

Využití elektrického pole k léčbě kožních poranění

Soňa Zubková

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Soňa Zubková
Osobní číslo: T21302
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace: Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Využití elektrického pole k léčbě kožních poranění

Zásady pro vypracování

Elektrické pole hraje významnou roli v řadě fyziologických i patologických procesů v lidském těle.

Student/ka zpracuje literární rešerší se zaměřením na bioelektrinu.

Zvláštní důraz bude kladen na vliv elektrického pole na hojení ran.

V praktické části provede sérii experimentů popisujících vliv externího elektrického pole na migraci různých buněčných linií.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Chen, C., Bai, X., Ding, Y., Lee, I.-S., 2019. Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering. *Biomaterials Research* 23, 25. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0176-8>.
- [2] Lu, C., Kolbenschlager, J., Nüssler, A.K., Ehnert, S., McCaig, C.D., Čebren, U., Daigeler, A., Prahm, C., 2021. Direct Current Electrical Fields Improve Experimental Wound Healing by Activation of Cytokine Secretion and Erk1/2 Pathway Stimulation. *Life* 11, 1195. <https://doi.org/10.3390/life11111195>.
- [3] Tai, G., Tai, M., Zhao, M., 2018. Electrically stimulated cell migration and its contribution to wound healing. *Burns Trauma* 6, 20. <https://doi.org/10.1186/s41038-018-0123-2>.
- [4] Jia, N., Yang, J., Liu, J., Zhang, J., 2021. Electric Field: A Key Signal in Wound Healing. *Chinese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery* 3, 95–102. [https://doi.org/10.1016/S2096-6911\(21\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S2096-6911(21)00090-X).

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Leona Mahelová**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky: Soňa Zubková

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Hojení ran je pro zdraví člověka podstatné, tudíž se v poslední době věnuje pozornost o co nejrychlejší průběh a celkové zlepšení tohoto procesu, a tak se tato práce zabývá vlivem elektrického pole na proces hojení. Teoretická část obsahuje informace o kůži, typech poranění, hojení, biomateriálech využívaných k hojení ran a vlivu elektrického pole. V praktické části byly provedeny testy buněčné migrace u fibroblastů, keratinocytů a kmenových buněk, pro zjištění vlivu elektrického pole na tento proces. Výsledky testů prozradily příznivý vliv přítomnosti elektrického pole na migraci všech testovaných buněčných linií, což by mohlo pomoci v dalším zkoumání.

Klíčová slova: Scratch test, elektrická stimulace, kůže, hojení, buněčná migrace

ABSTRACT

Wound healing is essential for human health, so recently attention has been paid to the fastest possible progress and overall improvement of this process, and so this paper deals with the effect of electric field on the healing process. The theoretical part contains information about skin, types of wounds, healing process, biomaterials used for wound healing and the effect of electric field. In the practical part, cell migration assays were performed on fibroblasts, keratinocytes and stem cells to determine the effect of the electric field on this process. The results of the tests revealed a positive effect of the presence of an electric field on the migration of all cell lines tested, which could help in further investigations.

Keywords: Scratch assay, electrical stimulation, skin, healing, cell migration

Ráda bych poděkovala Ing. Leoně Mahelové za pomoc, ochotu a užitečné rady při psaní této práce, provádění experimentů a jejich následné vyhodnocování. Mé díky také patří rodině a přátelům za velkou podporu.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 STRUKTURA A FYZIOLOGIE KŮŽE.....	11
1.1 EPIDERMIS.....	11
1.1.1 Stratum basale	12
1.1.2 Stratum spinosum.....	13
1.1.3 Stratum granulosum	13
1.1.4 Stratum lucidum	14
1.1.5 Stratum corneum	14
1.2 DERMIS	14
1.3 PODKOŽÍ.....	14
2 TYPY PORANĚNÍ KŮŽE	16
2.1 ROZDĚLENÍ DLE KONTAMINACE RÁNY	16
2.2 DRUHY RAN DLE ZPŮSOBU PORANĚNÍ.....	16
2.3 DRUHY RAN DLE ČASU	19
3 PROCES HOJENÍ	20
3.1 HEMOSTÁZA.....	20
3.2 ZÁNĚT	20
3.3 PROLIFERACE	21
3.4 REMODELACE.....	21
3.5 OVLIVNĚNÍ HOJENÍ	21
4 BIOMATERIÁLY VYUŽÍVANÉ PŘI HOJENÍ	23
4.1 BIOMATERIÁLY NA BÁZI POLYSACHARIDŮ – HOMOGLYKANY	23
4.2 BIOMATERIÁLY NA BÁZI POLYSACHARIDŮ – HETEROGLYKANY	23
4.3 BIOMATERIÁLY NA BÁZI BÍLKOVIN.....	24
4.4 SYNTETICKÉ BIOMATERIÁLY	24
4.5 FUNKCIONALIZACE BIOMATERIÁLŮ.....	25
5 VLIV ELEKTRICKÉHO POLE NA HOJENÍ RAN	26
5.1 VZNIK ENDOGENNÍHO ELEKTRICKÉHO POLE	26
5.2 VÝZNAM PŘI HOJENÍ RAN	26
5.3 ELEKTRICKÁ STIMULACE.....	27
5.4 VLIV NA BUNĚČNOU MIGRACI	29
5.5 TESTOVÁNÍ BUNĚČNÉ MIGRACE	29
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	31
6 CÍL PRÁCE	32

7	METODA KULTIVACE BUNĚČNÝCH LINÍÍ A PROVEDENÍ SCRATCH TESTŮ	33
7.1	POUŽITÉ LÁTKY A PŘÍSTROJE.....	33
7.2	KULTIVACE FIBROBLASTŮ.....	33
7.3	KULTIVACE KERATINOCYTŮ.....	34
7.4	KULTIVACE KMENOVÝCH BUNĚK	34
7.5	SCRATCH TESTY	35
8	VÝSLEDKY.....	36
8.1	PRŮBĚH VYHODNOCENÍ SCRATCH TESTU.....	36
8.2	FIBROBLASTY	39
8.3	KERATINOCYTY	40
8.4	KMENOVÉ BUŇKY	42
9	DISKUZE	45
	ZÁVĚR	47
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	48
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ	56

ÚVOD

V současné době se zdravotnictví vyvíjí velmi rychle a stále se usiluje o zdokonalování hojení nejrůznějších zranění. Vzhledem k tomu, že je kůže hlavní bariérou zajišťující neprůchodnost mikroorganismů způsobujících onemocnění, je důležité, aby se poraněná kůže hojila správně a pokud možno rychle se obnovila její celistvost. Jedním z faktorů ovlivňujících hojení ran je elektrické pole, které v místě poranění ovlivňuje chování a migraci buněk a napomáhá ke správnému sledu dějů při hojení. Jednou z možností, jak napomoci v této oblasti, je působením elektrického pole z vnějšího zdroje.

K lepšímu pochopení této problematiky je důležité znát strukturu kůže, jak se rány hojí a jaké rány vlastně existují, materiály, jež už teď v hojení ran našly uplatnění a až nakonec funkce elektrického pole, což je v první části této práce popsáno. Podrobnější znalosti o elektrickém poli u hojení ran by mohli přispět k vývoji nejrůznějších vodivých biomateriálů či přístrojů, které by poté mohly být využívány ve zdravotnictví. To je i důvod mého výběru zrovna tohoto tématu, je to možnost zjistit více o této oblasti. K informacím o vlivu tohoto faktoru je možno se dostat přes buněčnou migraci, jako je tomu v této práci. Byly provedeny testy buněčné migrace u třech linií buněk, což jsou fibroblasty, keratinocyty a kmenové buňky. Volba přišla právě na tyto buňky z důvodu jejich důležitosti v oblasti hojení ran. Znalosti o jejich migraci s vlivem exogenního elektrického pole mohou přispět k dalšímu testování tohoto faktoru a aplikaci elektrické stimulace v praxi.

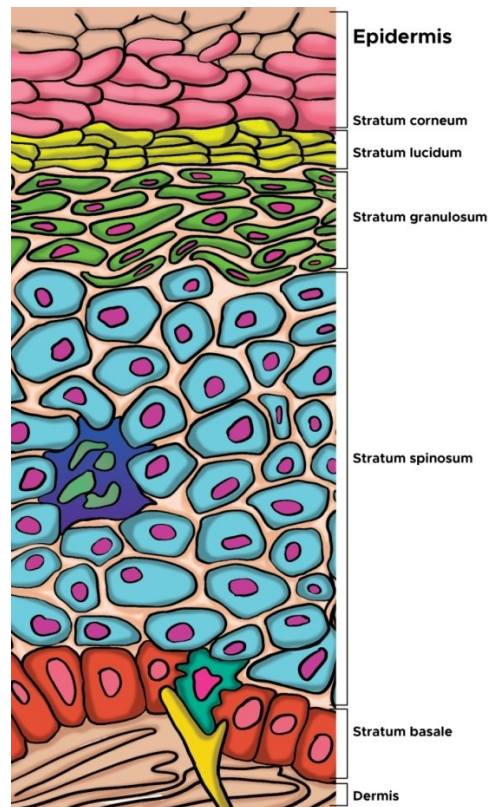
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 STRUKTURA A FYZIOLOGIE KŮŽE

Kůže je orgán, který tvoří ochrannou bariéru proti škodlivinám různého druhu, jako například chemického. (Kolarsick *et al*, 2011) Chrání tělo také proti škodlivým vlivům UV záření. Díky melaninu obsaženému v epidermis, jsou buněčné organely vystaveny menšímu množství UV záření. (Venus *et al*, 2010) Avšak vlivem toho záření může kůže vytvářet vitamin D₃, který je pro organismus důležitý, zvláště pro kostní tkáň. Kůže také zajišťuje organismu termoregulaci, aby se udržovala optimální teplota uvnitř organismu. Termoregulace je zajištěna zúžením či rozšířením cév, ale také například aktivací potních žláz, k čemuž dojde, pokud je organismus vystaven horku. Se stárnutím se tento největší orgán těla mění, postupně se ztenčuje, je méně pružný, jelikož s rostoucím věkem také postupně produkuje méně kolagenu. Umožňuje i komunikaci mezi jedinci, výraz v obličeji, různé napnutí či sraštění kůže může prozradit, jakou emoci daný člověk cítí. Aby kůže plnila svou funkci a chránila svého majitele před okolními vlivy, musí v sobě umět udržovat optimální množství vody, což je 18–20 % vzhledem k celkovému množství vody obsažené v organismu. Pokud by tuto schopnost neměla nebo by udržovala méně vody, mohlo by docházet k výskytu prasklin, které jsou pak možným vstupem pro různé nečistoty a mikroorganismy. (McKnight *et al*, 2021) U dospělého člověka může kůže představovat až 15 % z celkové hmotnosti. Hlavní dělení kůže spočívá v jejím rozdělení do tří nejdůležitějších vrstev, kterými jsou epidermis, dermis a podkoží. (Kolarsick *et al*, 2011)

1.1 Epidermis

Epidermis je vrstva kůže, která je vystavena okolnímu prostředí. Jak lze vidět na obrázku 1, buňky jsou uspořádány do více vrstev v dlaždicovém epitelu. (Powell, 2006) Hlavními buňkami v této vrstvě jsou keratinocyty, ze všech buněk jsou nejvíce zastoupeny právě ony, a to nejméně z 80 %. Epidermis lze ještě rozdělit do dalších čtyř až pěti vrstev, pět vrstev je totiž jen na nějakých částech těla, což jsou chodidla a dlaně. U těchto částí je ještě jedna vrstva, která je čtvrtou od nejspodnějších z vrstev epidermis a nazývá se stratum lucidum. Zbýlými čtyřmi vrstvami jsou stratum basale, která naléhá na dermis, nad ní je stratum spinosum, dále stratum granulosum a stratum corneum. (Mohamed *et al*, 2022)



Obrázek 1 Schéma epidermis (Yousef *et al*, 2022)

