektrum kurkuminu

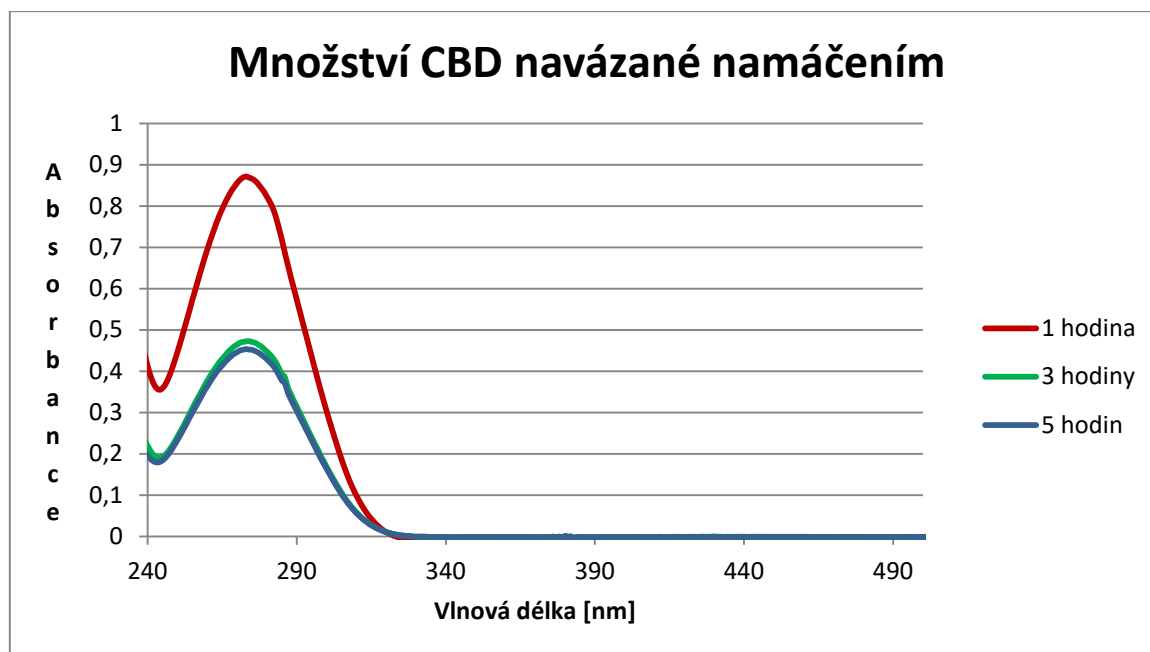
2.6.2 Vyhodnocení kanabidiolu a kurkuminu

Protože látky tvořené krytem a navázané látky jsou rozdílné povahy, bylo nutno nejprve látky oddělit.

Postup: Celý kryt z HA (hmotnost 0,65-0,75 g) byl vyvařen ve 150 ml propan-2-olu. Kryt v roztoku byl vařen po dobu 20 minut při 60°C. Poté byl roztok zfiltrován. Kanabidiol přešel do propan-2-olu a kryt, protože je v tomto rozpouštědle nerozpustný, zůstal v nezměněné formě. Dále byl roztok rozředěn a proměřen na UV/Vis spektrometru.

2.6.3 Výsledky vyhodnocování kanabidiolu a kurkuminu

a) Proces namáčení



Graf 5 - Množství CBD navázané namáčením

Z každého krytu byla odebrána 1/3 a vyvařena ve 25 ml propan-2-olu. Roztok byl zfiltrován. Pro výslednou absorbanci, kterou vidíme v grafu 5, byl odebrán z roztoku 1 ml a zředěn propan-2-olem na 25 ml. Absorbance byla dosazena do kalibrační křivky kanabidiolu, zjištěná koncentrace byla přepočítána na množství v gramech v 1/9 krytu a toto množství bylo následně přepočítáno na hmotnost CBD v celém krytu. Pro lepší přehlednost jsou hodnoty uvedeny v tabulce 1.

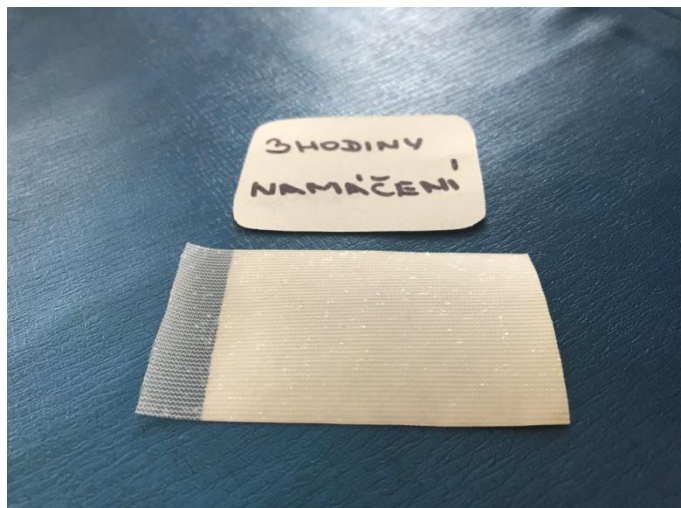
Tabulka 1 - Vyhodnocení množství CBD navázaného namáčením

	1 hodina	3 hodiny	5 hodin
Absorbance	0,87104	0,47216	0,45355
Koncentrace [mol/l] (z kalibrační křivky)	$1,045659 \cdot 10^{-3}$	$4,977473 \cdot 10^{-4}$	$4,721841 \cdot 10^{-4}$
Koncentrace [mol/l] (ve vyvařených 25 ml)	0,0261415	0,0124437	0,0118046
Hmotnost CBD [g] v 1/9 krytu	0,205629	0,097882	0,092855
Hmotnost CBD [g] v celém krytu	1,85	0,88	0,84
Hmotnostní procento vůči celému krytu (0,72 g)	72 %	55 %	54 %

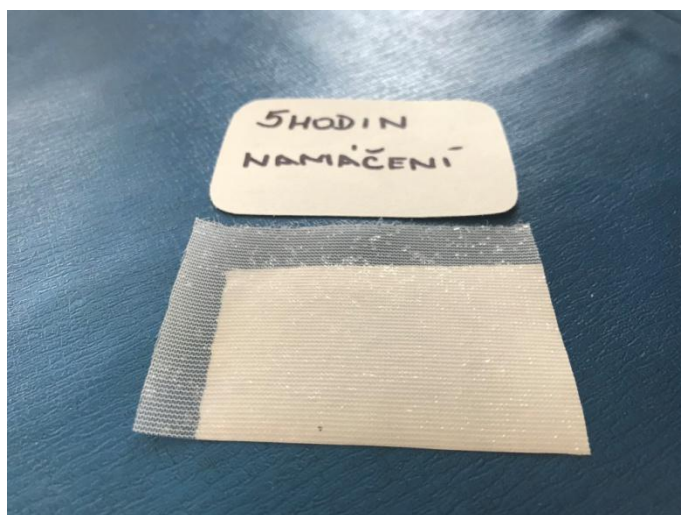
Na obrázcích 41-43 lze vidět, že sorpce kanabidiolu na staplová mikrovlákná z HA neprobíhá podle adsorpční izotermy, která v čase okolo 1 hodiny vykazuje určité maximum, kde v čase 3 hodiny systém v podstatě dospěje do rovnováhy. Znamená to, že v průběhu “namáčení“ krytu ve propan-2-olu dochází k jistým strukturálním změnám v nadmolekulární struktuře HA.



