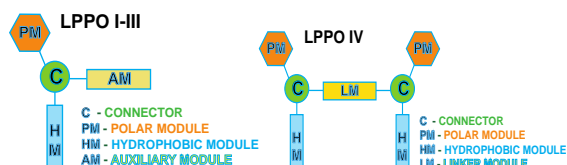


APVV-20-0017: Vývoj aktívneho krytia rán na báze antibakteriálneho hydrogélu obsahujúceho rastlinný extrakt stimulujúci hojenie (Development of active wound dressing based on antibacterial hydrogel containing plant extract promoting healing)

Alterované hojenie rán predstavuje zásadný problém pre zdravotný systém a spoločnosť. Cieľom predkladaného projektu je vývoj hydrogélů a nerozpustných celulózových matric obsahujúcich prírodné látky za účelom vytvorenia aktívneho krytia rán pre zdravých a diabetických pacientov. Výskum bude zameraný na nájdenie optimálnej technológie prípravy hydrogélů a nerozpustných matric, inkorporáciu aktívnych látok so zameraním sa na rastlinné extrakty repíka lekárskeho (AE - *Agrimonia eupatoria* L.) (Tabuľka 1) vo forme mikro- a nano-častíc za účelom zefektívnenia terapie. Tieto aktívne krytia rán budú testované aj v kombinácii s antimikrobiálne pôsobiacimi nízko-molekulovými látkami (lipofosfonoxíny - LPPO, Obr. 1).



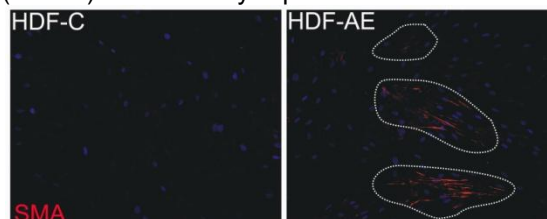
Obr. 1 Chemická štruktúra LPPO (generácia I-III a IV).

Tabuľka 1 HPLC analýza zloženia vodného extraktu Repíka lekárskeho

Identifikovaná zložka	% w/w
Quinic acid *	0.360 ± 0.01
p-coumaric acid*	1.330 ± 0.01
Catechin*	0.200 ± 0.01
Quercetin-acetil-glucoside	0.670 ± 0.02
Rutin*	0.155 ± 0.01
Apigenin derivative	0.200 ± 0.01
P-coumaroil quinic acid	0.260 ± 0.01
5-caffeoyl quinic acid*	0.510 ± 0.01
Luteolin-7-O-glucuronide*	0.270 ± 0.01
Caffeoil-hexoside	0.100 ± 0.01
Kaempferol-p-coumaroyl-hexoside	0.180 ± 0.01
Quercetin-acetyl-hexoside	0.730 ± 0.01
Procyanidin B-1*	0.180 ± 0.01
Procyanidin B-3	0.140 ± 0.01
Procyanidin-trimer-B	0.870 ± 0.01
Procyanidin tetramer –B	0.300± 0.02
Quercetin3-O-glucoside*	0.550 ±0.009
Quercetin-3-O-rhamnoside*	0.301± 0.01
Quercetin-7-O-rhamnoside*	0.260± 0.01
Apigenin-7-O-glucuronide*	0.190± 0.009
luteolin-acetyl-hexoside	0.110± 0.009
Celkové množstvo	7.87

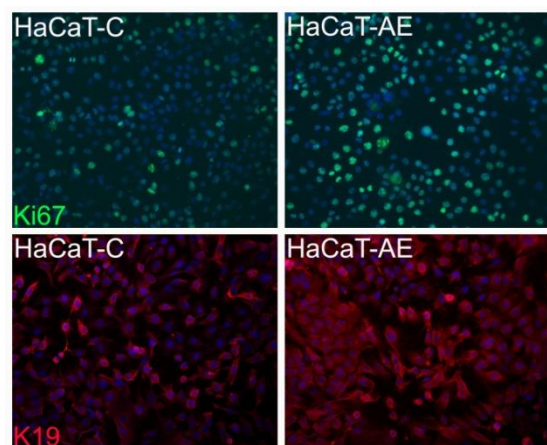
a) Repík lekársky a fibroblast/keratinocyt - in vitro

Pre objasnenie možného mechanizmu účinku extraktu AE indukovať konverziu dermálnych fibroblastov na myofibroblasty ako aj tvorbu extracelulárnej matrice (ECM). Extrakt AE indukoval fenotyp podobný myofibroblastom (Obr. 2) a taktiež zvýšil produkciu ECM.