1.1.1 Stratum basale

V této vrstvě nasedají keratinocyty kolmě na dermis a jsou připojené na basální membránu, tyto buňky tvoří jen jednu vrstvu, jsou podlouhlé a jejich jádra jsou tmavě zbarvená z důvodu přítomnosti melaninu, který do nich vstupuje díky melanocytům obsaženým přímo v této vrstvě. Melanocyty jsou tedy buňky obsažené pouze v stratum basale, ovšem svými výběžky dodávají pigment melanin i do výše položených vrstev epidermis. Pigment je v melanocytech v podobě váčků nazývaných melanosomy. Melanocyty zajišťují, aby se pigment dostával do okolních keratinocytů, což způsobuje zbarvení kůže a tento pigment chrání buňku před velkým množstvím UV záření. Různé zbarvení kůže je dáno tím, jaké množství pigmentu melanocyty produkují, ne však tím, kolik melanocytů daný člověk má, jelikož každý člověk má zhruba stejné množství těchto speciálních buněk. Větší produkci pigmentu lze zajistit větším vystavováním kůže slunečnímu záření, tímto vzniká opálení. (Kolarsick *et al*, 2011; Mohamed *et al*, 2022) Nachází se zde i buňky kmenové epidermální, ty jsou zde z důvodu obnovy celé epidermis, ke které dochází každých zhruba třicet dní. Tyto buňky se dělí opakovaně, jejich dělením vznikají dceřiné buňky, které se postupně posouvají do vyšších vrstev epidermis, a nakonec se odloučí. K vyšší rychlosti dělení epidermálních kmenových buněk dochází například v případě poranění. K dalším

buňkám této vrstvy patří merkelovy buňky, které jsou připojeny ke keratinocytům, nacházejí se v částech těla, jež jsou velmi hmatově citlivé. Mohou se seskupovat ve hmatových discích rozmístěných právě v těchto částech. (Kolarsick *et al*, 2011; Janes *et al*, 2002)

Keratinocyty již od této vrstvy procházejí postupným procesem změny, který se nazývá keratinizace. V tomto procesu buňky postupně produkují a hromadí více keratinu, který se stává součástí jejich opory. V další fázi ztrácejí organely, buňka zemře, a nakonec se odloučí od nejsvrchnější vrstvy epidermis. (Kolarsick *et al*, 2011)

1.1.2 Stratum spinosum

Na startum basale nasedají buňky vrstvy stratum spinosum uspořádané do pěti až deseti řad. V těchto řadách se buňky liší strukturou i tvarem, čím blíže jsou vnějšímu okolí, tím jsou také větší a plošší. Tyto buňky ve vyšších řadách obsahují lamelární granula, což jsou lysozomy obsahující enzymy a heterolipidy. Buněčnými spojeními jsou desmozomy, zajišťující pevnost v případě mechanických vlivů, a gap junctions díky kterým buňky komunikují pomocí chemických signálů. Kvůli hojným desmozomům buňky vypadají jako by z nich vybíhaly trny, a právě z tohoto důvodu je tato vrstva nazvána stratum spinosum. K buňkám stratum spinosum patří kromě keratinocytů také Langerhansovy buňky podílející se na imunitní odpovědi organismu v případě proniknutí například viru. Tyto buňky totiž mohou reprezentovat antigen a tímto způsobem upozornit T-lymfocyty. Langerhansovy buňky také nejsou se sousedními nijak spojeny. (Kolarsick *et al*, 2011)

1.1.3 Stratum granulosum

Stratum granulosum je tvořena čtyřmi vrstvami buněk, což se ale může lišit vzhledem k tomu, na jakou část těla se zrovna pozorovatel zaměří. V částech těla, které jsou velmi namáhané, může být tato vrstva kůže silnější, ale v opačném případě je možné, že bude mít také například jen jednu řadu buněk. Keratinocyty jsou zde stále živými buňkami a přispívají ke keratinizaci. Produkují proteiny napomáhající procesu keratinizace. Obsahují granula napomáhající keratinovým vláknům a lysozomy, díky kterým začínají buňky ztrácet organely. (Kolarsick *et al*, 2011; Mohamed *et al*, 2022)

1.1.4 Stratum lucidum

Stratum lucidum je součástí epidermis pouze na chodidlech a dlaních. Je to tenká vrstva tvořená průsvitnými buňkami. (Mohamed *et al*, 2022; Yousef *et al*, 2022)

1.1.5 Stratum corneum

Buňky této vrstvy jsou bezjaderné a nazýváme je korneocyty. Tato vrstva je prvotní ochranou organismu, jelikož je v přímém kontaktu s okolním prostředím. Je zodpovědná za to, aby nedocházelo ke ztrátám vody. Buňky mohou tvořit dokonce až dvacet na sebe nasedajících vrstev. Kolem korneocytů se nacházejí lipidy, které přispívají bariérové funkci, v samotných korneocytech jsou však jen v malém zastoupení. (Kolarsick *et al*, 2011; Menon *et al*, 2012)

1.2 Dermis

Spojení mezi dermis a epidermis je tvořeno porézní membránou, na které se podílejí buňky obou vrstev kůže, ovšem buňky stratum basale hrají v tomto spojení větší roli. Díky této membráně si také obě vrstvy mohou vyměňovat látky. Dermis tvoří největší část kůže a nacházejí se v ní nervová vlákna, jež tvoří tělíška pro detekci doteku, tlaku a dalších vjemů. Je také cévně zásobena, což je faktor ovlivňující termoregulaci, protože lze ovlivnit průtok krve a tím pádem organismus může teplo zadržet nebo odvést do okolí. Důležitými složkami epidermis jsou vlákna kolagenní a elastická. Dermis obsahuje především kolagenní vlákna, která se mohou neustále cíleně rozkládat a skládat v nové. (Kolarsick *et al*, 2011) Svazky kolagenních vláken nacházející se v dermis však mají různé formy dle svého umístění, jelikož se dermis skládá ze dvou vrstev, jež se nazývají papilární a retikulární. Retikulární vrstva nasedá na podkoží, obsahuje pevná, široká, hustě uspořádaná kolagenní vlákna. Papilární vrstva je jemná síť kolagenních vláken na retikulární vrstvě i s obsahem fibroblastů. (Woodley 2017) Vlákna zajišťují, že vrstva dermis je nejen pevná, ale také pružná. Všechny typy vláken v této vrstvě jsou vytvářeny důležitými buňkami nazývané fibroblasty, kterých mají nejvíce v kůži kojenci, dospělému člověku jich v kůži zůstane méně. (Kolarsick *et al*, 2011)

1.3 Podkoží

Podkoží je tvořeno tukovými buňkami – adipocyty. Tyto buňky jsou schopny produkovat enzymy, které následně štěpí triacylglyceroly, rozštěpené složky poté zpracuje organismus.

Adipocyty se také podílejí na odbourávání tuku, pokud organismus nepřijímá potravu a musí využít zásobní energii v podobě tuku. K tomuto může docházet i v případě stresu. Podkožní tuk má dvě vrstvy. Povrchová vrstva, ta která se nachází blíže k dermis, je schopna se v případě úbytku podkožního tuku vracet do polohy, v jaké byla ještě před získáním tohoto tuku, tato vrstva je tedy elastická. Pojivová tkáň v této vrstvě vytváří oblouky, díky kterým se může zvětšovat či smršťovat. Pod ní je vrstva hluboká, která se nenachází všude po těle na rozdíl od vrstvy povrchové. Podkoží má na různých částech těla rozlišnou šířku, zajišťuje mechanickou oporu kůže a je důležité při udržování organismu v optimální teplotě lidského těla. (Illouz, 1990; Kolarsick *et al*, 2011; Mohamed *et al*, 2022)

2 TYPY PORANĚNÍ KŮŽE

Rány kůže můžeme rozdělit podle různých faktorů do více skupin. Faktory, podle kterých rány rozdělíme, mohou být například, jak bylo zranění způsobeno, před jakou dobou k němu došlo, zda je rána sterilní či naopak, do jaké vrstvy kůže zasahuje. Další faktor je místo, kde rána vznikla, což se užívá třeba u cíleného vytvoření rány při operaci. Poslední faktor, díky kterému lze nějakým způsobem rozdělit poranění je složitost, což může vyjadřovat, jestli došlo k nějakému úbytku tkáně při poranění či zda jsou zasaženy i jiné orgány těla. (Sarabahi a Tiwara, 2012; Percival, 2002)

2.1 Rozdělení dle kontaminace rány

Rány v tomto oddělení jsou uspořádány do čtyř tříd, z nichž první stupeň jsou rány čisté a poslední čtvrtý stupeň rány znečištěné, které se nijak neléčily a doprovází je také nekróza. U třetího stupně se v ráně nacházejí bakterie. Kontaminace má vliv na pozdější hojení rány, proto je nutné rány očistit před dalším ošetřením. To ale někdy nelze provést naprosto důkladně, což se stává například u posledních dvou tříd, a pro lepší hojení se tedy rána nechá otevřená. (Sarabahi a Tiwara, 2012; Percival, 2002)

2.2 Druhy ran dle způsobu poranění

Tržné rány vznikají nějakým přetržením, jak už je z názvu patrné. Díky síle se zpřetrhají vlákna v kůži a okraje rány jsou nepravidelné, zubaté. Tento druh ran má společný znak s pohmožděninami a to ten, že se podobně léčí, tudíž se k tržným ranám přiřazují i pohmožděnininy. Pohmožděnininy vznikají nárazem tupého předmětu. (Sarabahi a Tiwara, 2012)

Další skupinou ran jsou ty, u kterých není porušena celistvost kůže, ale dojde ke krvácení uvnitř kůže, je způsoben takzvaný hematoma, který je na obrázku 2. Tato poranění většinou nepotřebují speciální ošetření a po nějaké době vymizí. (Sarabahi a Tiwara, 2012)



Obrázek 2 Hematom (Brouwer a Maistry 2023)

Ostré předměty mohou kůži způsobit bodné rány různé hloubky. Ostrých předmětů, kterými lze způsobit takovou ránu je mnoho, jako například jehly z injekčních stříkaček, u kterých je možné, že dojde k přenosu nejrůznějších onemocnění jako je žloutenka typu C, což následně způsobuje další komplikace. Ať už bodnou ránu způsobí jakýkoli ostrý předmět, tak ránu infikuje. (Sarabahi a Tiwara, 2012)

Většinu ran kousnutím způsobují domácí mazlíčci, a to konkrétně kočky a psy. Problém u tohoto typu ran například nastává v případě vzniku infekce. K infekci dochází kvůli mikroorganismům, které zvířata přenesou do rány při kousnutí. V případě kousnutí kočkou je až 50% šance, že k infekci dojde. U kousnutí psem je pravděpodobnost vzniku infekce menší. Ránu po kousnutí psem lze vidět na obrázku 3. Čelisti zvířat mohou proniknout také ke kosti či kloubu, to následně může způsobit jejich zánět. Rány tohoto typu však nevytvářejí jen zvířata, ale také člověk. Buď dojde k přímému kousnutí do kůže, ale je také způsob, který může být závažnější, což je případ stávající se při rozepři, kdy sevřená pěst narazí na zuby druhého člověka. Tato situace se stává závažnější z důvodu snazší cesty ke kloubům, infekce se pak dostává pod kůži. (Sarabahi a Tiwara, 2012)



Obrázek 3 Rána po kousnutí psem (Fox *et al*, 2015)

Avulze je typ poranění, kdy se všechny vrstvy kůže oddělí od kosti či svalu. Nemusí se takto objevovat jen rána otevřená, ale také uzavřená, což je činí zrádnými, jelikož na první pohled zranění nemusí vypadat tak závažně. (Boettcher-Haberzeth a Schiestl, 2013) Avulzní zranění se většinou stává na končetinách, třeba v případě sevření strojem. Pod ně patří i zranění degloving, u kterého dochází k přerušení přívodu krve do kůže, objevuje se u nich nekróza, neživá tkáň se musí odstranit pro správné hojení. (Sarabahi a Tiwara, 2012; Percival, 2002)

K ranám, které jsou způsobeny drcením, může dojít kvůli velkému tlaku, což způsobí smrt buněk. Poškozená tkáň, která už by se nemohla nijak obnovit, se musí odstranit. To by mělo být provedeno po jednom až dvou dnech znovu, protože u těchto zranění se špatně zjišťuje, jak moc tkáně se musí odstranit. Při nedokonalém odstranění by mohlo docházet ke komplikacím při hojení. (Sarabahi a Tiwara, 2012; Percival, 2002)

Nakonec budou představeny popáleniny, které se ještě dělí podle závažnosti na další stupně. Mezi lidmi je asi nejznámější dělení na tři stupně, kdy první není úplně závažný, zaznamenáme zarudnutí, hojí se rychle a bez dalších následků na vzhledu kůže. Druhý stupeň je o něco závažnější, objevují se puchýřky, musí se dát pozor, aby se rána neinfikovala. U třetího stupně je kůže výrazně poškozena, většinou není schopna se obnovit, rána zasahuje do všech vrstev a je nutná operace, kdy se část tkáně musí nahradit. Popálenina třetího stupně je na obrázku číslo 4. Takovéto rozdělení není úplně přesné, jelikož se stupně posuzují spíše dle vzhledu zranění. Přesnější je rozdělit

popáleniny na základě hloubky průniku kůže, z čehož vyplynou čtyři stupně. První stupeň je stejný jako u předchozího dělení a stejně je to i u posledního. V tomto dělení podle hloubky, která ovlivňuje následné hojení, u prvních dvou stupňů nebude na konci procesu hojení nijak poznamenaná kůže a u dvou posledních bude vznikat jizva. Existuje také dělení, díky kterému mohou zdravotníci říct, jaká plocha těla je postižena. Určí tak v procentech množství zasažené plochy kůže vzhledem k celkové. Popáleniny nejčastěji způsobuje polítí horkou kapalinou nebo také přitisknutím horkého předmětu, další příčiny mohou být sluneční záření či přímý plamen. (Abraham *et al*, 2018)