Obrázek 41 - Technika namáčení po 1 hodině

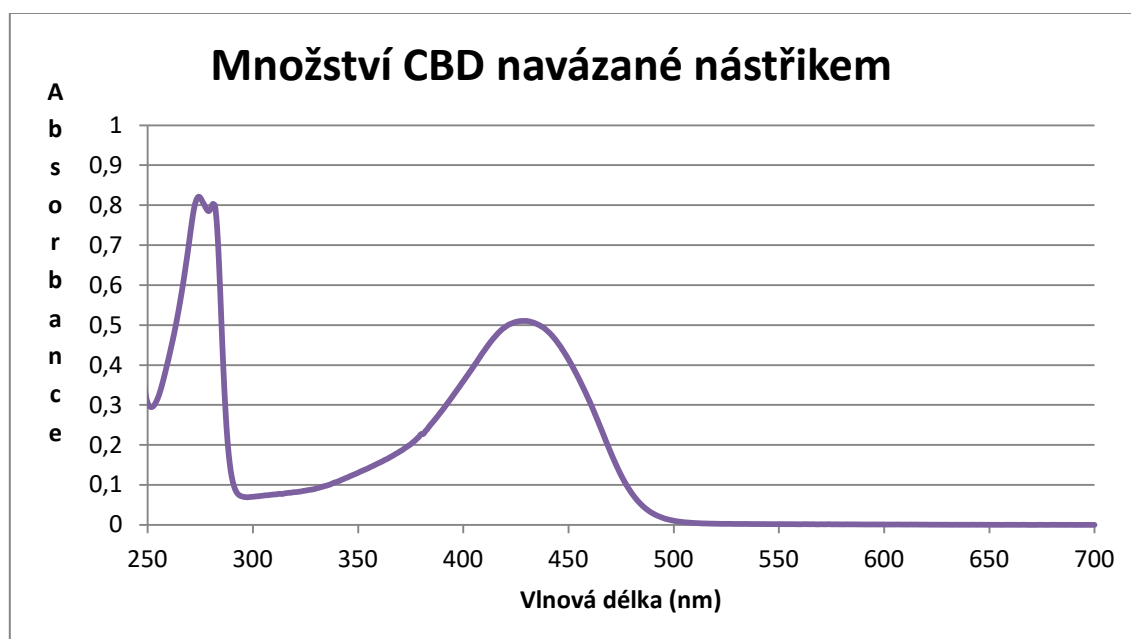


Obrázek 42 - Technika namáčení po 3 hodinách



Obrázek 43 - Technika namáčení po 5 hodinách

b) Proces nástřiku



Graf 6 - Množství CBD navázaného nástřikem

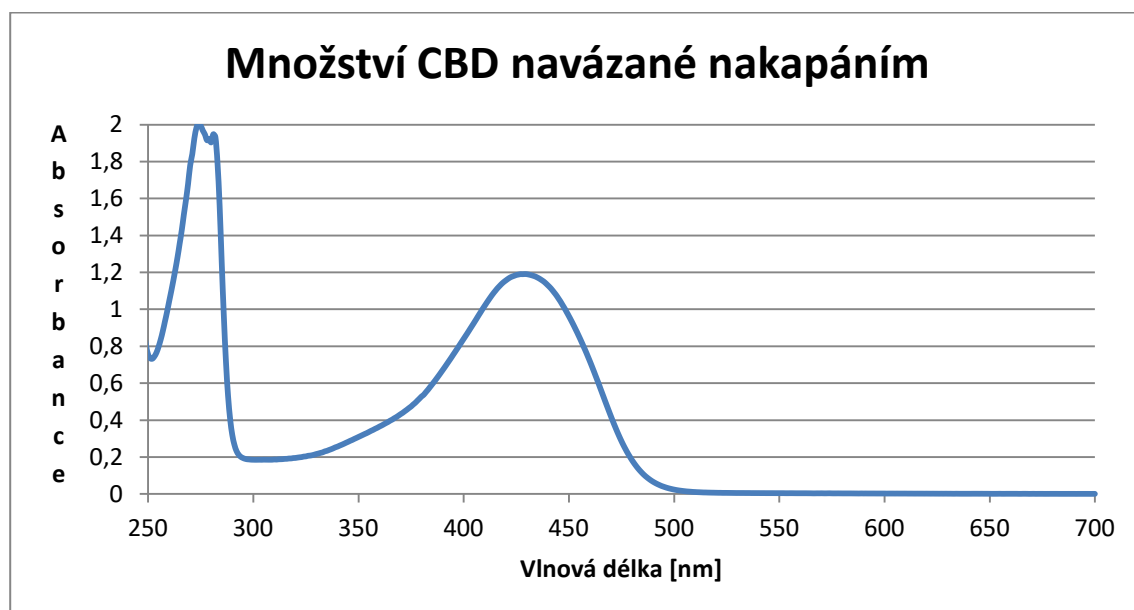
Pro měření byla použita 1/3 krytu (celý kryt měl 0,68 gramů), ta se nechala vyvařit v 50 ml propan-2-olu, při 60°C po dobu 20 minut. Z tohoto roztoku bylo odebráno 5 ml a rozředěno na objem 25 ml propan-2-olem. Naměřená hodnota byla dosazena do kalibrační křivky.

Tabulka 2 - Vyhodnocené množství navázaných aktivních látek nástřikem

Navázané látky	NÁSTŘIK	
	Kanabidiol (273 nm)	Kurkumin (429 nm)
Absorbance (měřený roztok)	0,82114	0,5106
Koncentrace (z kalibračních křivek)	$9,7715385 \cdot 10^{-4}$	$7,182628 \cdot 10^{-6}$
Koncentrace (ve vyvařeném roztoku)	$4,8857693 \cdot 10^{-3}$	$3,591314 \cdot 10^{-5}$
Hmotnost látky v 1/3 krytu	0,0769	0,000662
Hmotnost v celém krytu	0,23	0,00198
Hmotnostní procento vůči celému krytu (0,68 gramů)	25 %	0,3 %

Na celý kryt byla nastříknuta pouze jedna vrstva roztoku CBD+kurkumin a to činilo přesně 15 ml. Na nástřik byl použit roztok 1 g CBD a 0,02 g kurkuminu rozpuštěno v 50 ml. Když bylo použito pouze 15 ml, základní množství v tomto objemu bylo 0,3 g CBD a 0,006 g kurkuminu. Vypočtená účinnost navázanosti touto metodou by poté byla **76,7 % u kanabidiolu a 33 % u kurkuminu**. Vzhledem k tomu, že kryt z HA zde je principiálně jako podklad, mohlo by být určitě natříknuto větší množství takového roztoku a tím i zvýšit množství aktivní látky na krytu.

c) Proces nakapání



Graf 7 - Množství CBD navázané nakapáním

Pro měření byla použita 1/3 krytu (celý kryt měl 0,71 gramů), ta se nechala vyvařit v 50 ml propan-2-olu, při 60°C po dobu 20 minut. Z tohoto roztoku bylo odebráno 5 ml a rozředěno na objem 25 ml propan-2-olem. Naměřená hodnota byla dosazena do kalibrační křivky.

Tabulka 3 - Vyhodnocení množství navázaných látek nakapáním

	NAKAPÁNÍ	
Navázané látky	Kanabidiol (273nm)	Kurkumin (429 nm)
Absorbance (měřený roztok)	2,0082	1,19079
Koncentrace (z kalibračních křivek)	$2,6077 \cdot 10^{-3}$	$2,233163 \cdot 10^{-5}$
Koncentrace (ve vyvařeném roztoku)	0,0130385	$1,11658 \cdot 10^{-4}$
Hmotnost látky v 1/3 krytu	0,205122	0,002057
Hmotnost v celém krytu	0,615365	0,00617
Hmotnostní procento vůči celému krytu (0,68 gramů)	47,5 %	0,9 %

Na celý kryt byla nakápnuta látka ve třech vrstvách roztoku CBD+kurkumin a to činilo přesně 36 ml. Každá vrstva byla nakápnuta poté, co ta předchozí uschla, Na nakápnutí byl použit roztok 1 g CBD a 0,02 g kurkuminu rozpuštěno v 50 ml. Vzhledem k tomu, že bylo použito 12 ml na každou vrstvu základní množství v tomto objemu bylo 0,72 g CBD a 0,0144 g kurkuminu. Vypočtená účinnost, navázanosti touto metodou by poté byla **85 % u kanabidiolu a 43 % u kurkuminu.**

2.6.3.1 Vyhodnocení účinností použitých metod

Vzhledem k tomu, že na každou technologii bylo použito jiné množství roztoku, je nutné výsledky sjednotit do jednoznačného výsledku výsledku. V tabulce 4 je tedy vyjádřena účinnost každého procesu vzhledem k použitému množství roztoku.

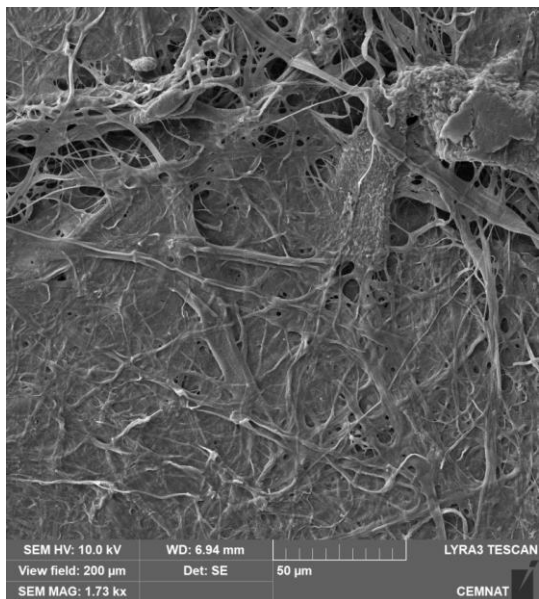
Tabulka 4 - Zhodnocení celkové úspěšnosti

	Namáčení	Nástřík	Nakapání
Účinnost navázání kanabidiolu	51,5 %	76,7 %	85 %
Účinnost navázání kurkuminu	-	33 %	43 %

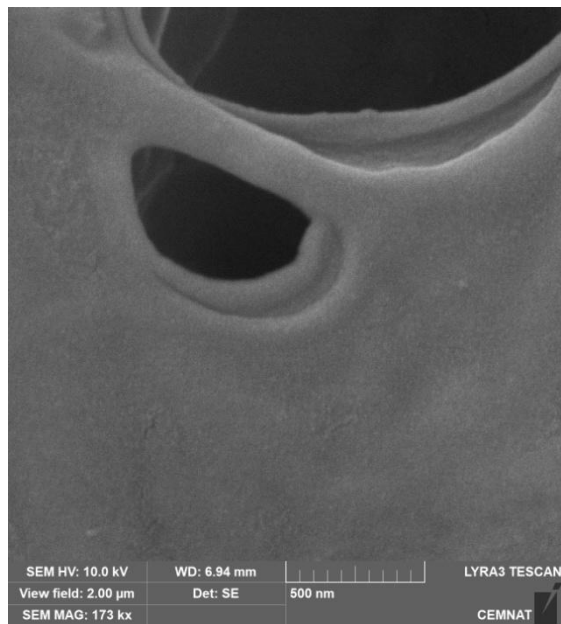
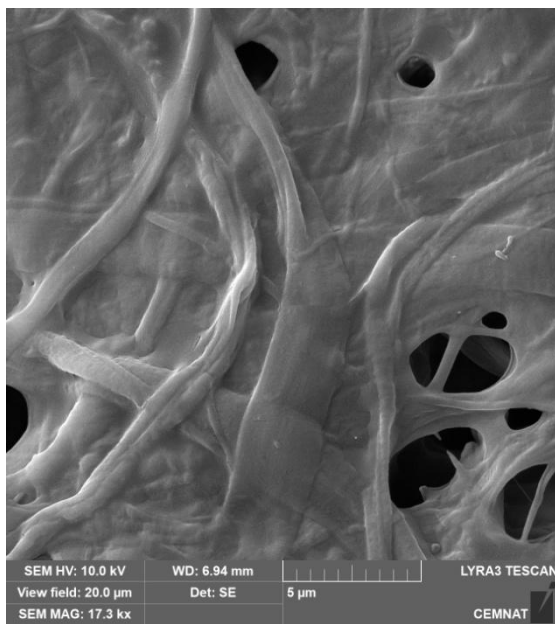
U procesu namáčení byla vybrána hodnota po 1 hodině, vzhledem k tomu, že byla nejvyšší. Tato hodnota byla vztažena ke 20 ml roztoku, protože v takovém objemu byly kryty namáčeny. Ostatní metody byly zhodnoceny už výše.

2.6.3.2 SEM snímky

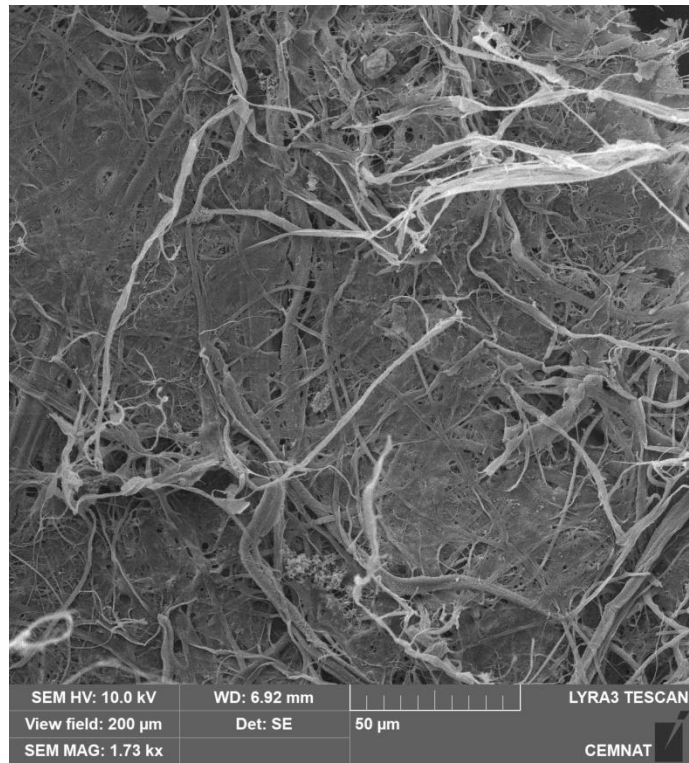
První tři snímky jsou kryt z HA s naneseným CBD, další tři snímky je na krytu nanesen kanabidiol i kurkumin.