Obr. 2 Imunofluorescenčná analýza prítomnosti myofibroblastov (SMA: α-smooth muscle actin) v bunkovej kultúre po stimulácii vodným extraktom repíka lekárskeho (AE: *Agrimonia eupatoria* L.).

Cieľom našich ďalších *in vitro* experimentov bolo zistiť ako študovaný extrakt AE reguluje diferenciáciu a proliferáciu normálnych keratinocytov (HaCaT). V porovnaní s kontrolnou kultúrou extrakt AE stimuloval expresiu Ki67 v závislosti od koncentrácie, t.j. nižšie testované koncentrácie zvýšili expresiu Ki67 (Obr. 3) zatiaľ čo najvyššia testovaná koncentrácia inhibovala rast buniek. Nepozorovali sme rozdiel v expresii keratínu-14 a keratínu-10. Je zaujímavé, že extrakt stimuloval expresiu keratínu-19 (Obr. 3).

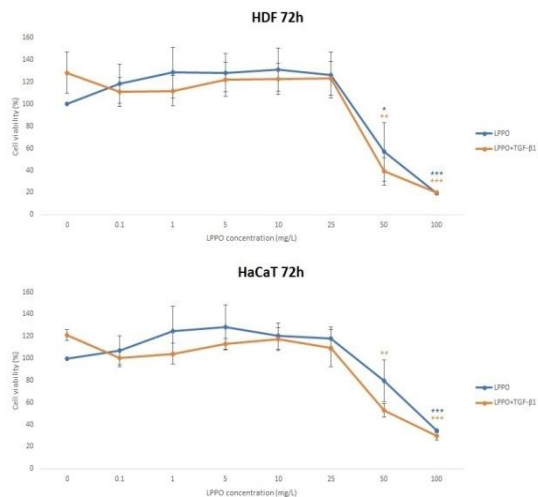


Obr. 3 Expressný profil (K19: keratín-19) keratinocytov (HaCaT) po stimulácii s vodným extraktom repíka lekárskeho (AE: *Agrimonia eupatoria* L.).

b) LPPO a fibroblast/keratinocyt - in vitro

Pomocou *in vitro* experimentov sme demonštrovali, že LPPO v koncentráciách, ktoré vykazujú antibakteriálnu aktivitu nezhoršuje proliferáciu fibroblastov a

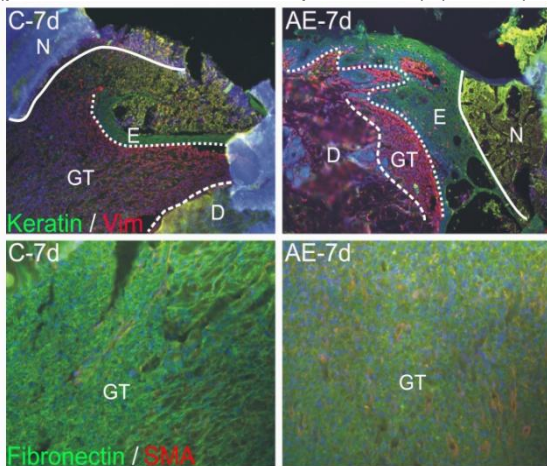
keratinocytov (Obr. 4) a nemení ani ich diferenciáciu.



Obr. 4 Metabolická aktivita fibroblastov (HDF: human dermal fibroblast) a keratinocytov (HaCaT) v prítomnosti rôznych koncentrácií antibakteriálnej molekuly LPPO bez/s TGF-β1.