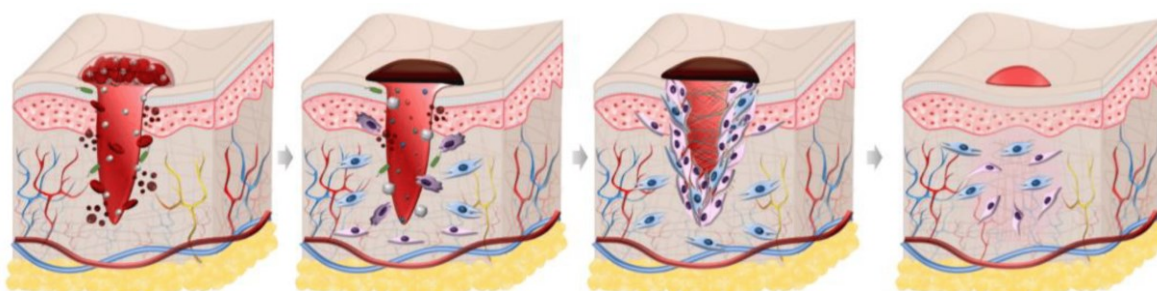
Obrázek 4 Popálenina třetího stupně
(Alharbi *et al*, 2012)

2.3 Druhy ran dle času

Rozdělení, podle doby, před jakou byla rána vytvořena, umožní rozřazení do tří částí. Akutní rány byly vytvořeny před méně než šesti hodinami, chronické rány vznikly před pěti a více dny a mezi tímto časovým rozmezím se nachází rány subakutní. (Percival, 2002)

3 PROCES HOJENÍ

Na procesu hojení se podílí mnoho buněk, mediátorů a faktorů. Je tvořen čtyřmi navazujícími, prolínajícími fázemi, jimiž jsou hemostáza, zánětlivá fáze, proliferace a remodelace, jež jsou zobrazeny na obrázku číslo 5. Konečným výsledkem je jizva. Hojení rány může ovlivňovat mnoho faktorů a jednotlivé fáze se podle toho případně liší. Následně si tedy popíšeme čtyři fáze hojení pro akutní rány, které se hojí primárním typem hojení. Tyto rány se uzavírají do 12 až 24 hodin a nedochází k žádným komplikacím v jakékoli fázi hojení. (Enoch a Leaper, 2008)



Obrázek 5 Fáze hojení ran – zleva hemostáza, zánětlivá fáze, proliferace a remodelace (Trinh *et al*, 2022)

3.1 Hemostáza

První ze čtyř fází hojení je hemostáza – zástava krvácení. Neprobíhá u ran, při kterých nedošlo ke krvácení. Hojení i tak může proběhnout díky ostatním fázím. U krvácejících ran hemostáza začíná okamžitě zúžením cév a vytvářením sraženiny, na které se podílejí krevní destičky. Krevní destičky také nepřímo zasahují do dalších fází hojení, jelikož jejich granula uvolňují do okolí růstové faktory aktivující další buňky, jimiž jsou například fibroblasty, nutné pro následující procesy. Díky těmto rychlým procesům nedochází k dalším ztrátám krve a může nastat fáze zánětu. (Enoch a Leaper, 2008; Guo a DiPietro, 2010)

3.2 Záněť

Zánětlivá fáze nastupuje již první den od vzniku rány a trvá přibližně tři dny. Můžeme ji ještě rozdělit na fázi časnou a pozdní. V první fázi hrají největší roli buňky imunity neutrofilů, jejichž hlavním úkolem je, aby nedošlo k infekci. Krevním řečištěm se dostanou do oblasti rány a odstraňují cizorodé látky. Tento proces je doprovázen zrudnutím a otokem v oblasti rány. Začínají také migrovat epitelové buňky, kterým vytváří podklad

sraženina s fibrinovou sítí vytvořenou v předchozí fázi. V pozdní fázi přebírají hlavní roli makrofágy. Do jejich funkce spadá další čištění rány, produkce růstových faktorů, s jejich pomocí se podílejí na dalším vývoji hojení rány, jelikož ovlivňují fázi proliferace. (Enoch a Leaper, 2008; Gonzalez *et al*, 2016)

3.3 Proliferace

Třetí fáze může trvat zhruba dva týdny. Rána se postupně zaceluje, tvoří se takzvaná granulační tkáň, která je vytvářena migrujícími, rostoucími a dělicími se fibroblasty produkující složky extracelulární matrix. Extracelulární matrix je mezibuněčná hmota skládající se z kolagenu, elastinu, glykoproteinů a proteoglykanů. Fibroblasty vytváří basální membránu hlavně produkcí kolagenu třetího typu, který se u remodelace degraduje a více se naopak produkuje kolagen prvního typu. Na basální membráně se podílejí i keratinocyty. Obnovuje se i cévní síť v místě poranění, což je důležité z hlediska přívodu živin i kyslíku. (Enoch a Leaper, 2008; Gonzalez *et al*, 2016)

3.4 Remodelace

V poslední fázi dochází k neustálé degradaci a následné tvorbě extracelulární matrix, aby výsledné spojení bylo co nejpevnější. Proces začíná již ve fázi proliferace a může trvat několik týdnů, ale i rok. Konečným výsledkem je jizva, která obsahuje silná kolagenní vlákna, méně buněk než nepoškozená kůže a vyznačuje se i menší pevností než kůže, jež nebyla poraněna. (Enoch a Leaper, 2008; Gonzalez *et al*, 2016)

3.5 Ovlivnění hojení

Výše byl popsán sled událostí, jimiž probíhá ideální hojení ran. Jsou však různé faktory, které jednu nebo více fází ovlivní, což může zkomplikovat či prodloužit celý proces a ovlivněn může být i výsledek. Jedním z faktorů může být omezený přísun kyslíku k ráně. Ze začátku je normální, že kyslík v oblasti rány chybí, jelikož tento fakt započne částečně procesy hojení. Pokud by ale nastal dlouhodobý výpadek v přísunu kyslíku, dojde k pomalejšímu hojení. Hojení ran může ovlivňovat fyzické zdraví jedince, ale i psychické. Pokud je jedinec vystaven stresu, může se narušit imunita a následně proběhne pomaleji fáze zánětu. Tato fáze je pomalejší u starších osob, celkový proces bude probíhat delší dobu, ale na kvalitu zhojení tento faktor vliv mít nebude. (Guo a DiPietro, 2010)

Komplikace v procesu způsobují onemocnění, jako je diabetes a také léky. Obézní lidé jsou náchylnější k tvorbě vředů, proleženin a k infekcím v průběhu hojení. Je u nich větší riziko nemocí, jako například již zmíněný diabetes. (Guo a DiPietro, 2010) Také v případě, kdy pacient podstupuje chemoterapii, je proces hojení ran opožděn. (Anderson a Hamm, 2012)

Alkohol je jedním z dalších faktorů zvyšující riziko infekce. Záleží u něj na množství, zda jde o konzumaci dlouhodobou či výjimečnou. Kuřákům jejich zlozvyk utváří komplikace při regenerování z operativních zákroků, je možné i odumírání tkáně v okolí rány. Kouření celkově a látky tvořící cigaretový kouř negativně ovlivňují tok krve, sled mechanismů hojení a mnoho buněk, jako jsou například fibroblasty a makrofágy. (Guo a DiPietro, 2010) Tento faktor zasahuje do všech fází hojení. Kuřáci mají snížený přísun kyslíku do rány, je také snížená tvorba kolagenu. (Anderson a Hamm, 2012)

K hojení ran bez komplikací je důležité přijímat živiny ve správném množství; důležité jsou bílkoviny, esenciální mastné kyseliny, dostatek vitaminů, sacharidy. (Guo a DiPietro, 2010) Snížený přísun bílkovin způsobuje větší náchylnost infekce v ráně. Z vitaminů je důležitý vitamin A, který zvyšuje počet buněk podílejících se na zánětlivé fázi, v případě poranění je vhodné zvýšit jeho denní dávku. (Stechmiller, 2010)

4 BIOMATERIÁLY VYUŽÍVANÉ PŘI HOJENÍ

Biomateriály jsou látky, které se používají k výrobě zdravotnických produktů, ale nejsou léčivem. Důležité je, aby nezpůsobovaly nežádoucí reakce organismu. V oblasti kožních poranění se tyto materiály používají na vytvoření vhodného prostředí pro správnou a rychlejší regeneraci nebo také k vyplnění chybějící části. (Aramwit 2016) Biomateriálů je velké množství, a proto si níže uvedeme jen některé ze základních.

4.1 Biomateriály na bázi polysacharidů – homoglykany

V této skupině biomateriálů se objevuje chitin a chitosan. Chitin se nachází u korýšů, konkrétně v jejich schránkách, dalším zdrojem jsou i některé houby. Chitosan je jeho derivátem. (Islam *et al*, 2017) Chitin podporuje hojení, jelikož je to přírodní materiál a je pro lidský organismus velmi dobře přijatelný. Chitosan příznivě ovlivňuje funkci krevních destiček a celkově přispívá k normálnímu hojení poranění. Oba homoglykany jsou vhodné pro výrobu obvazového materiálu. Chitosan se přidává také do hydrogelů, které umožňují rychlejší hojení. (Aramwit 2016; Agrawal *et al*, 2014) Rychlejší hojení bylo potvrzeno při použití chitosanové hydrogelu na popáleniny potkanů. Pórovitost hydrogelu podporovala růst buněk. Rána s použitím tohoto hydrogelu se zmenšovala rychleji než bez něj. (Ribeiro *et al*, 2009)

4.2 Biomateriály na bázi polysacharidů – heteroglykany

Pod následující kategorií spadá kyselina hyaluronová. V našem organismu se přirozeně nachází třeba v kůži, kloubní tekutině a ve sklivci. Vyrábí se z ní podpůrná konstrukce pro růst buněk, scaffold. (Aramwit 2016; Agrawal *et al*, 2014) Pro lepší hojení by se v budoucnu mohly používat dvouvrstvé scaffoldy, které jsou tvořeny nejen kyselinou hyaluronovou, ale také chitosanem a polykaprolaktonem. (Chanda *et al*, 2018) Kyselina hyaluronová zlepšuje podmínky pro buňky, díky ní mohou buňky rychleji růst a prorůstat. Podílí se na obnově cév. U tohoto faktu bylo zjištěno, že může děj vytváření cév i zpomalovat. Zda jej tedy urychlí či zpomalí, závisí na délce řetězce kyseliny hyaluronové. Pro zlepšení vlastností pro konkrétní aplikaci se přírodní polymer často modifikuje. (Aramwit 2016; Agrawal *et al*, 2014)

4.3 Biomateriály na bázi bílkovin

Kolagen, nacházející se v této skupině, je pro lidský organismus velmi důležitý; jako bílkovina je nejrozšířenější. Existuje nejméně 28 typů kolagenů, ale jen některé se využívají jako biomateriály. Vyrábí se v mnoha formách, z nichž každá má zaměřené využití vždy mírně jinde z důvodu různých funkcí. Kolagen ve formě houby se využívá u popálenin, udržuje vlhkost pro dobré hojení. Při poranění míchy se používá kolagen ve formě gelu. Membrána se využije například u obvazů, může sloužit i jako podpora pro rychlejší migraci fibroblastů a následně se rozloží. Kolagenové obvazy jsou vhodné nejen u popálenin, ale i u vředů. Příklad komerčního kolagenového obvazu se nazývany Promogran je vyráběn firmou Systagenix. (Aramwit 2016; Agrawal *et al*, 2014; Chattopadhyay a Raines, 2014)

V této kategorii se také nachází hedvábné biomateriály. Hedvábí se získává z kokonů Bource morušového a z něj se dalším zpracováním získají dvě hlavní bílkoviny fibroin a sericin. Hedvábné biomateriály jsou hojně využívány k hojení. Je lepší upřednostnit obvaz z tohoto materiálu než běžný obvaz, u něj je možnost poškození rány v procesu hojení při výměně běžného obvazu. U hedvábných obvazů je menší pravděpodobnost této komplikace, která se může ještě snížit v případě potažení vláken fibroinu například včelím voskem. Tak jako u kolagenu, mohou i tyto materiály být v různých formách jako je gel, vlákna, film či scaffold. V budoucnu by bylo možností je využívat u popálenin nebo ran diabetika. (Aramwit 2016; Wang *et al*, 2024)