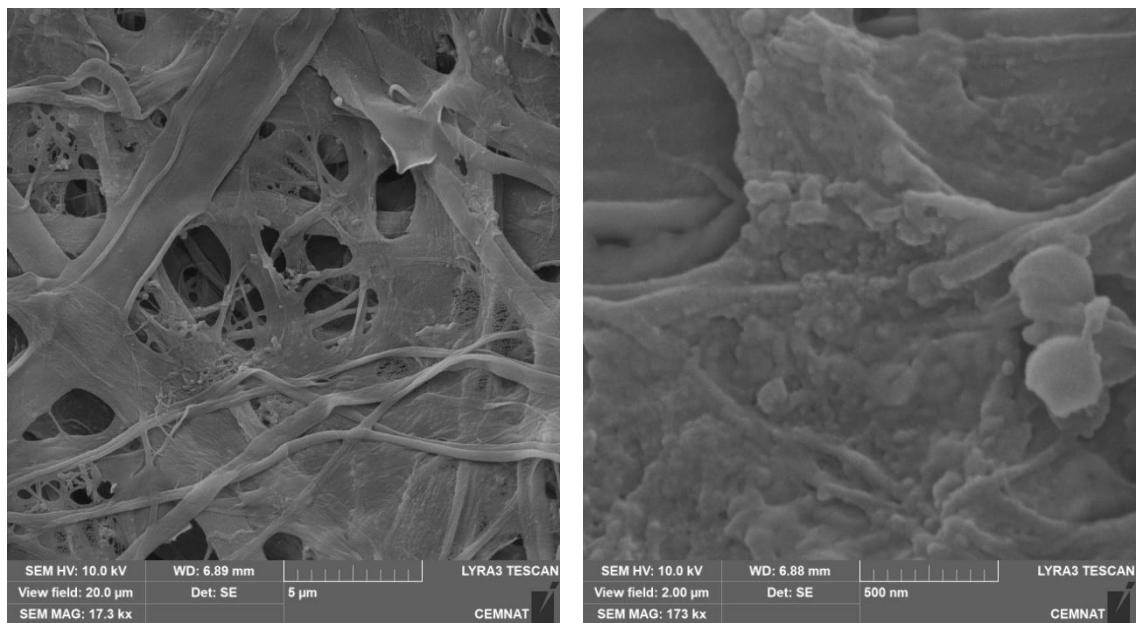
Obrázek 44 – SEM, staplová vlákna HA s CBD (kapičkování) 200 μm



Obrázek 45 – SEM, staplová vlákna HA s CBD (kapičkování) 20 μm a 2 μm



Obrázek 46 – SEM, staplová vlákna s CBD a kurkuminem (kapičkování) 200 μm



Obrázek 47 – SEM, staplová vlákna s CBD a kurkuminem (kapičkování) 20 μm a 2 μm

2.6.4 Vyhodnocení stříbra a zinku

Navázané stříbro a zinek byly vyhodnoceny doc. Ing. Annou Krejčovou, Ph.D. v laboratoři prvkové analýzy. Množství bylo stanoveno metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.

Pro porovnání byl podroben této metodě i prášek čistého hyaluronanu sodného, který byl využit ve všech procesech. Bylo stanoveno množství **zinku na 31,43 mg.kg⁻¹, vápníku na 2775 mg.kg⁻¹, a stříbro <5 mg.kg⁻¹.**

2.6.4.1 Stříbro

Stříbro bylo navázáno dvěma způsoby, první způsob využil stříbra při vytváření vláken a tyto ionty byly zabudované přímo v krytu. Druhý způsob byl nakapáním jodidu stříbra přímo na hotový kryt. Pro stanovení bylo nutno suché krytí rozstříhat a poté rozmělnit na menší části.

Stanovené výsledky z postupu v kapitole 2.5.5.1 (zabudování stříbra přímo do vláken) byl **3 791 mg.kg⁻¹.**

Pro postup nakapání z kapitoly 2.5.5.2 byl **42,39 mg.kg⁻¹.**

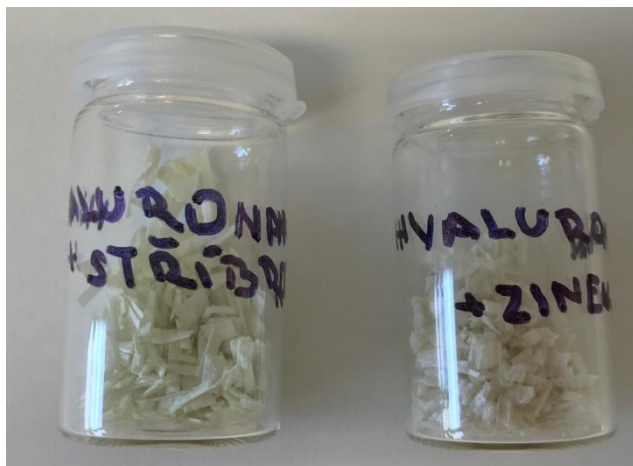
2.6.4.2 Zinek

I zinek byl navázán dvěma způsoby. Množství zinku se také stanovovalo pomocí optické emisní spektrometrie indukčně vázaným plazmatem, proto bylo nutné upravit vzorky krytů. Kryty byly nastříhány a rozmělněny na menší části.

Stanovené výsledky z postupu v kapitole 2.5.5.1 (zabudování zinku přímo do vláken) byl **66 950 mg.kg⁻¹.**

Pro postup nakapání z kapitoly 2.5.5.2 byl **62 865 mg.kg⁻¹.**

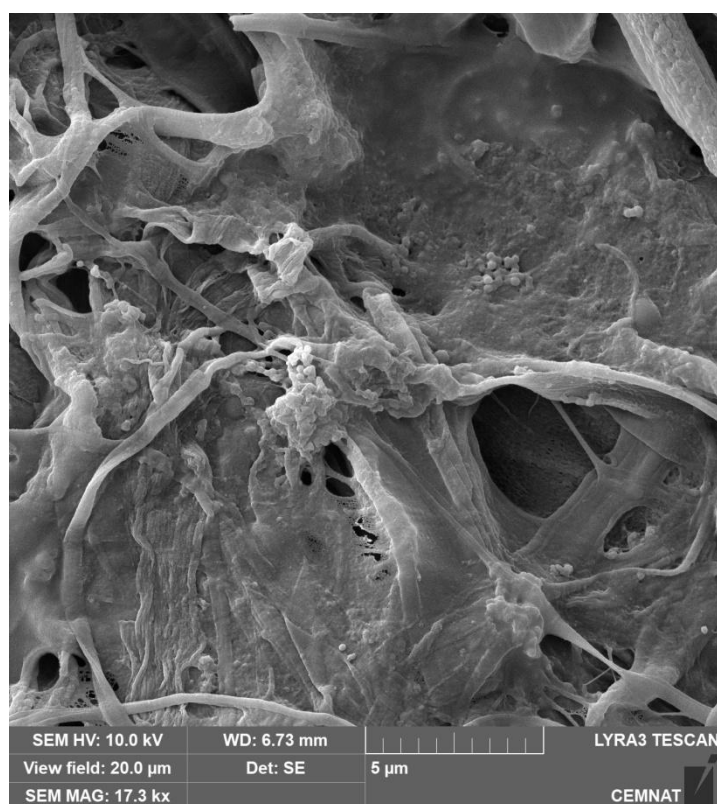
Jak můžeme tedy vidět u zinku, který byl ve propan-2-olu dokonale rozpustný, byly výsledky použitých metod podobné. U stříbra (jehož použitý chlorid nebyl dokonale rozpustný) je vidět rozdíl ve výsledcích. Při porovnání krytů, které byly vyrobeny postupem kapitoly 2.5.5.1, bylo patrné obarvení krytů se stříbrem a to do světle zelené barvy (viz obrázek 48)



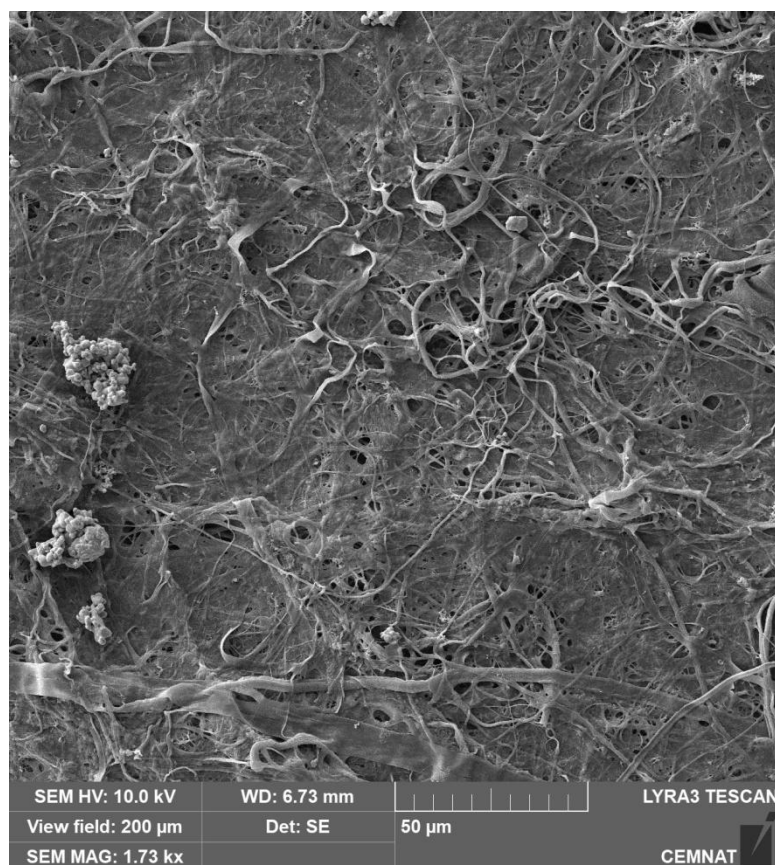
Obrázek 48 - Porovnání barvy krytu se stříbrem a zinkem

2.6.4.3 Třívrstvý systém jako TDDS

Dále byl vytvořen třívrstvý systém krytu ran, jež je znázorněn na obrázku číslo 38 (strana 69). Na kryt ran z HA (o hmotnosti 0,72 g) bylo nanášeno 20 ml roztoku jodidu stříbra. Po vysušení na vzduchu bylo na tuto vrstvu nanášeno nakapáním 36 ml roztoku CBD s kurkuminem. Takto vytvořený kryt byl zhodnocen SEM.