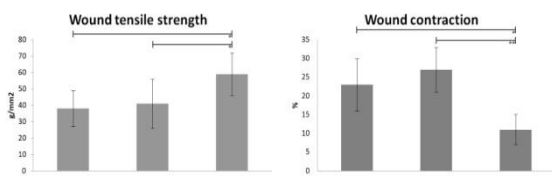
c) Repík lekársky a hojenie rán - in vivo

Aj v animálnom experimente sme pozorovali, že vodný extrakt AE indukoval tvorbu myofibroblastov a zvýšil produkciu ECM (podobne ako v in vitro experimente) (Obr. 5).



Obr. 5 Extrakt repíka lekárskeho (AE: *Agrimonia eupatoria* L.) zrýchľuje epitelizáciu (E: epidermis) a premenu fibroblastov na myofibroblasty v granulačnom tkanive (GT) 7 dní po operácii.

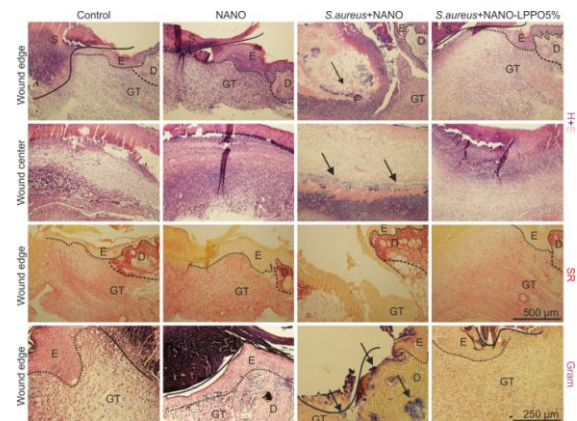
Okrem toho sme pozorovali zvýšenú pevnosť incízných rán a lepšiu kontrakciu otvorených rán stimulovaných extraktom AE (Obr. 6).



Obr. 6 Vodný extrakt repíka lekárskeho zvyšuje pevnosť (wound tensile strength) incízných rán a kontrakciu (wound contraction) excíznej rany.

d) LPPO a hojenie infikovanej rany - in vivo

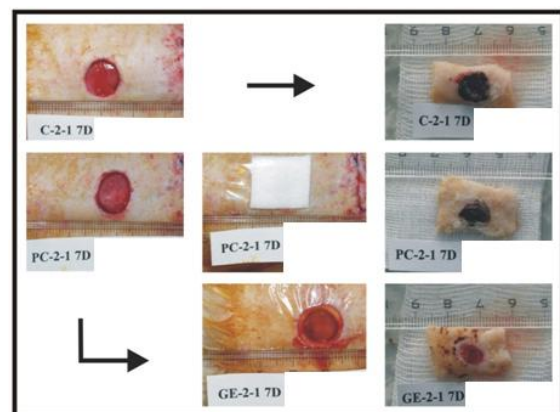
Použitím myšacieho modelu sme ukázali, že aktívne krytie rany s LPPO významne znížilo počty *Staphylococcus aureus* v infikovaných ranách (hodnotené 7 dní po operácii, Obr. 7). Zaujímavé bolo pozorovanie, že prítomnosť samotných baktérií (pomocou enzýmov) zrýchľuje uvoľňovanie LPPO z krytia do rany čím urýchľuje elimináciu bakteriálnej nálož. LPPO vykazovalo zanedbateľnú až žiadnu systémovú absorpciu.



Obr. 7 Histologický pohľad na infikované rany liečené s druhou generáciou LPPO.

e) Klinický význam

Z našich výsledkov vyplýva, že ako extrakt repíka lekárskeho, tak aj LPPO podporujú hojenie rán. LPPO zásadne znižuje bakteriálnu nálož a nevykazuje systémovú absorpciu. Z tohto pohľadu môžeme predpokladať, že aktívne krytie rán založené na báze študovaných látok bude mať potenciál liečiť rany v klinických podmienkach. Naším cieľom je vytvoriť a aplikovať do klinickej praxe priehľadné aktívne krytie rán s antibakteriálnymi vlastnosťami (Obr. 8), ktoré by zároveň umožňovalo sledovať priebeh hojenia.



Obr. 8 Priehľadné aktívne krytie rán zrýchľujúce uzatvorenie rany u potkana.