4.4 Syntetické biomateriály

Při hojení ran se využívají také syntetické biomateriály, například polymery. Film z polyuretanu se přidává do obvazů, které udržují ránu vlhkou, což podporuje lepší hojení, méně bolestivý proces hojení a také migraci buněk k ráně. Do obvazů se také používá polyethylenglykol, ten napomáhá redukci jizvy. Dalším používaným materiálem je polykaprolakton, k němuž se přidávají nanočástice stříbra, aby vylepšily schopnost obrany proti mikroorganismům. Existují i biomateriály na hojení ran s inkorporovanými buňkami. Jeden z těchto materiálů se nazývá TransCyte. Obsahuje nylonová vlákna, na kterých jsou fibroblasty. Jedním z dalších materiálů je Dermagraft, také obsahující fibroblasty a má skvělé účinky v hojení vředů. (Mir *et al*, 2018)

4.5 Funkcionalizace biomateriálů

V poslední době je neustálá snaha o ještě větší urychlení procesu hojení, tudíž se posouvá vývoj funkcionalizovaných biomateriálů. Ty mají vlastnosti jako klasické biomateriály, jako je podpora růstu buněk, vytvoření lepšího prostředí, ale ještě k tomu jsou o nějaké funkce vylepšeny. Docílit těchto materiálů můžeme například přidáním růstových faktorů. (Wang *et al*, 2024) Zajímavé jsou materiály funkcionalizované spermidinem. Spermidin je látka nacházející se ve spermiích se schopností ovlivnit zánětlivou reakci, což by mohlo najít využití při zmírnění nežádoucí imunitní reakce na implantát. (Wang *et al*, 2023) Dalším využívaným způsobem funkcionalizace je zavedení elektrické vodivosti do biomateriálu. K tomuto účelu slouží například uhlíkové nanotrubičky. Ty jsou pro lepší přijetí organismem ještě často obaleny v polymeru. Existují také hydrogelové vodící obvazy, pěny a houby, lehce použitelné například na popáleniny. (Yu *et al*, 2022)

5 VLIV ELEKTRICKÉHO POLE NA HOJENÍ RAN

5.1 Vznik endogenního elektrického pole

Elektrické pole je jedním z velmi důležitých kroků, které spouští kaskádu dějů vedoucí ke zhojení kůže. Elektrické pole přirozeně se vyskytující u lidského organismu je nazýváno endogenním elektrickým polem. (Jia *et al*, 2021)

Jestliže je kůže zdravá, není porušena, je v organismu napětí, kterému se říká transepiteliální potenciál. Transepiteliální potenciál je tvořen transportem kationtů sodíku a aniontů chloru na basální a apikální stranu. (Jia *et al*, 2021)

Jakmile dojde k poranění kůže, transepiteliální potenciál se změní na zápornou hodnotu vzhledem k níže nepoškozené tkáni. Z poškozených buněk unikají ionty a vytváří se gradient. Rána k sobě tedy přitahuje kladný náboj a tím se vyvolá endogenní elektrické pole. (Jia *et al*, 2021; Tai *et al*, 2018) Takto tomu je na začátku, v průběhu procesu hojení se pak elektrické pole mění, elektrický potenciál postupně roste až do zhruba devátého dne od vzniku rány a v následujících dnech klesá a vrací se do stavu před vznikem poranění. (Farber *et al*, 2021) Elektrický proud je způsoben ionty, především ionty sodíku a chloru, ale také vápníku a draslíku, obsaženými v extracelulární matrix a v buňkách. Endogenní elektrické pole má vysokou intenzitu kolem rány, a čím blíže ke středu je, tím jeho intenzita klesá. (Jia *et al*, 2021; Tai *et al*, 2018)

5.2 Význam při hojení ran

Endogenní elektrické pole hraje především důležitou roli v migraci buněk. Jeho vliv však nastává hned na začátku poranění, a to u fáze hemostázy, kde napomáhá vzniku sraženiny. Následující zánětlivé fáze se účastní neutrofilů a makrofágů, jejichž úkolem je ránu vyčistit, zbavit ji nežádoucích látek a mikroorganismů. Pomoc endogenního elektrického pole v této fázi spočívá v podpoře pohybu buněk imunitního systému směrem k ráně a lepšího odstraňování cizorodých látek ze strany makrofágů. Třetí fází je proliferace, ve které už endogenní elektrické pole ovlivňuje pohyb buněk především keratinocytů, ale také fibroblastů a buněk tvořící cévy. (Jia *et al*, 2021) V případě vnějšího elektrického pole jsou také některé buňky orientovány a přitahovány více ke katodě a druhé k anodě, jako je tomu například u fibroblastů. (Farber *et al*, 2021) Bylo zjištěno, že je to zásadní funkce, jelikož toto pole může migraci ovlivnit mnohem více než ostatní faktory. Vypadá to, že okolí rány spolupracuje, aby se buňky dostaly do rány a hojení probíhalo, jak má.

Elektrickému poli v tom napomáhá také nedostatek kyslíku v ráně, což také spouští následující procesy hojení. (Jia *et al*, 2021) V této fázi se obnovují cévy, což je důležité při okysličení hojící se tkáně. Vliv na hojení může mít shlukování erytrocytů v krvi, k čemuž nedochází, jelikož mají záporný zeta potenciál. Na zápornou hodnotu zeta potenciálu mají především vliv sialové kyseliny na povrchu erytrocytů. Ke shluku erytrocytů může docházet u diabetiků, což následně komplikuje hojení. (Farber *et al*, 2021) Konečnou fází hojení rány je remodelace, u které endogenní elektrické pole pokračuje v navádění buněk k ráně, v této fázi konkrétně fibroblastů. Fibroblasty postupně degradují a znovu vytváří extracelulární matrix, a nakonec vzniká jizva. (Jia *et al*, 2021)

5.3 Elektrická stimulace

Externí elektrická stimulace by mohla být v budoucnu velmi přínosná v oblasti hojení ran, a to především ran chronických a nehojících se. Je to napodobení přirozeného elektrického pole, které se vytváří při procesu hojení, pomocí aplikace vnějšího elektrického proudu. Důležité je zjistit jaká intenzita, doba a podoba elektrické stimulace by byla nejlepší pro podporu hojení. Problémem je, aby se přístroj, dodávající do rány elektrický proud, přímo nedotýkal kůže. (Tai *et al*, 2018) Pro různé zkoušky již na pacientech se využívá stejnosměrný elektrický proud, u nějž byl zjištěn rychlejší hojení nehojících se ran, konkrétně vředů. Zkouší se také pulzní proud, který se rozděluje na monofázický a bifázický. (Jia *et al*, 2021) Do monofázických spadá často využívaný vysokonapěťový pulzní proud neboli HVPC, tento proud je používán krátkodobě a byly u něj rovněž lepší výsledky ve srovnání s ranami, které byly léčeny bez elektrické stimulace. (Jia *et al*, 2021; Tai *et al*, 2018) Pro co nejbližší napodobení přirozeného elektrického pole, byla vytvořena konstrukce, u které se nachází negativní elektroda uprostřed rány a pozitivní okolo. Tento typ aplikace se nazývá směrové elektrické pole a rána se s touto aplikací rychleji zmenšila. (Jia *et al*, 2021)

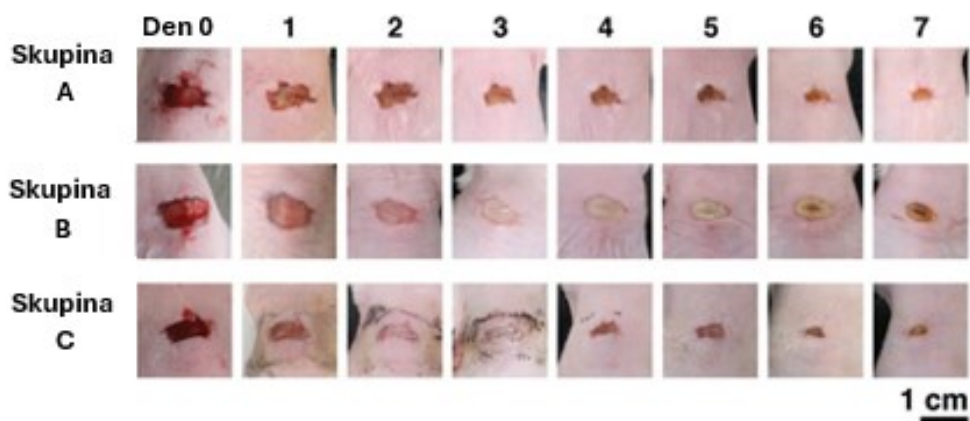
Požadavkem v elektrické stimulaci může být také pohodlná aplikace a menší velikost zařízení. Byla tedy vytvořena bioelektrická náplast vytvářející iontový proud. Náplast obsahuje enzymatické biopalivové články, hydrogel, lékařská lepicí páska a elastický vodivý rezistor. Tyto části dávají dohromady náplast, která je i pružná a pohyb nepřekáží ve správném fungování a dodávání stejnosměrného elektrického proudu. Náplast se testovala na ránách u myši a na obrázku číslo 6 lze vidět, jak náplast na jedné z nich vypadá. (Kai *et al*, 2017)



Obrázek 6 Bioelektrická náplast na laboratorní myši

(Kai *et al.*, 2017)

Na obrázku 7 lze vidět, jak probíhalo zacelování rány u tří druhů hojení. Ve všech skupinách se nacházelo sedm myší. U skupiny A se hojení ničím nepodpořilo, skupině B byl aplikován hydrogel, který je součástí bioelektrické náplasti a skupina C měla na ráně bioelektrickou náplast. Po sedmi dnech se testování ukončilo. Na konci byla velikost rány skupiny A a C srovnatelně velká, ale skupina C měla výhodu v tom, že probíhalo vlhké hojení, což snižuje tvorbu jizev. (Kai *et al.*, 2017)

Obrázek 7 Testování bioelektrické náplasti (C) v porovnání s hydrogelem (B) a přirozeným hojením (A) (Kai *et al.*, 2017)

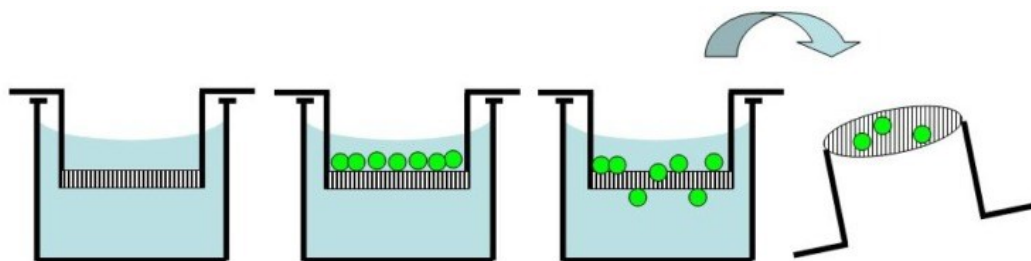
5.4 Vliv na buněčnou migraci

Migrace buněk je důležitá část hojení ran. Buňky se musí dostat do místa poranění a v tom jim napomáhá právě elektrické pole. Tento jev, kdy se buňky pohybují na základě elektrického podnětu, se nazývá elektrotaxe. Elektrickým polem se v buňkách aktivují signální dráhy, kterými buňky vnímají elektrické pole a následně mohou reagovat. V keratinocytech se aktivuje fosofinositid 3-kináza (P13) na straně katody. (Zhao, 2009)

Zjišťovalo se, jak elektrotaxe funguje, ale ze začátku spíše na buňkách osamocených, což dává zkreslenou odpověď, jelikož při hojení ran jsou buňky ve shluku a komunikují spolu díky buněčným spojům, a to ovlivňuje také elektrotaxi. Při provedení testů na monovrstvě keratinocytů bylo zjištěno, že se pohybují směrem k anodě a buňky na okraji této monovrstvy nebyly tak aktivní jako ostatní. K testům na monovrstvu použili stejnosměrné elektrické pole o velikosti 0,5 V/cm a po čtvrt hodině již zaznamenali posun keratinocytů právě směrem k anodě a až následně probíhala reorientace. (Cho *et al*, 2018)

5.5 Testování buněčné migrace

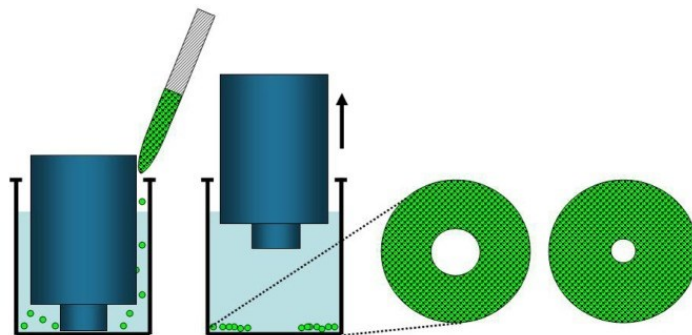
V následující části budou uvedeny různé testy, kterými lze hodnotit migraci buněk. První z testů je Boydenova komorová zkouška, u které buňky prochází z komory o menší koncentraci séra do komory s vyšší koncentrací séra oddělující se od sebe membránou. Buňky prochází přes membránu s póry o menším průměru, než je ten jejich. Vyhodnocení poté probíhá určením množství prošlých buněk, histologickým barvením buněk či použitím fluorescenčních barviv, u kterých se nemusí odstraňovat buňky zůstávající na straně s nižší koncentrací média. (Kramer *et al*, 2013) Tento test může být prováděn například s fibroblasty. (Monsuur *et al*, 2016) Proces Boydenovy komorové zkoušky lze vidět na obrázku číslo 8.