Obrázek 49 - SEM snímek staplových vláken s vrstvou stříbra a vrstvou aktivní látky 20 µm



Obrázek 50 - SEM snímek staplových vláken s vrstvou stříbra a vrstvou aktivní látky 200 µm

2.7 Stanovení biologické aktivity krytů ran

Z důvodu biologické aktivity samotných látek námi navázaných na kryty, bylo opodstatněné vyzkoušet i možné antimiktorbiální účinky. Hodnocení – testování – antimikrobiální účinnosti bylo provedeno na Katedře biologických a biochemických věd FCHT Univerzity Pardubice, pod vedením Ing. Ivety Brožkové, Ph.D.

Pro zhodnocení těchto účinků byly vybrány kryty z **čisté HA** (postup 2.2.1); **acetylované HA** (2.3.1); **HA s kanabidiolem** (2.5.3); **HA s kanabidiolem a kurkuminem** (2.5.3); **HA s kanabidiolem, kurkuminem a stříbrem** (HA+Ag podle 2.5.5.2 a kanabidiol s kurkuminem podle 2.5.3); **HA s kanabidiolem a se stříbrem** (HA+Ag podle 2.4.5.2 s kanabidiolem podle 2.5.3).

Testování bylo provedeno na gramnegativní bakterii (*Escherichia coli*); dále na grampozitivní (*Staphylococcus aureus*); na kvasince *Candida albicans*.

Postup: Prvním krokem u této metody byla příprava daného mikroorganismu v BHI bujónu (pro kvasinku *Candida albicans* v MALT bujónu) pro pomnožení bakteriálních buněk. Do zkumavky s 10 ml BHI bujónu se zaočkovala 1 kolonie příslušného mikroorganismu a tato zkumavka se nechala kultivovat 24 hodin při 37 °C. Po 24 hodinové kultivaci se z těchto suspenzí asepticky odpipetovalo 0,1 ml příslušného inokula na utuhlou živnou půdu a suspenze se rozetřela vatovou tyčinkou. Poté se asepticky pinzetou vložil testovaný krycí materiál rozměru 2x2 cm. Petriho misky s inokulovanými bakteriemi či kvasinkou byly kultivovány při 37 °C 24 a 48. Vše se provádělo vždy v dubletech. Po těchto časových údajích byly vždy odečteny inhibiční zóny kolem daného vzorku. Po odečtení těchto zón se asepticky odebral testovaný krycí materiál a z tohoto místa se provedl sěr na určení, zda má daný mikroorganismus bakteriostatický či baktericidní účinek.

Výsledky jsou pro lepší přehled v tabulce číslo 5.

Tabulka 5 - Výsledky antimikrobiálního testování

Vzorek	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)	<i>Candida albicans</i> MALT (mm)	<i>Candida albicans</i> M-H agar (mm)
Čistá HA	0	0	0	0
Acetylovaná HA	0	0	0	0
HA+CBD	4,5x1/BS	1x1*/BS	0	0
HA+CBD+Ag	2x2/BS	0	0	4x4/BS
HA+CBD+kurkumin	3x1/BS	1x1*/BS	0	3x3/BS
HA+CBD+kurkumin+Ag	3x2/BS	0	0	2x2/BS

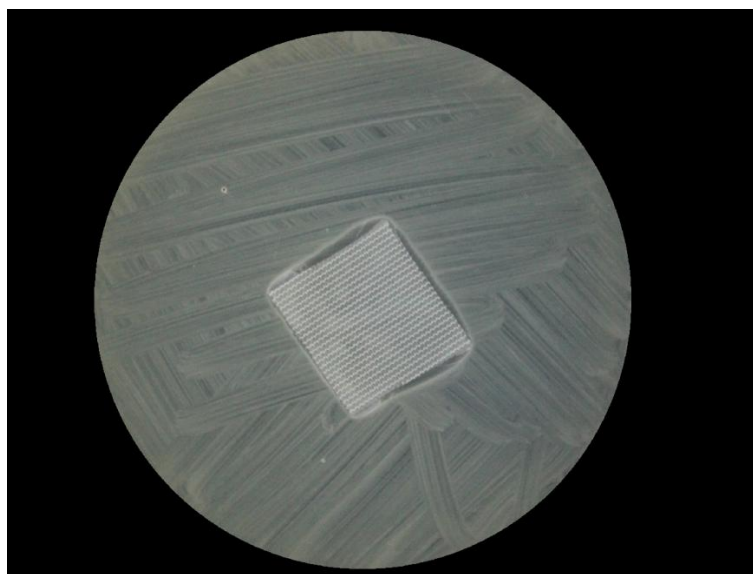
BS – bakteriostatický účinek

* - gelovitý vzhled uvolňující se pouze ve směru vláken pleteniny

Hodnoty v tabulce znamenají šířku inhibiční zóny kolem vzorků. Tato zóna je většinou nesymetrická. U *Escherichia coli* se účinek objevuje jen ve směru vláken pleteniny, nikoliv kolmo na ně.

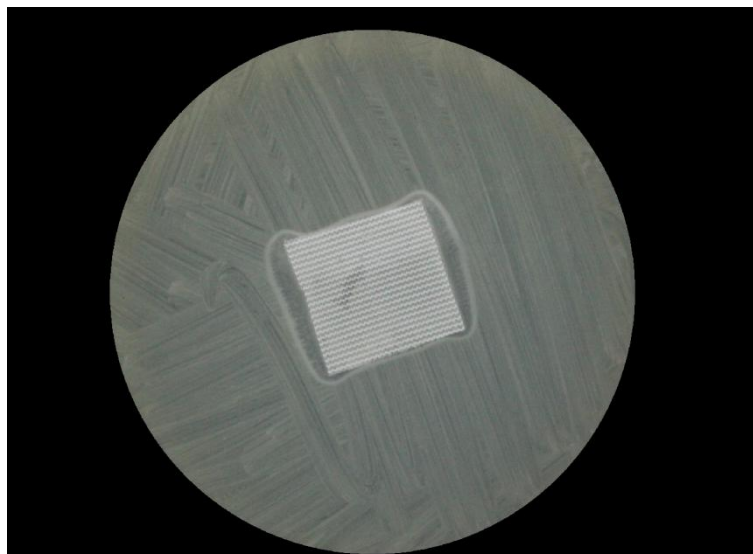
Z výsledků lze jednoznačně určit velice příznivý vliv navázaných aktivních látek na krytu z kyseliny hyaluronové. Účinek byl ve všech případech bakteriostatický. Jak se taky zdá, použití stříbra je v tomto případě zbytečné a jeho úlohu v daleko lepším měřítku zastane kanabidiol a kurkumin.

Na obrázcích 51 až 58 můžeme vidět inhibiční zóny.



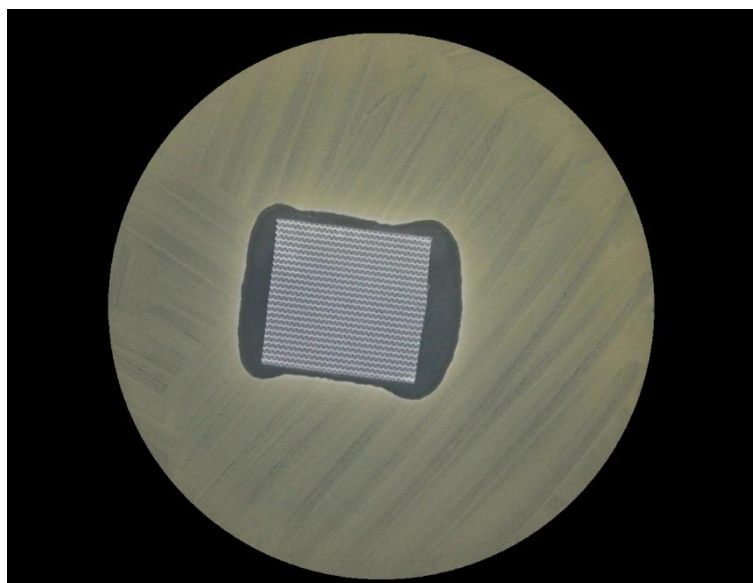
Obrázek 51 - Antimikrobiální testování, HA a *Escherichia coli*

Obrázek číslo 51, je výsledkem testování staplových vláken z čisté HA na bakterii *Escherichii coli*. Měření proběhlo v M-H agaru a snímek byl pořízen po 24 hodinách při 37°C. Lze vidět velice slabé inhibiční zóny okolo krytu a navíc nerovnoměrné.



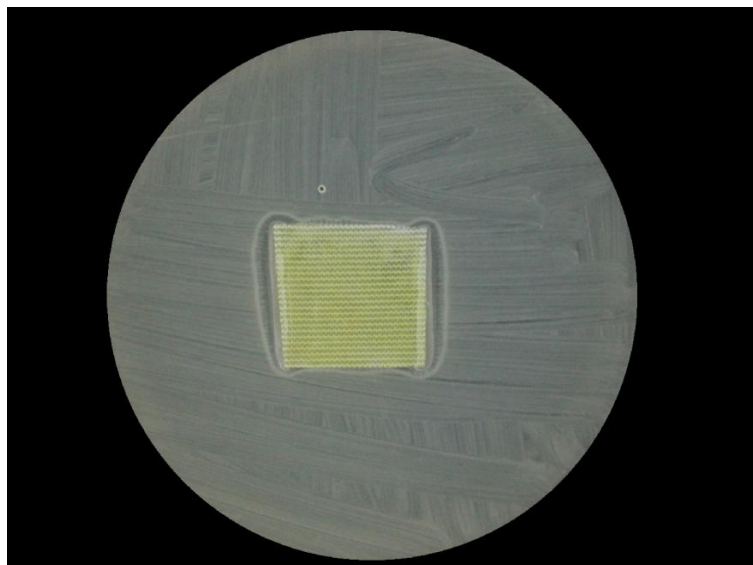
Obrázek 52 - Antimikrobiální testování, HA+CBD a *Escherichia coli*

Výsledek na obrázku 52 byl vyfocen po 24 hodinách při 37°C. Na snímku je kryt, ze staplových vláken HA s navázanou aktivní látkou CBD, s bakterií *Escherichia coli* v M-H agaru. Kryt s aktivním kanabidiolem má jasně vyznačené inhibiční zóny především ve směru polyamidové pleteniny.



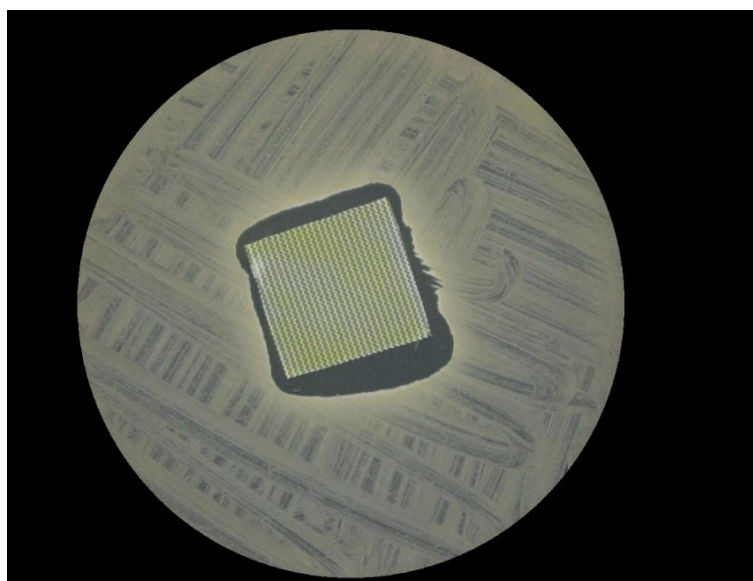
Obrázek 53 - Antimikrobiální testování, HA+CBD a *Staphylococcus aureus*

Na obrázku 53 byla (na rozdíl od 52) použita bakterie *Staphylococcus aureus*. Inhibiční zóny, v porovnání s *Escherichii coli*, jsou čtyřnásobně větší, ale opět tyto zóny můžeme spatřit především ve směru pleteniny.



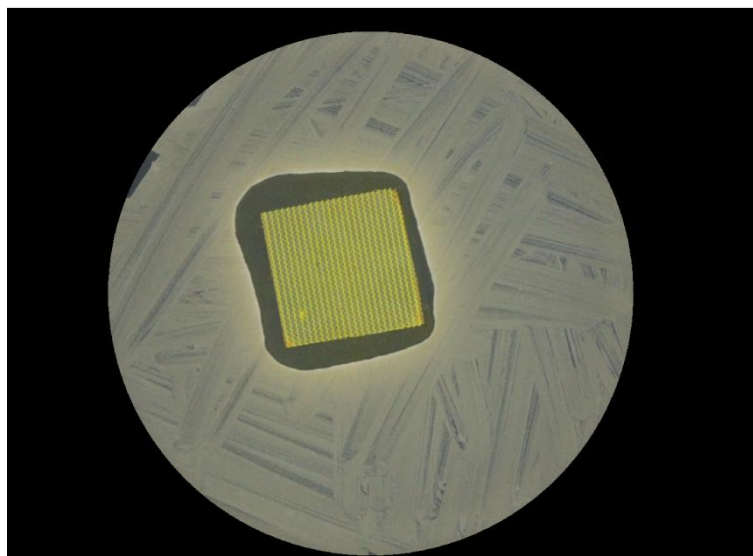
Obrázek 54 - Antimikrobiálního testování, HA+CBD+kurkumin a *Escherichia coli*

Na obrázku 54 byl vyfocen kryt s navázaným CBD a kurkuminem (žluté zbarvení krytu). Na tomto snímku je testování na bakterii *Escherichii coli*, v M-H agaru a snímek pořízen po 24 hodinách a 37°C. Inhibiční zóny lze vidět pouze ve směru pleteniny.



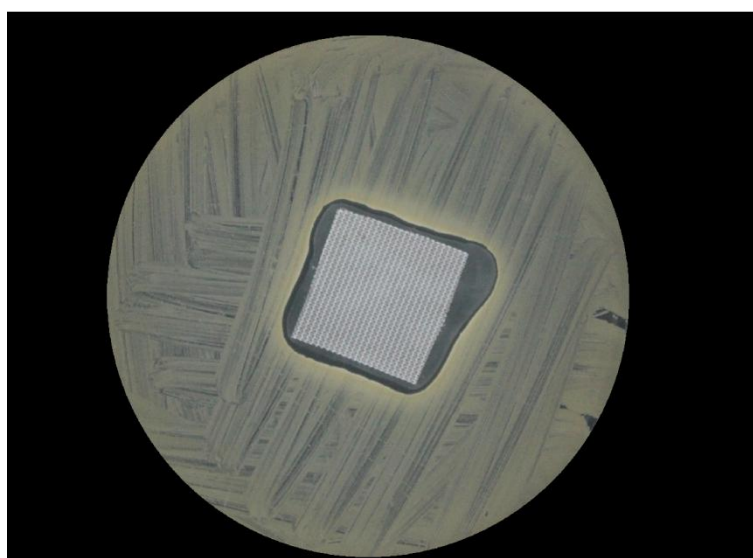
Obrázek 55 - Antimikrobiální testování, HA+CBD+kurkumin a *Staphylococcus aureus*

Snímek z antimikrobiálního testování označený číslem 55, je pořízen opět po 24 hodinách při 37°C. Na krytu je nanesen CBD i s kurkuminem, testování na snímku je s bakterií *Staphylococcus aureus* v M-H agaru. Inhibiční zóny jsou oproti *Escherichii coli* daleko větší a to především ve směru pleteniny.



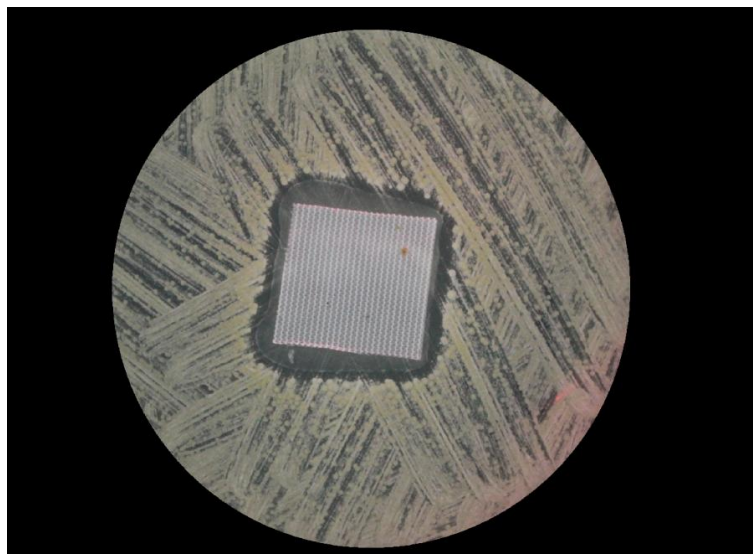
Obrázek 56 - Antimikrobiálního testování, HA+CBD+kurkumin+Ag a *Staphylococcus aureus*

Obrázek 56 je z testování třívrstvého krytu ran, kde základem je HA na ní je stříbro a na ní je roztok biologicky aktivních látek CBD+kurkuminu. Tento snímek pochází z testování oproti bakterii *Staphylococcus aureus*, 24 hodin při 37°C. Inhibiční zóny jsou zjevné nejen ve směru pleteniny, ale i mírně kolmo na směr.



Obrázek 57 - Antimikrobiálního testování, HA+CBD+Ag a *Staphylococcus aureus*

Zajímavým výsledkem byl kryt HA s kanabidiolem a se stříbrem, tento kryt je na snímku s bakterii *Staphylococcus aureus* po 24 hodinách opět při 37°C. Inhibiční zóny jsou velmi nerovnoměrné a větší jsou kolmo na směr pleteniny.



Obrázek 58 - Antimikrobiálního testování, HA+CBD+Ag a *Candida albicans*

Poslední snímek je z testování krytu HA, na kterém bylo naneseno stříbro a aktivní látka kanabidiol. Tento kryt byl testován proti kvasince *Candida albicans*. Tento snímek byl pořízen po 48 hodinách, při 25°C. Inhibiční zóny je vidět okolo celého krytu, ve směru pleteniny je inhibiční zóna o trochu větší, jak lze vidět na obrázku.

Testování na antimikrobiální účinky měly velmi pozitivní výsledky. Kombinace kurkuminu a kanabidiolu na krytu se zdá být velmi dobrá jak pro léčení rány, tak i pro ochranu před bakteriemi.

3 Závěr

1. Byla provedena acetylace staplových mikrovláken HA ve vodě pomocí acetanhydridu. Bylo zjištěno, že acetylace probíhá a že dochází k acylaci hydroxylových skupin. Při vyšších stupních acetylace dochází však ke slepování jednotlivých vláken a kryty ran jsou po vysušení křehčí.
2. Při zabudování iontů stříbra a zinku do struktury mikrovláken z HA bylo zjištěno:
 - a) V případě Ag^+ je vhodné stříbrnou sůl přidat do koagulační lázně, protože vede ke kompletnímu navázání stříbra, naopak metoda nakapání není technologicky úspěšná
 - b) V případě Zn^{2+} jsou obě metody technologicky schůdnéMnožství navázaných kovů bylo detekováno pomocí optické emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem.
3. Byly odzkoušeny tři metody (namáčení, nástřk, nakapání) navázání kanabidiolu a kurkuminu na kryt rány ze staplových mikrovláken z HA. Bylo zjištěno, že technologicky vhodná je metoda kapičkování, která v našem laboratorním případě simuluje inkoustovou tiskárnu.
4. Jednotlivé kryty ran byly, na Katedře biologických a biochemických věd FCHT Univerzity Pardubice, vyhodnoceny na antimikrobiální účinnost proti *Escherichii coli*, *Staphylococcu aureus* a na kvasince *Candida albicans* a bylo zjištěno:
 - a) Čistá HA nemá žádné bakteriostické účinky
 - b) Acetylace mikrovláken HA nevedla k žádným antibakteriálním účinkům
 - c) Navázání kanabidiolu v koncentraci 47,5 % způsobilo velice dobré bakteriostatické účinky proti *Escherichii coli* a *Staphylococcu aureus*
 - d) Navázáním kanabidiolu v koncentraci 47,5 % a kurkuminu v koncentraci 0,9 % mělo dobré bakteriostatické účinky proti *Escherichii coli* a *Staphylococcu aureus* a kvasince *Candida albicans* v M-H agaru.
 - e) Překvapivě bylo zjištěno, že přidání iontů stříbra do krytů ran ad.d) v koncentraci 0,0042 % nevedlo k žádnému zvýšení antibakteriální účinnosti
 - f) Kryty ran se zinečnatými ionty nebyly testovány na antimikrobiální účinky

4 Budoucí práce

Z hlediska budoucích prací máme tyto doporučení a poznámky:

- a) Proměřit kryty ran s navázaným zinkem na antimikrobiální účinnost
- b) Patrně nemá smysl se dále věnovat kombinacím biologicky aktivních látek jako je kanabidiol a kurkumin s ionty stříbra
- c) Přejít z technologie kapičkování biologicky aktivních látek na kryty ran na vývoj profesionální inkoustové tiskárny (digitální tisk)
- d) Vzhledem k faktu, že postupy pro přípravu apigeninu popsány v literatuře nevedou k potřebným výsledkům, dopracovat syntézu apigeninu a dále se věnovat testování této látky jako tomu bylo u kanabidiolu a kurkuminu
- e) V případě biologicky aktivní látky kanabidiolu bude potřeba prověřit, zdali se v kyselém prostředí nepřeměňuje na psychoaktivní THC. Z chemického hlediska se jedná o pouhé odtržení vody za kyselých katalýzy

5 Seznam literatury

[1] DHIVYA, Selvaraj, Viswanadha Vijaya PADMA a Elango SANTHINI. Wound dressings – a review. *BioMedicine* 2015, 5(4). DOI:10.7603/s40681-015-0022-9. ISSN2211-8039.