Obrázek 8 Boydenova komorová zkouška (Hulkower a Herber, 2011)

Scratch test je jednou z možností, jak analyzovat migraci buněk. Tento jednoduchý test je proveden vytvořením rýhy, často špičkou pipety, do monovrstvy buněk. Následně je mikroskopicky pozorován úbytek neosídlené části rýhy buňkami. Zkreslovat výsledky testu mohou buňky, které se neúplně odchlípily od povrchu v oblasti provedené rýhy a v průběhu testu se opět v této oblasti přichytily k povrchu. Další z nevýhod je nekonstantní šířka rýhy v celé své délce. (Kramer *et al*, 2013) Tento test byl proveden například u monovrstvy keratinocytů. Buňky byly nabarveny fluorescenčními barvivy, rýha byla focena do doby úplného zacelení a fotky následně vyhodnoceny v programu Image-J. (Walter *et al*, 2010)

Test s vyloučenou buněčnou zónou je podobný testu předchozímu a jeho proces je možno vidět na obrázku číslo 9. V tomto případě se neobjevují negativa scratch testu. Vzniká ohraničená oblast o definované velikosti a buňky navíc nejsou poškozeny. Na trhu existují destičky s jamkami a zátkami, které pevně přilnou k povrchu, tak aby se následně nasazené buňky nedostaly mezi povrch jamky a zátku. Po odejmutí zátek u části jamek se sleduje zacelení oblasti. Další část jamek se zátkami slouží jako reference. (Hulkower a Herber, 2011)



Obrázek 9 Test s vyloučenou buněčnou zónou
(Hulkower a Herber, 2011)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo prohloubení dosavadního poznání v oblasti působení exogenního elektrického pole na hojení kožních poranění. Pomocí scratch testů byla zjišťována migrace buněk třech buněčných linií:

- myší embryonální fibroblasty NIH/3T3,
- lidské epidermální keratinocyty HaCaT,
- myší embryonální kmenové buňky ES-R1.

Testy byly provedeny na monovrstvách s vnějším elektrickým polem a pro porovnání i bez něj. Následné určení vlivu elektrického pole na migraci buněk bylo vyhodnoceno pomocí softwarové analýzy.

7 METODA KULTIVACE BUNĚČNÝCH LINIÍ A PROVEDENÍ SCRATCH TESTŮ

7.1 Použité látky a přístroje

Pro kultivaci buněčných linií a scratch testy byly použity následující látky a pomůcky: Hydrogenuhlíčan sodný prášek (PAA, Rakousko), Dulbecco's Modified Eagle médium (DMEM, Gibco, Spojené státy americké), DMEM s vysokým obsahem glukózy (Biosera, Francie), Roswell Park Memorial Institute médium 1640 (RPMI médium 1640, Gibco, Spojené království), fetální bovinní sérum (Biowest, Spojené státy americké), telecí sérum (Biosera, Francie), penicilin-streptomycin (Lonza, Belgie), MEM roztok neesenciálních aminokyselin 100X (MEM NEAA, Gibco, Spojené státy americké), 2-merkapt ethanol (Serva, Německo), faktor inhibující leukémii (LIF, Chemicon, Spojené státy americké), želatina (Penta, Česká republika), Trypsin-EDTA 10X (Biosera, Francie), ROTI[®]Cell fyziologický roztok s fosfátovým pufrem (PBS, Carl Roth, Německo), kultivační nádoby a mističky (TPP, Švýcarsko), drátek – 90 % platiny, 10 % iridia (GoodFellow, Německo).

Dále pak byly pro experiment použity tyto přístroje: centrifuga 5702 R (Eppendorf, Česká republika), laminární box Bio130 A2 s příslušenstvím (Alpina, Polsko), inkubátor Heracell[™] 150i s příslušenstvím (Thermo Scientific, Spojené státy americké), inverzní mikroskop IX51 (OLYMPUS Japan, Japonsko), fluorescenční mikroskop Olympus IX81 (OLYMPUS Japan, Japonsko), digitálně řízený a programovatelný stejnosměrný napájecí zdroj, model 72-10480 (Tenma, Spojené království).

7.2 Kultivace fibroblastů

Myší embryonální fibroblasty NIH/3T3 (ECACC 93061524, England) byly kultivovány v kultivačních nádobách o objemu 75 ml v inkubátoru při 37 °C a 5% koncentrací oxidu uhličitého. V laminárním boxu pak následovalo pasážování, kdy se kultivační nádoba naklonila a odsálo se médium, ze kterého si buňky braly živiny. Médium obsahovalo DMEM s vysokým obsahem glukózy, hydrogenuhlíčan sodný, telecí serum (10 obj. %) a penicilin-streptomycin (1 obj. % roztoku o 100 µg/ml). Po odsátí veškerého média se přidalo 15 ml PBS, jehož účelem bylo odplavit odumřelé buňky a zbytky média. PBS se tedy pomalu nalávalo na plochu porostlou fibroblasty a poté se odsálo. Dále bylo přidáno 7,5 ml trypsinu. Ten se nechal působit po dobu tří minut, přes které byla kultivační lahev s fibroblasty a trypsinem umístěna do inkubátoru. Po uplynutí této doby

se zkontrolovalo, zda se fibroblasty oddělily od povrchu. Kontrola probíhala pohledem, kdy vidíme bílé shluky buněk pohybovat se v trypsinu. Pokud tato kontrola nebyla dostatečná, zkontroloval se pohyb buněk v médiu pod inverzním mikroskopem. K trypsinu s fibroblasty se přidalo 7,5 ml média a pomocí pipety se celý tento roztok s buňkami převedl do zkumavky. Zkumavka byla umístěna do centrifugy na tři minuty při 1100 rpm. Zkumavka se vyjmula z centrifugy a postupně se s opatrností odsál supernatant, tak aby ve zkumavce zůstaly všechny fibroblasty. K těmto fibroblastům se přidal 1 ml čerstvého média a suspenze se zhomogenizovala. S touto suspenzí se následně pracovalo při přípravě scratch testů.

7.3 Kultivace keratinocytů

Kultivace a následné pasážování lidských epidermálních keratinocytů HaCaT (Boukamp *et al*, 1988) probíhalo velmi podobně jako u fibroblastů. Keratinocyty byly kultivovány v kultivačních lahvích o objemu 25 ml také v inkubátoru. Médium pro keratinocyty obsahovalo RPMI médium 1640, hydrogen uhličitán sodný, fetální bovinní sérum (10 obj. %) a penicilin-streptomycin (1 obj. % roztoku o 100 µg/ml). V laminárním boxu se provádělo pasážování, při kterém bylo opět prvním krokem odsátí média. Poté se přidalo 5 ml PBS, které se následně odsálo a tento krok s PBS se opakoval ještě jednou. Následovalo přidání trypsinu, jehož množství bylo 2,5 ml. Tentokrát se nechal působit déle, a to přesně deset minut, přes které se kultivační nádoba umístila zpět do inkubátoru. Po uplynutí deseti minut byla na řadě kontrola, zda se buňky oddělily od povrchu. K trypsinu a keratinocytům se přidalo 2,5 ml média a vše se převedlo do zkumavky. Zkumavka se umístila do centrifugy na pět minut při 1100 rpm. Po ukončení se v laminárním boxu odsál supernatant a k buňkám se přidal 1 ml čerstvého média. Suspenze se opět zhomogenizovala a dále se s ní pracovalo při přípravě scratch testu.

7.4 Kultivace kmenových buněk

Kultivace a pasážování myších embryonálních kmenových buněk ES-R1 (Nagy *et al*, 1993) probíhala částečně odlišně než u fibroblastů a keratinocytů. Kmenové buňky byly kultivovány v mističkách o objemu 2 ml v inkubátoru při 37 °C. Médium u těchto buněk obsahovalo DMEM, MEM NEAA (100 mM), 2-merkptoethanol (0.05 mM), telecí sérum (16.5 obj. %), penicillin-streptomycin (1 obj. % roztoku o 100 µg/ml) a LIF (5 ng/ml). Po vydání z inkubátoru bylo v laminárním boxu odsáno médium a povrch s kmenovými buňkami byl opláchnut 1 ml PBS. PBS se následně odsálo a tento krok se provedl ještě

jednou. U dalšího kroku se přidalo 150 μ l trypsinu, který se nechal na buňky působit po dobu dvou až tří minut. Stejně jako u ostatních buněk se provedla kontrola, zda jsou buňky odděleny od povrchu. K trypsinu a kmenovým buňkám se přidalo 1 ml média a provádělo se postupné nasávání a vypouštění pipetou. Při vypouštění suspenze se vždy postupně obkroužila mistička, aby do suspenze přešly všechny kmenové buňky. S touto suspenzí se pak následně pracovalo u přípravy scratch testu. V případě kmenových buněk se neprováděla centrifugace, jelikož jsou tyto buňky velmi citlivé. Menší riziko je nechat jim v médiu malé množství trypsinu, což snesou lépe než centrifugaci.

7.5 Scratch testy

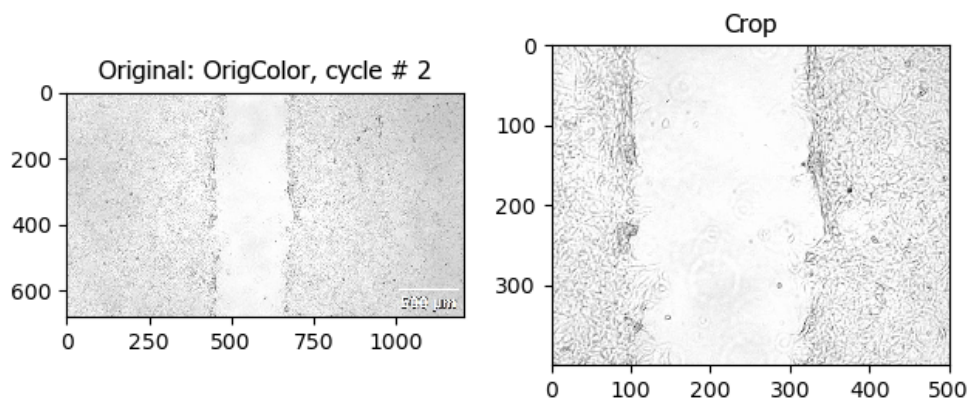
Připravená suspenze fibroblastů uvedená výše se naředila a do mističky o objemu 2 ml se nasadila suspenze o koncentraci fibroblastů $1 \cdot 10^6$ na 1 ml média. Stejně se postupovalo u keratinocytů. Předtím než se do mističek nasadily kmenové buňky, musel se na plastik provést povlak 0,1% želatiny, která byla předem vyautoklavována. Poté se mohlo ze suspenze 1 ml odebrat 150 μ l suspenze, dát do nově upravených mističek a doplnit médiem do 2 ml. Vždy byly u buněk připraveny dvě mističky, které se daly do inkubátoru, a na druhý den se zkontrolovalo, zda je plocha dostatečně porostlá buňkami. Pokud ano, následoval postup u všech buněk stejný. Do obou mističek se, v laminárním boxu, v monovrstvě vytvořila pipetovací špičkou rýha. Uvolněné buňky byly odstraněny promytím a odsátím PBS. Ihned byly pořízeny fotografie na fluorescenčním mikroskopu v čase 0. U buněk s použitím exogenního elektrického proudu byly do víka mističky naproti sobě vytvořeny dírký, kterými byly provlečeny drátky, tak aby se dotýkaly média. Obě mističky se umístily do inkubátoru, k drátkům byl připojen stejnosměrný napájecí zdroj, který vytvářel elektrické pole 50 mV a 1 mA. Druhá mistička byla referenční. Postupně se po hodině následujících 8 hodin obě rýhy fotily vždy na stejném místě a poslední fotka byla pořízena 24 hodin od provedení rýhy. Fotky byly následně vyhodnoceny v programech ImageJ a CellProfiler.