[2] FORREST R. D. Early history of wound treatment. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1982, 75(3), 198-205.

[3] SIPOS P, GYORY H, HAGYMASI K, ONDREJKA P & BLAZOVICS. Special wound healing methods used in ancient Egypt and the mythological background. *World Journal of Surger* 2004, 28(2), 211-216. DOI: 10.1007/s00268-003-7073-x. ISSN 0364-2313.

[4] MAJNO G. The healing hand: man and wound in the ancient world. 1st paperback edn. Cambridge, Mass: Harvard University Press, 1991. ISBN 0-674-38331-1.

[5] KOPP J, WANG GY, HORCH RE, PALLUA N & Ge SD. Ancient traditional Chinese medicine in burn treatment: a historical review. *Burns* 2003 Aug; 29(5), 473–478.

[6] JONES VJ. The use of gauze: will it ever change? *Int Wound J* 2006 Jun; 3(2):79–86.

[7] WINTER GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* 1962 Jan 20; 193:293–294.

[8] WINTER GD & SCALES JT. Effect of air drying and dressings on the surface of a wound. *Nature* 1963 Jan 5; 197:91–92.

[9] STEED DL. Debridement. *Am J Surg* 2004 May; 187(5A):71–74.

[10] JONES AM & SAN MIGUEL L. Are modern wound dressings a clinical and cost-effective alternative to the use of gauze?. *Journal of Wound Care* 2006, 15(2), 65-69. DOI: 10.12968/jowc.2006.15.2.26886. ISSN 0969-0700.

[11] BLOOM H. "Cellophane" dressing for second-degree burns. *The Lancet* 1945; 246(6375):559.

[12] JOHNSON & JOHNSON I. BAND-AID® Brand Adhesive Bandages Beginnings. Johnson & Johnson Consumer Companies, Inc.; 2012. Dostupné z: <http://www.band-aid.com/brand-heritage>.

[13] HUNT TK, HOPF H, HUSSAIN Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care* 2000; 13: 6-11.

[14] STRECKER-MCGRAW MK, JONES TR, Baer DG. Soft Tissue Wounds and Principles of Healing. *Emergency Medicine Clinics of North America* 2007, 25(1), 1-22. DOI: 10.1016/j.emc.2006.12.002. ISSN 07338627.

- [15] JONES, Vanessa, Joseph E GREY a Keith G HARDING. Wound dressings. *BMJ* [online]. 2006, **332**(7544), 777-780 [cit. 2019-03-4]. DOI: 10.1136/bmj.332.7544.777. ISSN 0959-8138.
- [16] QUEEN D, ORSTED H, SANADA H, SUSSMAN G A dressing history. *International Wound Journal* 2004, **1**(1), 59-77. DOI: 10.1111/j.1742-4801.2004.0009.x. ISSN 1742-4801.
- [17] VAN RIJSWIJK, L. Ingredient-based wound dressing classification: a paradigm that is passe and in need of replacement. *Journal of Wound Care* 2006, **15**(1), 11-14. DOI: 10.12968/jowc.2006.15.1.26859. ISSN 0969-0700.
- [18] KOKSAL C, BOZKURT AK. Combination of hydrocolloid dressing and medical compression stocking versus Unn's boot for the treatment of venous leg ulcers. *Swiss Med Wkly* 2003; 133:364–368
- [19] THOMAS S, LOVELESS PA. A comparative study of twelve hydrocolloid dressings. *World Wide Wounds* 1997; 1: 1-12.
- [20] THOMAS S. Hydrocolloids. *J Wound Care* 1992; 1:27 30.
- [21] <https://directpatient.com/tegaderm-hydrocolloid-dressing-with-outer-clear-adhesive-4-x-4>
- [22] HEENAN A. Alginates: Frequently asked questions. *World Wide Wounds* 1998; 1:1–7.
- [23] THOMAS, S. Alginate dressings in surgery and wound management — part 1. *Journal of Wound Care* 2000; **9**(2), 56-60. DOI: 10.12968/jowc.2000.9.2.26338. ISSN 0969-0700.
- [24] KUO CK, MA PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 2001; 22:511–521.
- [25] JARVIS PM, GALVIN DAJ, BLAIR SD. How does calcium alginate achieve haemostasis in surgery? *Proceedings of the 11th Congress on Thrombosis and Haemostasis* 1987, 58: 50
- [26] AGREN MS. Four alginate dressings in the treatment of partial thickness wounds: A comparative study. *J Plast Surg* 1996; 49:129–134.
- [27] MARTIN L, WILSON CG, KOOSHA F, TETLEY L, GRAY AI, SENEL S, et al. The release of model macromolecules may be controlled by the hydrophobicity of palmitoyl glycol chitosan hydrogels. *J Control Release* 2002; 80: 87-100.
- [28] WICHTERLE O, LIM D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* 1960; 185:117–118.

- [29] <https://www.hightidehealth.com/kendall-aquaflo-hydrogel-dressings.html>
- [30] HAMPTON S. Dressing for the occasion. *Nurs Times* 1999; 95:58–60.
- [31] <https://healthcaresolutions.ca/products/kendall-amd-antimicrobial-foam-dressings>
- [32] BARLETT RH. Skin substitutes. *J Trauma* 1981; 21: S731.
- [33] KOLLENBERG LO. A new topical antibiotic delivery system. Surgical Materials Testing Laboratory, Wales, UK: *World wide wounds* 1998. Edition 1.0.
- [34] O'MEARA S, CALLUM N, MAJID M, SHELDON T. Systematic reviews of wound care management (3) antimicrobial agents for chronic wounds (4) diabetic foot ulceration. *Health Technol Assess* 2000; 4:1–237.
- [35] SAWADA Y, ARA M, YOTSUYANAGI T, SONE K. Treatment of dermal depth burn wounds with an antimicrobial agent-releasing silicone gel sheet. *Burns* 1990; 16:347–352.
- [36] GANLANDUIK S, WRIGTSON WR, YOUNG S, MYERS S, POLK HC., Absorbable, delayed-release antibiotic beads reduce surgical wound infection. *Am J Surg* 1997; 63:831–835.
- [37] CHU HQ, XIONG H, ZHOU XQ, HAN F, WU ZG, ZHANG P, HUANG XW, CUI YH. Aminoglycoside ototoxicity in three murine strains and effects on NKCC1 of stria vascularis. *Chin Med J* 2006; 119: 980–985.
- [38] PATRICK BN, RIVEY MP, ALLINGTON DR. Acute renal failure associated with vancomycin- and tobramycin-laden cement in total hip arthroplasty. *Ann Pharmacother* 2006; 40:2037–2042.
- [39] <https://www.medicaldepartmentstore.com/Silvasorb-Perforated-Sheet-Dressings-p/msc9340.htm>
- [40] ROBINSON JR, LEE VHL, editors. Controlled drug delivery: Fundamentals and applications. 2nd edition. 1987.
- [41] LANGER R. Polymeric delivery systems for controlled drug release. *Chem Eng Commun* 1980; 6:1–48.
- [42] PAPADIMITRIOU E, BUCKTON G, EFENTAKIS M. Probing the mechanisms of swelling of hydroxypropylmethylcellulose matrices. *Int J Pharm* 1993; 98: 57–62.
- [43] KORSMEYER RW, GURNY R, DOELKER E, BURI P, PEPPAS NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm* 1983; 15:25–35.
- [44] AOYAGI S, ONISHI H, MACHIDA Y. Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. *International Journal of*

Pharmaceutics 2007, **330**(1-2), 138-145. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.09.016. ISSN 03785173.

[45] SIEPMANN J, KRANZ H, BODMEIER R, PEPPAS NA. HPMC-matrices for controlled drug delivery: A new model combining diffusion, swelling and dissolution mechanisms and predicting the release kinetics. *Pharm Res* 1999; 16:1748–1756.

[46] SIEPMANN J, PEPPAS NA. Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: An improved mathematical model to predict the resulting drug release kinetics (the “Sequential Layer” model). *Pharm Res* 2000; 17:1290–1298

[47] HIGUCHI TJ. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J Pharm Sci* 1961; 50:875.

[48] SUJJA-AREEVATH J, MUNDAY DL, COX PJ, KHAN KA. Relationship between swelling, erosion and drug release in hydrophilic natural gum minimatrix formulations. *Eur J Pharm Sci* 1998; 6:207–217.

[49] NARASIMHAN B, PEPPAS NA. Disentanglement and reptation during dissolution of rubbery polymers. *J Polym Sci Polym Phys* 1996; 34:947–961.

[50] NARASIMHAN B, PEPPAS NA. On the importance of chain reptation in models of dissolution of glassy polymers. *Macromol* 1996; 29:3283–3291.

[51] SZYCHER M, LEE SJ. Modern wound dressings: a systemic approach to wound healing. *J Biomater Appl* 1992; 7: 142-213.

[52] RAJENDRAN S, ANAND SC. Hi-tech textiles for interactive wound therapies. *Handbook of Medical Textiles* 2011, 38-79. DOI: 10.1533/9780857093691.1.38. ISBN 9781845696917.

[53] PERCIVAL JN. Classification of Wounds and their Management. *Surgery (Oxford)* 2002, **20**(5), 114-117. DOI: 10.1383/surg.20.5.114.14626. ISSN 02639319.

[54] HARDING KG, MORRIS HL, PATEL GK. Science, medicine, and the future: Healing chronic wounds. *BMJ* . **324**(7330), 160-163. DOI: 10.1136/bmj.324.7330.160. ISSN 09598138.

[55] VANWIJCK R. Surgical biology of wound healing. *Bull Mem Acad R Med Belg* 2001; 115: 175 – 184.

[56] ROBSON MC, STEED DL, FRANZ MG. Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery* 2001, **38**(2), A1-140. DOI: 10.1067/msg.2001.111167. ISSN 00113840.

[57] KOMARCEVIC A. The modern approach to wound treatment. *Med Pregl* 2000; 53: 363 – 368.

- [58] BISCHOFF M, KINZL L, SCHMELZ A. The complicated wound. *Unfallchirurg* 1999; 102: 797 – 804.
- [59] DEGREEF H. How to heal a wound fast. *Dermatol Clin* 1998; 16: 365 – 375.
- [60] BROUGHTON G, JANIS JE, ATTINGER CE. Wound Healing: An Overview. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2006, **117**(SUPPLEMENT), 1e-S-32e-S. DOI: 10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9. ISSN 0032-1052.
- [61] <http://www.shieldhealthcare.com/community/popular/2015/12/18/how-wounds-heal-the-4-main-phases-of-wound-healing>
- [62] GLAT PM, LONGAKER MT. Wound healing. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, 1997; 3 – 12.
- [63] HUNT TK. The physiology of wound healing. *Ann Emerg Med* 1998; 17: 1265 – 1273.
- [64] RICHARDSON M. Acute wounds: an overview of the physiological healing process. *Nurs Times* 2004; 100: 50 – 53.
- [65] HART, J. Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. *Journal of Wound Care* 2002, **11**(6), 205-209. DOI: 10.12968/jowc.2002.11.6.26411. ISSN 0969-0700.
- [66] HUNT TK, HOPF H, HUSSAIN Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care* 2000; 13: 6 – 11.
- [67] SIEGGREEN MY. Healing of physical wounds. *Nurs Clin North Am* 1987; 22: 439 – 447
- [68] DIEGELMANN RF, EVANS MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004; 1: 283 – 289.
- [69] WITTE MB, BARBUL A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 509 – 528.
- [70] BAUM CL, ARPEY CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005; 31: 674 –686.
- [71] QUICK A. Dressing choices. *Nurs Times* 1994; 90:71–72.
- [72] LAZARUS G.S., COOPER D.M., KNIGHTON D.R., MARGOLIS D.J., PECORARO R.E., RODEHEAVER G., ROBSON M.C. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch. Dermatol.* 1994; 130, 489.
- [73] HOPF H.W., ROLLINS M.D. Wounds: An Overview of the Role of Oxygen. *Antioxidants & Redox Signaling* 2007; **9**(8), 1183-1192. DOI: 10.1089/ars.2007.1641. ISSN 1523-0864.

- [74] HUTTON J., TAPPEL A., UDENFRIED S. Cofactor and substrate requirements of collagen proline hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1967; 118: 231–40.
- [75] GILILAND EL. Bacterial colonisation of leg ulcers and its effect on success rate of skin grafting. *Ann R Coll Surg* 1988; 70:105–108.
- [76] FALABELLA, A.F. Debridement and wound bed preparation. *Dermatologic Therapy* 2006; **19**(6), 317-325. DOI: 10.1111/j.1529-8019.2006.00090.x. ISSN 1396-0296.
- [77] COLLINS M. N., BIRKINSHAW C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers* 2013; 92(2), 1262–1279. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.10.028
- [78] TOOLE, B.P. Hyaluronan in morphogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2001; **12**(2), 79-87. DOI: 10.1006/scdb.2000.0244. ISSN 10849521
- [79] PRICE R.D, MYERS S., LEIGH I.M, NAVSARIA A.H. The Role of Hyaluronic Acid in Wound Healing. *American Journal of Clinical Dermatology* 2005, **6**(6), 393-402. DOI: 10.2165/00128071-200506060-00006. ISSN 1175-0561.
- [80] RAHEMTULLA F., LØVTRUP S. The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides—II. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 1974; **49**(4), 639-646. DOI: 10.1016/0305-0491(74)90250-8. ISSN 03050491.
- [81] YAMADA K. Effects of novel (Streptomyces) hyaluronidase digestion upon some mucosaccharide stainings of the cartilages and aortas in the rabbit and rat. *Histochemie* 1971; 27 (4): 277-89
- [82] FLEISCHMAJER R, PERLISH JS, GAISIN A. Comparative study of dermal glycosaminoglycans. *J Invest Dermatol* 1973; 61 (1): 1-6.
- [83] CAMPOCCIA D, DOHERTY P, RADICE M, et al. Review: semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials* 1998; 19: 2101-27
- [84] COWMAN M.K., MATSUOKA S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research* 2005, **340**(5), 791-809. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022. ISSN 00086215.
- [85] KOBAYASHI Y, OKAMOTO A, NIKISHINARI K. Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights. *Biorheology* 1994; 31 (3): 235-44.
- [86] LAURENT, T C a J R FRASER. Hyaluronan. *The FASEB Journal* 1992, **6**(7), 2397-2404. DOI: 10.1096/fasebj.6.7.1563592. ISSN 0892-6638.
- [87] BROWN, MB a SA JONES. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology*

and *Venereology* 2005, **19**(3), 308-318. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x. ISSN 0926-9959.

[88] KVÍTEK L, PRUCEK R, PANÁČEK A, NOVOTNÝ R, HRBÁČ J, ZBOŘIL R. The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *J. Mater. Chem* 2005, **15**(10), 1099-1105. DOI: 10.1039/B417007E. ISSN 0959-9428.

[89] CHEN, W. Y. J., & ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration* 1999, **7**(2), 79–89. DOI:10.1046/j.1524-475x.1999.00079.x

[90] YU H, STEPHANOPOULOS G. Metabolic engineering of Escherichia coli for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering* 2008, **10**(1), 24–32. PMID: 17959405. DOI:10.1016/j.ymben.2007.09.001. ISSN 1096-7176.

[91] www.contipro.com

[92] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína* 2008, **53**(8), 397-411. DOI: 10.17221/1930-VETMED. ISSN 03758427.

[93] LEBEL L. Clearance of hyaluronan from the circulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1991, **7**, 221–235.

[94] FRASER J.R.E., LAURENT T.C., PERTOFT H., BAXTER E. Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochemical Journal* 1981, **200**, 415–424.

[95] BENTSEN K.D., HENRIKSEN J.H., BOESBY S., HORSTEV-PETERSEN K., LORENZEN I. Hepatic and renal excretion of circulating type III procollagen amino-terminal propeptide and hyaluronan in pig. *Journal of Hepatology* 1989, **9**, 177–183.

[96] COLLINS M.N., BIRKINSHAW C. Morphology of crosslinked hyaluronic acid porous hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* 2011, **120**(2), 1040–1049. DOI: 10.1002/app.33241. ISSN 00218995.

[97] CARAVAGGI C., DE GIGLIO R., PRITELLI C., SOMMARIA M., DALLA S., FAGLIA E., et al. HYAFF 11-based autologous dermal and epidermal grafts in the treatment of noninfected diabetic plantar and dorsalf foot ulcers. *Diabetes Care* 2003, **26**(10), 2853–2859.

[98] LISIGNOLI G., TONEGUZZI S., ZINI N., PIACENTINI A., CRISTINO S., TSCHON M., et al. Hyaluronan-based biomaterial (Hyaff-11) as scaffold to support mineralization of bone marrow stromal cells. *La Chirurgia Degli Organi de Movimento* 2003, **88**(4), 363–367.

- [99] ACUNZO G., GUIDA M., PELLICANO M., TOMMASELLI G. A., DI SPIEZIO SARDO A., BIFULCO G., et al. Effectiveness of autocrosslinked hyaluronic acid gel in the prevention of intrauterine adhesions after hysteroscopic adhesiolysis: a prospective, randomized, controlled study. *Human Reproduction* 2003, **18**(9), 1918–1921.
- [100] PALUMBO F. S., PITARRESI G., ALBANESE A., CALASCIBETTA F., GIAMMONA G. Self-assembling and auto-crosslinkable hyaluronic acid hydrogels with a fibrillar structure. *Acta Biomaterialia* 2009, **6**(1), 195–204. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.06.014. ISSN 17427061.
- [101] ZHANG L.M., WU C.X., HUANG J.Y., PENG X.H., CHEN P., TANG S.Q. Synthesis and characterization of a degradable composite agarose/HA hydrogel. *Carbohydrate Polymers* 2012, **88**(4), 1445–1452. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.02.050. ISSN 01448617.
- [102] NAIR S., REMYA N. S., REMYA S., NAIR P. D. A biodegradable in situ injectable hydrogel based on chitosan and oxidized hyaluronic acid for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers* 2011, **85**(4), 838–844. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.04.004. ISSN 01448617.
- [103] RADHAKUMARY C., NANDKUMAR A. M., NAIR P. D. Hyaluronic acid-poly(HEMA) copolymer with potential implications for lung tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* 2011, **85**(2), 439–445.
- [104] LUNDIN A., BERNE B., MICHAELSSON G. Topical retinoic acid treatment of photoaged skin—its effects on hyaluronan distribution in epidermis and on hyaluronan and retinoic acid in suction blister fluid. *Acta Dermato-Venereol* 1992;72:423–7.
- [105] OKSALA O., SALO T., TAMMI R., HÄKKINEN H., JALKANEN M., INKI P., LARJAVA H. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem* 1995; 43:125–35.
- [106] WISNIEWSKI HG, HUA JC, POPPERS DM, NAIME D, VILCEK J, CRONSTEIN BN. TNF/IL-1- inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter- α -inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect in vivo. *J Immunol* 1996; 156: 1609– 1615.
- [107] TURLEY EA, AUSTEN L, MOORE D, HOARE K. Ras-Transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan promoted locomotion. *Exp Cell Res* 1993; 207:277–282.
- [108] LONGAKER MT, CHIU ES, ADZICK NS, STERN M, HARRISON MR, STERN R. Studies in fetal wound healing: A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Ann Surg* 1991; 213:292–296.