8 VÝSLEDKY

8.1 Průběh vyhodnocení scratch testu

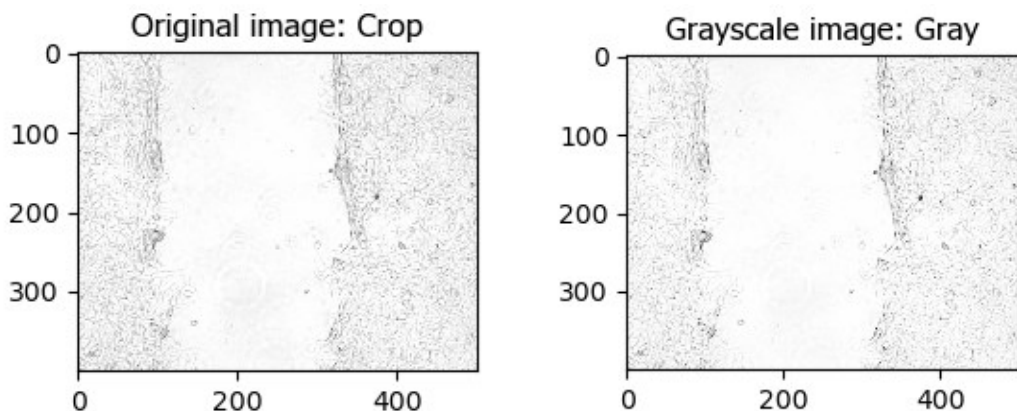
Fotografie ze všech provedených scratch testů byly zpracovány v programu open-access CellProfiler software 4.2.6 (Carpenter *et al*, 2006) v několika krocích, které jsou níže uvedeny i s názornými obrázky.

Jako první krok je Crop, který ořízne obrázek, lze ho vidět na obrázku 10. Aby bylo možné zaměřit se na konkrétní část, byly obrázky oříznuty na velikost (500 x 400) pixelů.



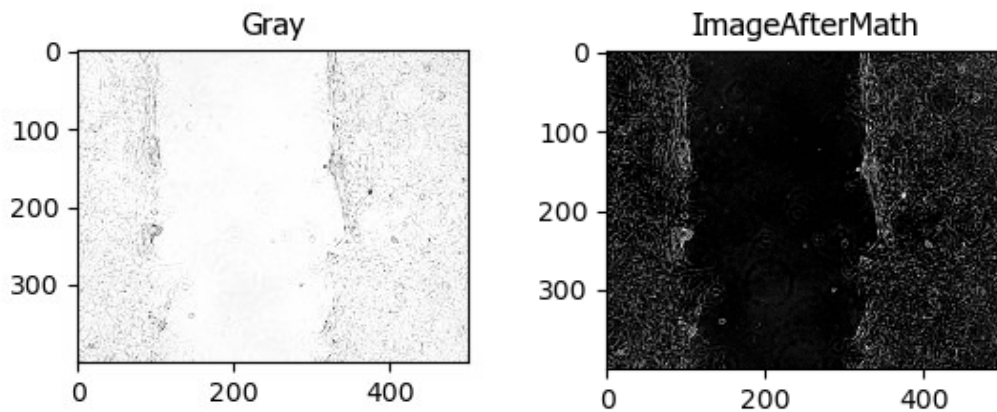
Obrázek 10 Crop. Vlevo před úpravou, vpravo po.

Druhým krokem je ColorToGray, ten převede obrázek s více barevnými kanály na jeden nebo více obrázků ve stupních šedi, což je vidět na obrázku 11. Tímto krokem se fotografie převede do černobílého provedení. Nutné pro další zpracování.



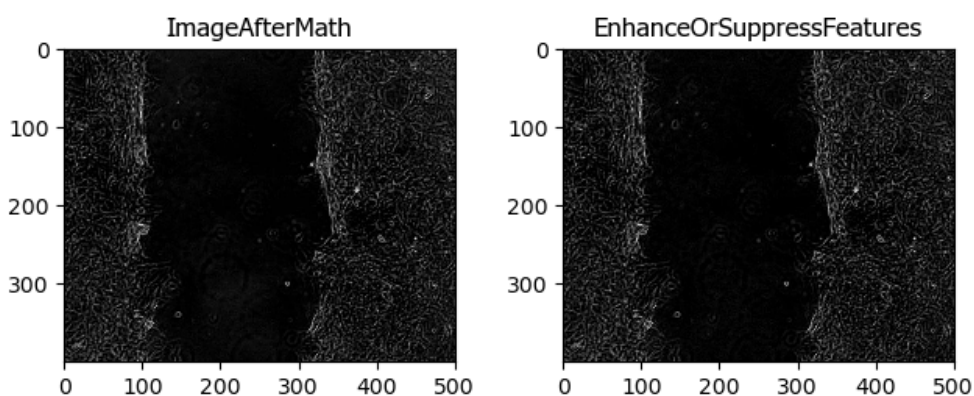
Obrázek 11 ColorToGray. Vlevo před úpravou, vpravo po.

Třetí krok je na obrázku 12. což je ImageMath provádějící jednoduché matematické operace s intenzitami obrázků. Konkrétně byla provedena Inverze: Tím se nejtmaší barva stane nejsvětější a naopak. Inverze převede fotografii tak, aby měla černé pozadí a buňky barvy bílé, a mohlo tak dojít k vyhodnocení.



Obrázek 12 ImageMath. Vlevo před úpravou, vpravo po.

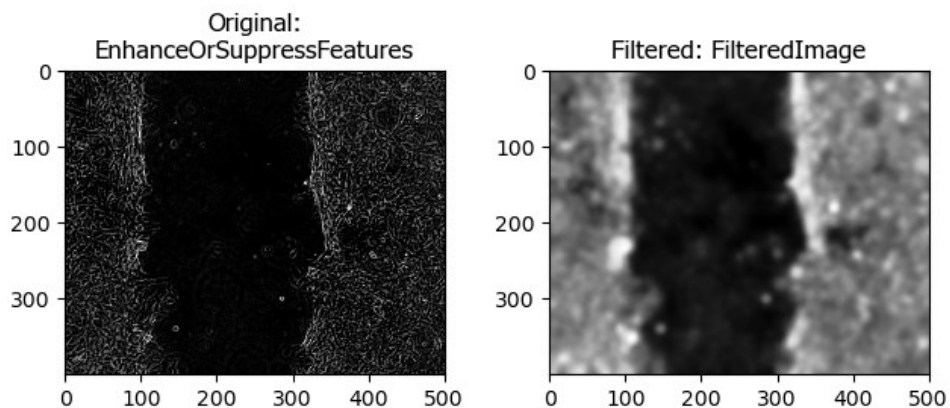
Čtvrtý krok je EnhanceOrSuppressFeatures, který zvýrazní nebo potlačí určité obrazové rysy (například skvrny, prstence a neurity), což může zlepšit následnou identifikaci objektů. Tento modul zvyšuje nebo potlačuje intenzitu určitých pixelů vzhledem ke zbytku obrazu tím, že na obraz aplikuje filtry pro zpracování obrazu.



Obrázek 13 EnhanceOrSuppressFeatures. Vlevo před úpravou, vpravo po.

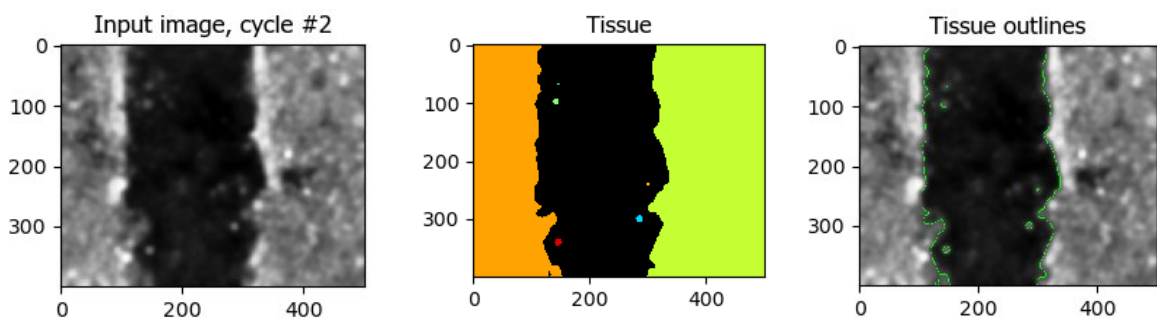
Pátý krok Smooth vyhlazuje, zjemní obrazy. Tento modul umožňuje vyhlazovat, rozostřit obrázky, což může být užitečné pro odstranění drobných artefaktů. Metoda vyhlazování: Vyhlazení obrázků se provádí pomocí takzvaného Gaussian Filter. Jejím účinkem je rozmazání a zakrytí prvků menších než zadaný průměr a rozprostření jasných nebo

tmavých prvků větších než zadaný průměr. Krok Smooth, jenž je na obrázku 14, umožňuje vytvořit jednolitou vrstvu, tudíž program správně vyhodnotí jen plochu rány.



Obrázek 14 Smooth. Vlevo před úpravou, vpravo po.

Šestým krokem je IdentifyPrimaryObjects, jenž identifikuje biologické objekty zájmu, obvykle organismus, buňku nebo buněčný oddíl (například jádra, buňky, kolonie, červy). Vyžaduje snímky ve stupních šedi obsahující světlé objekty na tmavém pozadí. S tímto krokem bývají největší problémy. Krok číslo sedm MeasureImageAreaOccupied měří celkovou plochu v obraze, kterou zabírají objekty definované jedním z modulů Identify. Šestý a sedmý krok z vyhodnocování v programu CellProfiler je na obrázku 15.



Obrázek 15 Identifikace plochy

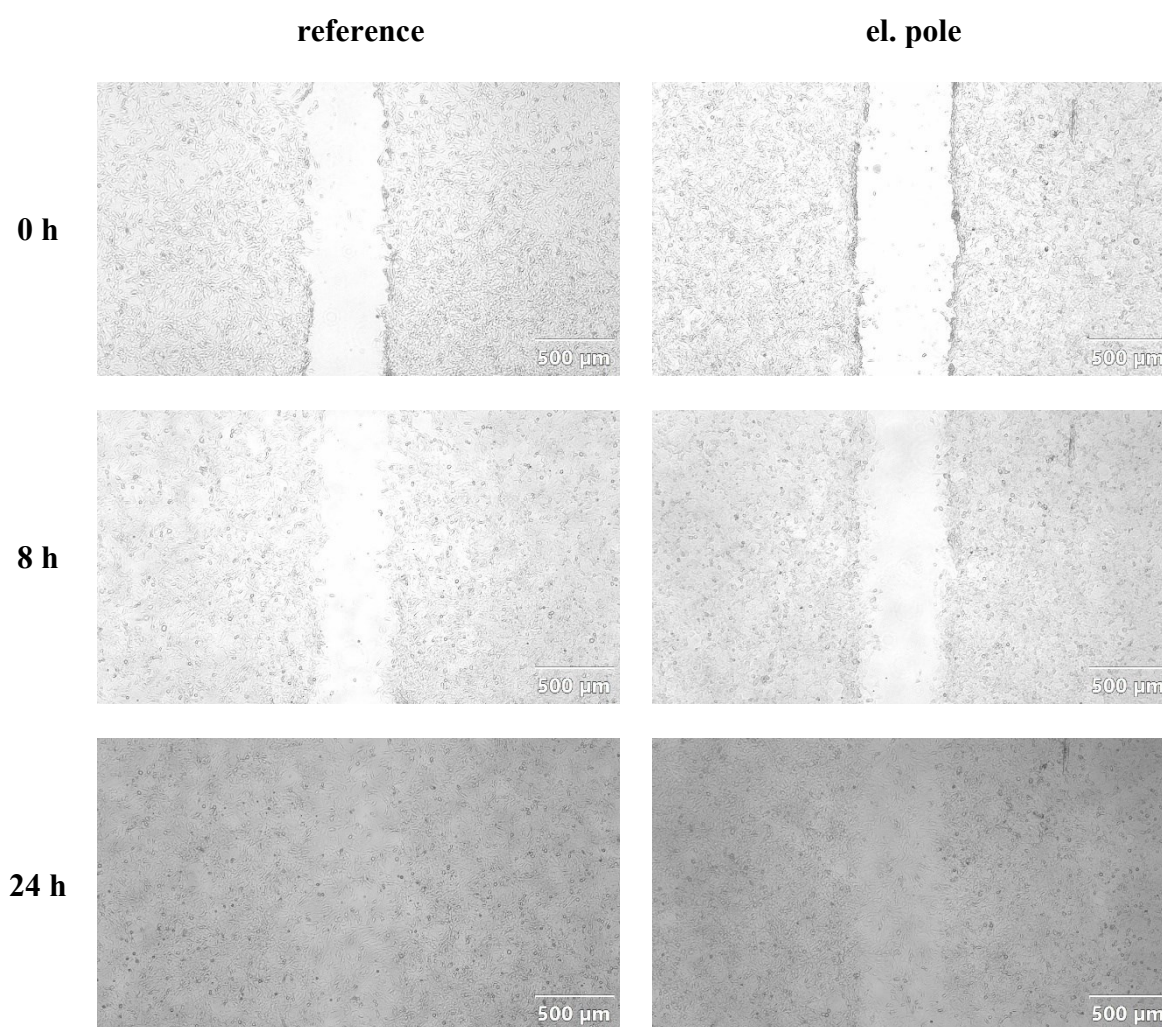
Posledním krokem je ExportToSpreadsheet, který exportuje měření do jednoho nebo více souborů, které lze otevřít v aplikaci Excel nebo jiných tabulkových procesorech.