- [109] NEVELL T. P., ZERONIAN S. H. Cellulose Chemistry and its Applications. John Wiley & Sons 1985, 455-479; or: J. E. McIntyre: The Chemistry of Fibres. Edward Arnold, London 1971, 15.
- [110] CASSIDY T., GOSWAMI P. *Textile and clothing design technology*. Boca Raton: Taylor & Francis, a CRC title, part of the Taylor & Francis imprint, a member of the Taylor & Francis Group, the academic division of T&F Informa, [2018]. ISBN 978-1-4987-9639-2
- [111] FORMHALS A. Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads, U.S. Patent No 1,975,504, 1934.
- [112] UM I.C., FANG D., HSIAO B.S., OKAMOTO A., CHU B.. Electro-Spinning and Electro-Blowing of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules* 2004, **5**(4), 1428–1436. DOI:10.1021/bm034539b
- [113] RENEKER DH, YARIN AL, FONG H, KOOMBHONGSE S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics* 2000, **87**(9), 4531-4547. DOI: 10.1063/1.373532. ISSN 0021-8979.
- [114] WU X., BRANFORD-WHITE C. J., ZHU L., CHATTERTON N. P., YU D. Ester prodrug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats as transdermal drug delivery systems. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2010, **21**(8), 2403–2411. DOI:10.1007/s10856-010-4100-y
- [115] KIM T. G., CHUNG H. J., PARK T. G. Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles. *Acta Biomaterialia* 2008, **4**(6), 1611–1619. DOI:10.1016/j.actbio.2008.06.008
- [116] UPPAL R., RAMASWAMY G.N., ARNOLD C., GOODBAND R., WANG Y. Hyaluronic acid nanofiber wound dressing-production, characterization, and in vivo behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2011, **97B**(1), 20–29. DOI:10.1002/jbm.b.31776
- [117] ALMUHAMED S., BONNE M., KHENOUSSE N., BRENDLE J., SCHACHER L., LEBEAU B. ADOLPHE D.C. Electrospinning composite nanofibers of polyacrylonitrile/synthetic Na-montmorillonite. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2016, **35**, 146-152. DOI: 10.1016/j.jiec.2015.12.024. ISSN 1226086X.
- [118] BRENNER E.K., SCHIFFMAN J.D., THOMPSON E.A., TOTH L.J., SCHAUER C.L. Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions. *Carbohydrate Polymers* 2012, **87**(1), 926–929. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.07.033
- [119] SPALDING M.A., CHATTERJEE A.M. *Handbook of industrial polyethylene and technology: definitive guide to manufacturing, properties, processing, applications and markets*. Hoboken, NJ: John Wiley 2017. ISBN 978-1-119-15976-6.

[120] CARDUCK F.J., DORSCHNER O., STORKEBAUM C. Continuous Filament Nonwoven Web, US Patent 3692618, assigned to Metallgesellschaft AG.

[121] Contipro Biotech s.r.o.; Dolní Dobrouč. *Způsob přípravy mikrovláken, způsob výroby krytů ran, kryty ran a zařízení pro přípravu polysacharidových vláken*. Původce vynálezu: Ladislav Burgert, Radim Hrdina, Vladimír Velebný, a spol. Česká republika. Patentový spis 304651

[122] KIM S.J., JANG D.H, PARK W.H., MIN B.-M. Fabrication and characterization of 3-dimensional PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds. *Polymer* 2010, **51**(6), 1320-1327. DOI: 10.1016/j.polymer.2010.01.025. ISSN 00323861.

[123] <https://www.omicsonline.org/open-access/nanofibers-for-high-efficiency-filtration-2169-0022-1000399-96395.html>

[124] MECHOULAM R, HANUS L. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects: Part I. Chemical aspects. *Chem Phys Lipids*.

[125] BURSTEIN S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2015, **23**(7), 1377–1385. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.01.059

[126] MECHOULAM R., PETERS M., MURILLO-RODRIGUEZ E., HANUŠ L.O. Cannabidiol – Recent Advances. *Chemistry & Biodiversity* 2007, **4**(8), 1678–1692. DOI: 10.1002/cbdv.200790147

[127] ROSENKRANTZ H., FLEISCHMANN R.W., GRANT R.J. Toxicity of short-term administration of cannabinoids to rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 30:118-131.

[128] BERGAMASCHI M.M., QUEIROZ R.H.C., ZUARDI A.W., CRIPPA J.A.S. Safety and Side Effects of Cannabidiol, a Cannabis sativa Constituent. *Curr Drug Saf* 2011; 6: 237-249.

[129] CONSROE P., WOLKIN A. Cannabidiol-antiepileptic drug comparisons and interactions in experimentally induced seizures in rats. *Pharmacol Exp Ther* 1977; 201:26-32.

[130] BISOGNO T., HANUS L., DE PETROCELLIS L., TCHILIBON S., PONDE D., BRANDI I., MORIELLO A.S., DAVIS J.B., MECHOULAM R., DI MARZO V. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 2001; 134:845-852.

[131] MUSTY R.E., CONTI L.H., MECHOULAM R. Anxiolytic properties of cannabidiol, in: Harvey DJ (ed.), *Marihuana 84: Proceedings of the Oxford Symposium on Cannabis*. Oxford, UK: IRL Press, 1984; 713-719.

- [132] COSTA B., COLLEONI M., CONTI S., PAROLARO D., FRANKE C., TROVATO A.E., GIAGNONI G. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2004, 369(3), 294–299. DOI:10.1007/s00210-004-0871-3.
- [133] ZUARDI, A.W. A critical review of the antipsychotic effects of cannabidiol: 30 years of a translational investigation. *Current pharmaceutical design* 2012, 18, 5131–40. DOI:10.2174/138161212802884681
- [134] HILL, T.D.M. Cannabidivarin-rich cannabis extracts are anticonvulsant in mouse and rat via a CB1 receptor-independent mechanism. *British Journal of Pharmacology* 2013, 170, 679-692. DOI:10.1111/bph.12321
- [135] TRIPATHI, B. R. Decreased prevalence of diabetes in marijuana users: cross-sectional data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *British Medical Journal Open* 2012, 2. DOI:10.1136/bmjopen-2011-000494
- [136] ZUARD, A.W. Cannabinoids in bipolar affective disorder: a review and discussion of their therapeutic potential. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006, 39, 421-429. DOI:10.1590/S0100-879X2006000400001.
- [137] <https://happytea.com>
- [138] CHATTOPADHYAY I., BISWAS K., BANDYOPADHYAY U., BANERJEE R.K. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Curr Sci* 2004, 87, 44–50.
- [139] IRESON C., ORR S., JONES D.J., VERSCHOYLE R., LIM C.K., LUO J.L., HOWELLS L., PLUMMER S., JUKES R., WILLIAMS M., STEWARD W.P., GESCHER A. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res* 2001, 61, 1058–1064.
- [140] OKADA K., WANGPOENGTRAKUL C., TANAKA T., TOYOKUNI S., UCHIDA K., OSAWA T. Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice. *J Nutr* 2001, 131, 2090–2095. DOI: 10.1093/jn/131.8.2090
- [141] PARI L., MURUGAN P. Protective role of tetrahydrocurcumin against erythromycin estolate-induced hepatotoxicity. *Pharmacol Res* 2004, 49, 481–486. DOI: 10.1016/j.phrs.2003.11.005
- [142] ANAND P., KUNNUMAKKARA A.B., NEWMAN R.A., AGGARWAL B.B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics* 2007, 4(6), 807–818. DOI: 10.1021/mp700113r

- [143] AGGARWAL B.B., SUNDARAM CH., MALANI N., ICHIKAWA H. Curcumin: the indian solid gold. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. *Advances in experimental medicine and biology* 2007, 1-75. DOI: 10.1007/978-0-387-46401-5_1. ISBN 978-0-387-46400-8.
- [144] RUSZNYAK S.P., SZENT-GYRGYI A. Vitamin P as Flavonoids. *Nature* 1936, 138; 27.
- [145] HEIM K.E., TAGLIAFERRO A.R., BOBILYA D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002, 13, 572-584.
- [146] WANG Y., CHEN S., YU O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011, **91**(4), 949-956. DOI: 10.1007/s00253-011-3449-2. ISSN 0175-7598.
- [147] YAN J., YU L., XU S., GU W., ZHU W. Apigenin accumulation and expression analysis of apigenin biosynthesis relative genes in celery. *Scientia Horticulturae* 2014, 165, 218-224. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.11.018. ISSN 03044238.
- [148] ALI F., RAHUL N.F., JYOTI S., SIDDIQUE Y. H. Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties* 2016, **20**(6), 1197–1238. DOI:10.1080/10942912.2016.1207188
- [149] HERTOOG M.G., FESKENS E.J., HOLLMAN P.C., KATAN M.B., KROMHOUT D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993, 342: 1007–1011.
- [150] FERRANDIZ M.L., ALCARAZ M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Actions* 1991, 32: 283–288
- [151] STEFANI E.D., BOFFEATTA P., DENEOPELLEGRINI H. Dietary antioxidants and lung cancer risk: a case-control study in Uruguay. *Nutr. Cancer* 1999, 34: 100–110.
- [152] WANG H.K., XIA Y., YANG Z.Y., NATSCHKE S.L., LEE K.H. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998, 439: 191–225.
- [153] BAE E.A., HAN M.J., LEE M., KIM D.H. In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity. *Biol. Pharm. Bull.* 2000, 23: 1122–1124.
- [154] VIOLA H., WASOWSKI C., LEVI DE STEIN M., WOLFMAN C., SILVEIRA R., DAJAS F., MEDINA J., PALADINI A. Apigenin, a Component of *Matricaria recutita* Flowers, is a Central Benzodiazepine Receptors-Ligand with Anxiolytic Effects. *Planta Medica* 1995, **61**(03), 213-216. DOI: 10.1055/s-2006-958058. ISSN 0032-0943

- [155] ZHOU X., WANG F., ZHOU R., SONG X., XIE M. Apigenin: A current review on its beneficial biological activities. *Journal of Food Biochemistry* 2017, **41**(4). DOI: 10.1111/jfbc.12376. ISSN 01458884.
- [156] <http://www.dermanet.eu/files/periodika/ceska-dermatovenerologie/cdv-2012-03.pdf#page=37>
- [157] Over-the-Counter Drug Products Containing Colloidal Silver Ingredients or Silver Salts. *Federal Register* . 1999-07-17.64, čís. 158.
- [158] https://www.researchgate.net/profile/Daniela_Minarikova2/publication/282281617_Treatment_and_preventive_use_of_zinc/links/560a579208ae1396914bb893.pdf
- [159] LEE Y.-J., WU T.-D. Total Synthesis of Kaempferol and Methylated Kaempferol Derivatives. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2001, **48**(2), 201–206. DOI: 10.1002/jccs.200100033
- [160] <https://www.verkon.cz/rozprasovace-chromatograficke/?&fromMobile=1#>
- [161] <https://www.hennlich.cz/produkty/trysky-88.html>
- [162] <https://www.okay.cz/jak-funguje-inkoustova-tiskarna/>
- [163] ABDEL-MOHSEN A.M., HRDINA R., BURGERT L., KRALOVÁ G., ABDEL-RAHMAN R.M., KREJČOVÁ A., BENEŠ L. Green synthesis of hyaluronan fibers with silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 2012, **89**(2), 411–422. DOI:10.1016/j.carbpol.2012.03.022
- [164] UNIVERZITA PARDUBICE CZ. Staplová mikrovlákna, kryty ran a bandáže. Původci:Ladislav Burgert, Radim Hrdina. Česká republika. Užité vzor CZ 25712.