Scratch testy byly vyhodnoceny rovněž v programu ImageJ. V praktické části bakalářské práce jsou však uvedeny jen výsledky z programu CellProfiler, jelikož výsledky z obou

programů byly v celku srovnatelné, ale křivky grafů v případě nakonec zvoleného programu vykazovaly menší odchylky a výsledky byly přesnější.

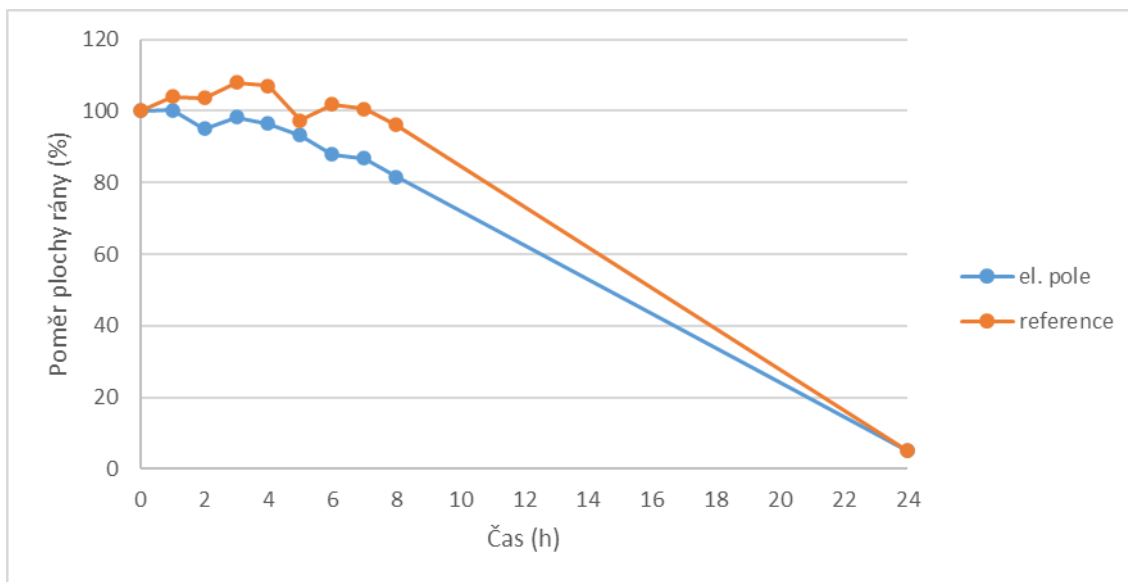
8.2 Fibroblasty

Na obrázku číslo 16 jsou fotografie ze scratch testů fibroblastů v čase 0, po 8 hodinách od začátku testu a po 24 hodinách. Vlevo jsou fotografie z reference a vpravo fotografie z testu při použití elektrického pole. Všechny fotografie byly pořízeny fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 40×. Při pořizování fotografií z testu s aplikací elektrického pole byla katoda vlevo a anoda vpravo.



Obrázek 16 Mikrofotografie ze scratch testů fibroblastů v časech 0, 8 a 24 hodin. Zvětšení 40×.

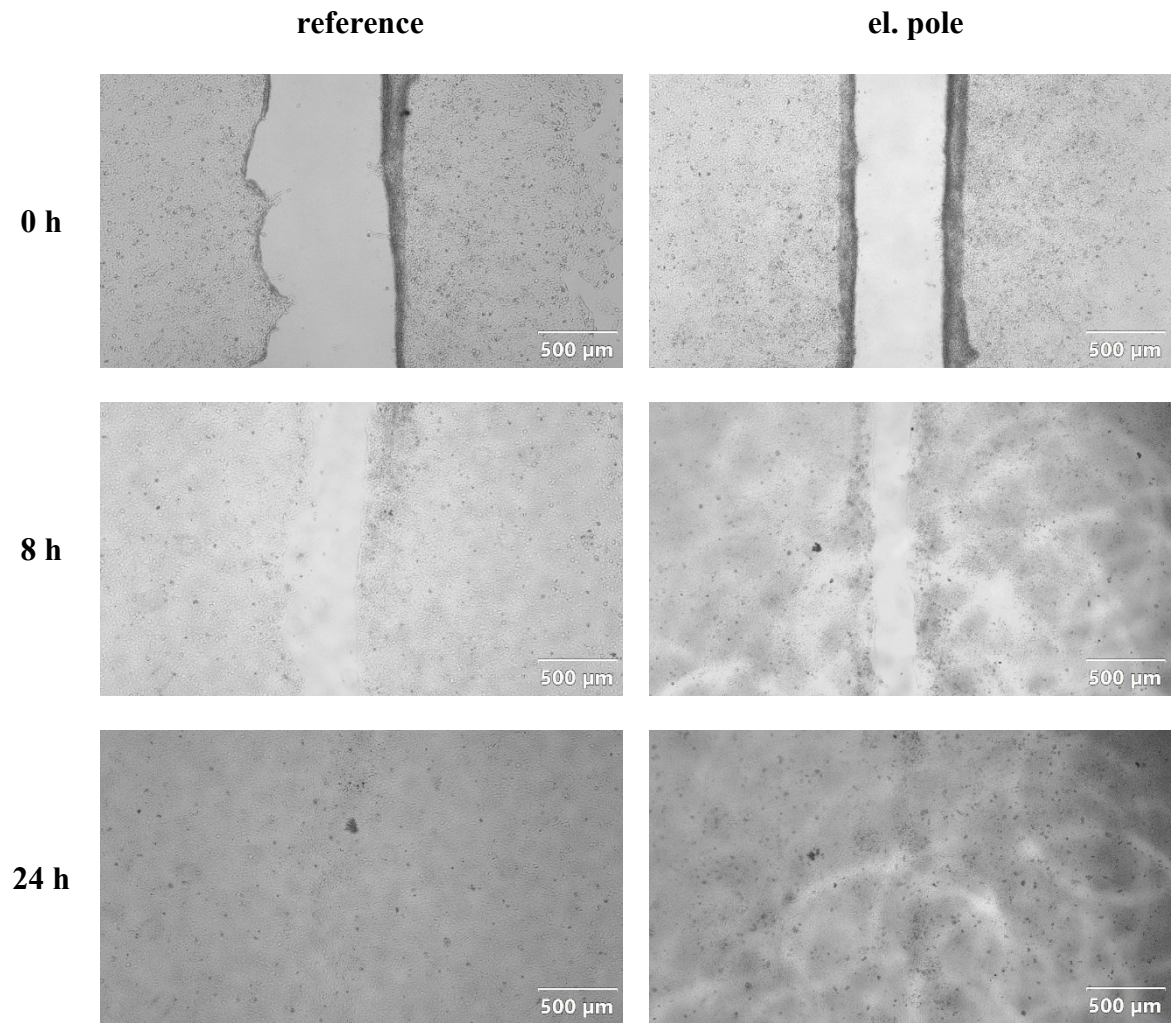
Na obrázku 17 je grafické zpracování výsledku testu. Pro porovnání je v jednom grafu křivka pro referenci a křivka, kdy bylo použito elektrické pole. V obou případech lze vidět, že se plocha simulující ránu postupně zmenšuje.



Obrázek 17 Grafická závislost poměru plochy rány na době trvání testu u fibroblastů

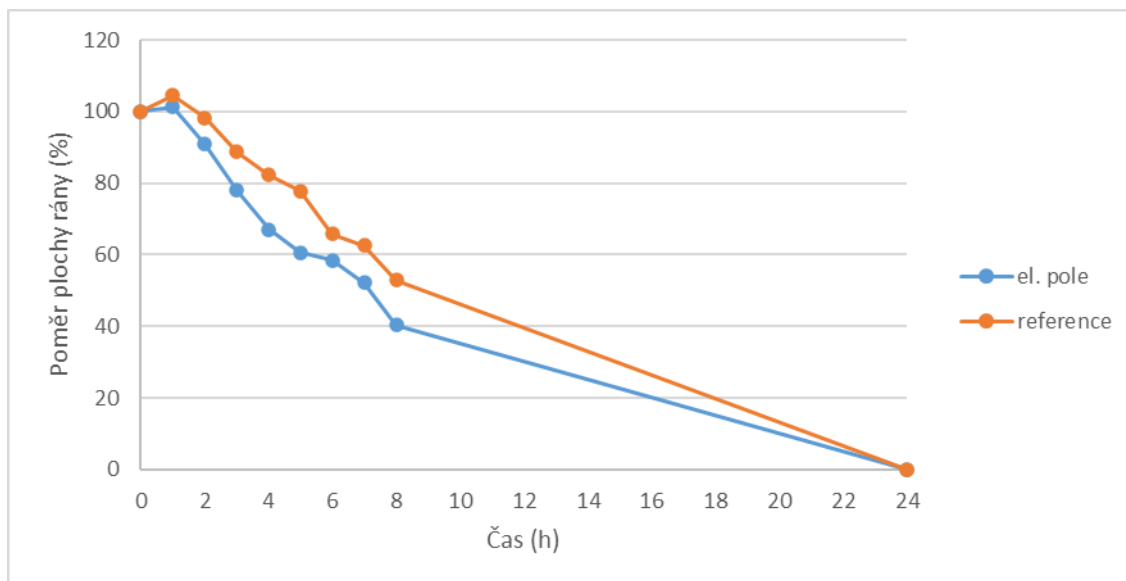
8.3 Keratinocyty

Na obrázku číslo 18 jsou fotografie ze scratch testu keratinocytů v čase 0, po 8 hodinách od začátku testu a po 24 hodinách. Vlevo jsou fotografie z reference a vpravo fotografie z testu při použití elektrického pole. Na fotografiích je velmi homogenní rýha, což je způsobeno největší adhezí keratinocytů k povrchu, vzhledem k ostatním použitým buňkám. Všechny fotografie byly pořízeny fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 40 \times . Při pořizování fotografií z testu s aplikací elektrického pole byla katoda vlevo a anoda vpravo.



Obrázek 18 Mikrofotografie ze scratch testů keratinocytů v časech 0, 8 a 24 hodin.
Zvětšení 40×.

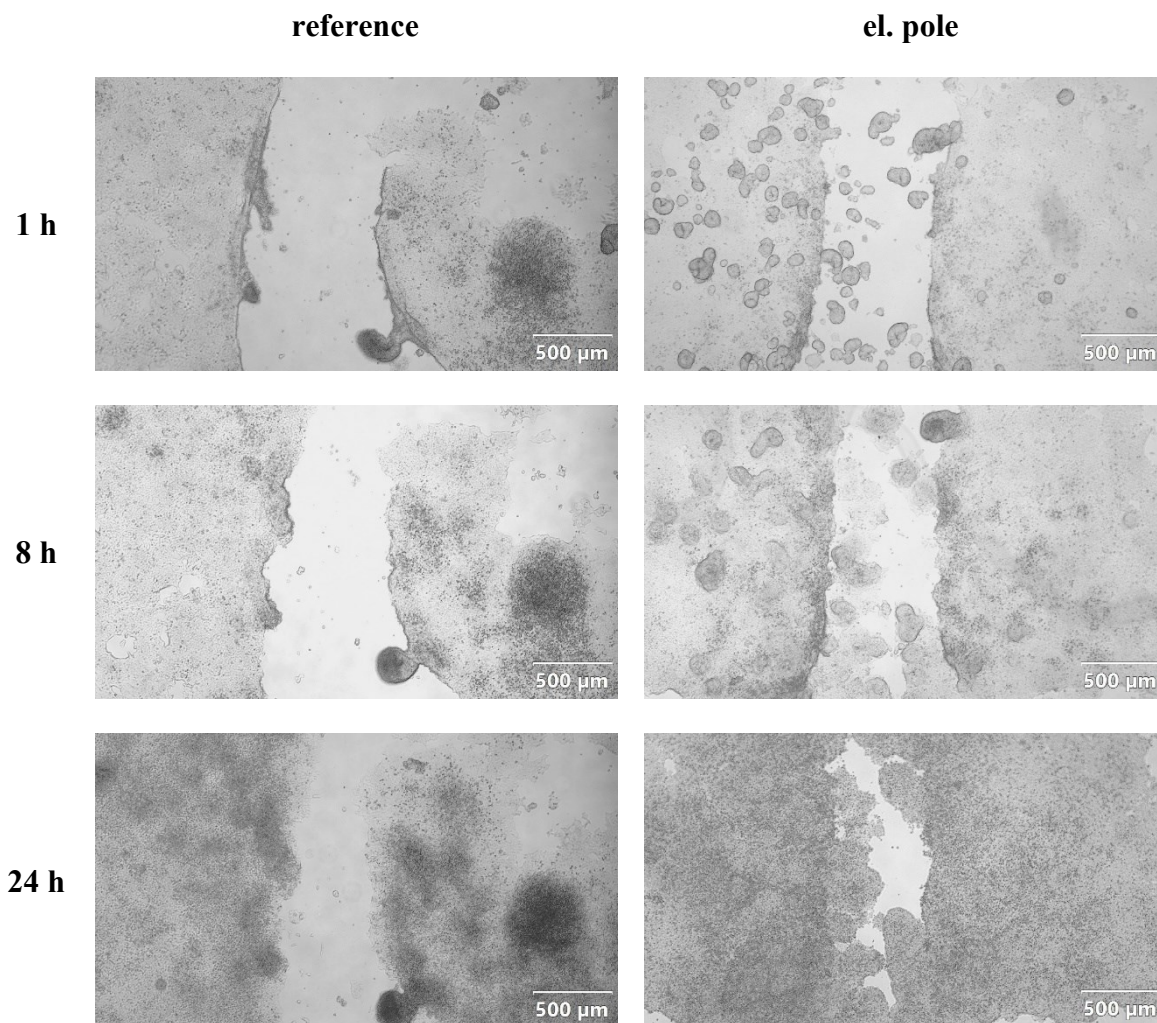
Na obrázku 19 je grafické zpracování výsledku testu. Pro porovnání je v jednom grafu křivka pro referenci a křivka, kdy bylo použito elektrické pole. V obou případech lze vidět, že se plocha simulující ránu postupně zmenšuje, až je úplně zacelena.



Obrázek 19 Grafická závislost poměru plochy rány na době trvání testu u keratinocytů

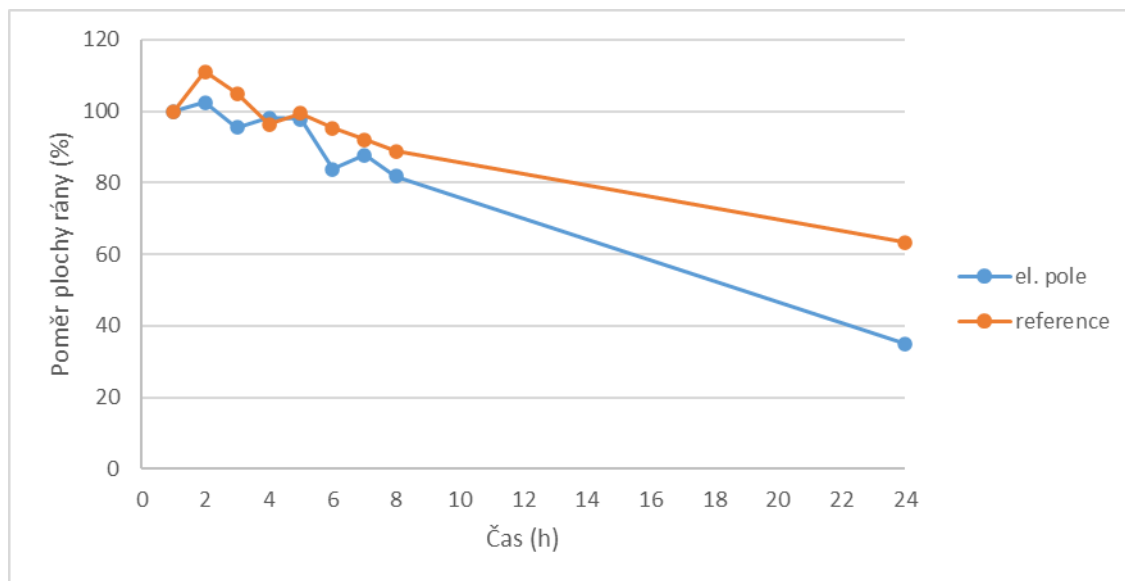
8.4 Kmenové buňky

Na obrázku číslo 20 jsou fotografie ze scratch testu kmenových buněk v čase 1, po 8 hodinách od začátku testu a po 24 hodinách. Vlevo jsou fotografie z reference a vpravo fotografie z testu při použití elektrického pole. Všechny fotografie byly pořízeny fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 40×. V případě kmenových buněk se test vyhodnocoval od jedné hodiny po začátku testu, jelikož v průběhu této první hodiny testu, u reference, se část monovrstvy buněk, která byla v oblasti rány, oddělila a výsledek by nebyl porovnatelný s fotografií v čase 0. Tento problém se vyskytuje u scratch testů poměrně často. Při pořizování fotografií z testu s aplikací elektrického pole byla katoda vlevo a anoda vpravo.



Obrázek 20 Mikrofotografie ze scratch testů kmenových buněk v časech 0, 8 a 24 hodin.
Zvětšení 40×.

Na obrázku 21 je grafické zpracování výsledku testu. Pro porovnání je v jednom grafu křivka pro referenci a křivka, kdy bylo použito elektrické pole. V obou případech lze vidět, že se plocha simulující ránu postupně zmenšuje.



Obrázek 21 Grafická závislost poměru plochy rány na době trvání testu u kmenových buněk

9 DISKUZE

V praktické části této práce se zjišťovalo, jaký vliv má stejnosměrný elektrický proud na migraci buněčných linií fibroblastů, keratinocytů a kmenových buněk.

Na obrázku 17 jsou křivky zmenšení nepokryté plochy fibroblasty v čase u reference a aplikace elektrického pole. Je možno z něj zjistit, že v prvních hodinách se u reference plocha rány mírně zvětšila. U scratch testu je to však časté z důvodu vytvoření rýhy pipetovací špičkou, která může poškodit okolní buňky, jež se nakonec oddělí od monovrstvy. V případě použití elektrického pole je však tento negativní jev potlačen a migrace buněk je znatelně rychlejší. Po 8 hodinách v elektrickém poli byla rána z 18,4 % zacelena, zatímco u reference měla rána téměř původní rozměr. Avšak na konci testu je vidět, že došlo k pokrytí stejného množství plochy. Scratch test na krysích mezenchymálních fibroblastech provedený ve studii Park *et al*, 2014 prokázal podobné výsledky. V jejich případě se zjistilo, že po 12 hodinách od začátku testu fibroblasty migrovali čím dál pomaleji a nejrychleji se uzavřela rána v případě použití elektrického pole $92,3 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Experimenty s keratinocyty již také byly prováděny, a to například zjištěním jejich migrace pomocí testu s vyloučenou buněčnou zónou, kdy k vytvoření rýhy simulující ránu byla použita silikonová páska. Ve studii Lu *et al*, 2021 byla zjištěna větší rychlost pokrytí rýhy v případě aplikace vnějšího elektrického pole o velikosti $200 \text{ mV}\cdot\text{mm}^{-1}$. U testu s keratinocyty prováděném v této bakalářské práci byly plochy na konci testu plně pokryty buňkami, a to jak u reference, tak s použitím elektrického pole. To lze vidět na obrázku 19, kde je porovnání testů s keratinocyty. Jak u reference, tak v případě aplikace elektrického pole dochází k rychlému zmenšení simulované rány. Po 8 hodinách od začátku testu jsou výsledky poměrně podobné, ale u testu s elektrickým polem bylo dosaženo lepšího výsledku (40,4 % poměr plochy rány) v porovnání s referencí (52,9 % poměr plochy rány).

Na obrázku 21 jsou křivky z testů s kmenovými buňkami, kdy v prvních 8 hodinách se velmi pomalu zmenšovala plocha simulující ránu u reference i u vzorku s použitím elektrického pole. Po 8 hodinách byl poměr plochy rány u reference 88,8 % a u aplikace elektrického pole byl výsledek lepší a to přesně 81,8 %. Na konci scratch testu lze vidět, že v případě vzorku s aplikovaným elektrickým polem kmenové buňky pokryly větší množství rány než u reference, a to o 28 %.

Výsledky ukazují, že celkově má elektrické pole příznivý vliv na všechny tři použité buněčné linie. Největší účinek byl zaznamenán u kmenových buněk. Ukazuje se tedy, že by elektrická stimulace mohla příznivě přispět v oblasti hojení ran, jelikož migrace buněk je důležitým faktorem v tomto procesu.

ZÁVĚR

Tato práce vznikla za účelem příspěvku informací do obsáhlého tématu zlepšování hojení ran. Elektrické pole hraje v procesu hojení důležitou roli, a proto bylo zajímavé zjišťovat, jak velký vliv by mělo exogenní elektrické pole. K těmto znalostem se lze dostat přes migraci klíčových buněk pro hojení jako je tomu v této práci. Teoretickou částí bylo popsáno, jaké vrstvy se nacházejí v kůži a buňky, jež je tvoří. Důležitým bodem byl i proces hojení a jaké faktory by tento proces či jeho části mohly ovlivnit. K urychlení a příznivějšímu průběhu hojení se využívá mnoho biomateriálů a v této části jich bylo pár představeno. Nakonec bylo uvedeno, jak elektrické pole ovlivňuje hojení a buňky, které se na něm podílejí.

Pro praktickou část byly provedeny testy buněčné migrace s elektrickým polem a bez pro srovnání. Tyto testy byly prováděny na třech buněčných liniích po dobu 24 hodin a mikroskopem pořízené fotografie byly vyhodnoceny pro zjištění úbytku neobsazené plochy buňkami v čase. Výsledky uvedené v této práci byly z programu CellProfiler. Byl zjištěn pozitivní vliv elektrického pole na buněčnou migraci fibroblastů, keratinocytů a kmenových buněk. U fibroblastů nebyl vliv výrazný, avšak po osmi hodinách testu byla poměr plochy rány u reference téměř stejný a u elektrického pole byla rána z 18,4 % zacelena. Keratinocyty v případě reference i elektrického pole zmenšili plochu rány o významnou část již po osmi hodinách, ale u aplikace elektrického pole byla migrace rychlejší, poměr plochy rány za použití elektrického pole by menší o 12,5 %. U kmenových buněk byl proces v osmi hodinách srovnatelný, ale na konci bylo zjištěno, že v případě elektrického pole buňky pokryly větší část rány, rozdíl činil 28 %. Při psaní práce jsem nenašla literaturu s takovýmto testem na kmenových buňkách, tudíž by tento výsledek mohl přispět k již zaznamenaným znalostem. Experimenty tedy ukázaly, že elektrické pole příznivě ovlivňuje migraci použitých buněčných linií. Elektrická stimulace by mohla v budoucnu pomoci v oblasti hojení ran, jelikož migrace buněk je významným faktorem v tomto procesu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABRAHAM, J. P.; PLOURDE, B. D.; VALLEZ L. J.; NELSON-CHEESEMAN, B. B.; STARK, J. R.; SPARROW, E. M. a GORMAN, J. M. Skin Burns. *Theory and Applications of Heat Transfer in Humans* [online]. 2018, 2, s. 723–739. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/9781119127420.ch33>. [cit. 2023-12-12].
- AGRAWAL, P.; SONI, S.; MITTAL, G. a BHATNAGAR, A. Role of Polymeric Biomaterials as Wound Healing Agents. Online. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2014, roč. 13, č. 3, s. 180-190. ISSN 1534-7346. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1534734614544523>. [cit. 2023-12-13].
- ALHARBI, Z.; PIATKOWSKI, A.; DEMBINSKI, R.; RECKORT, S.; GRIEB, G. et al. Treatment of burns in the first 24 hours: simple and practical guide by answering 10 questions in a step-by-step form. Online. *World Journal of Emergency Surgery*. 2012, roč. 7, č. 1. ISSN 1749-7922. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1749-7922-7-13>. [cit. 2024-03-25].
- ANDERSON, K. a HAMM, R. L. Factors That Impair Wound Healing. Online. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*. 2012, roč. 4, č. 4, s. 84-91. ISSN 22135103. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jccw.2014.03.001>. [cit. 2024-04-06].
- ARAMWIT, P. Introduction to biomaterials for wound healing. Online. In: *Wound Healing Biomaterials*. Elsevier, 2016, s. 3-38. ISBN 9781782424567. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-456-7.00001-5>. [cit. 2023-12-13].
- BOETTCHER-HABERZETH, S. a SCHIESTL, C. Management of Avulsion Injuries. Online. *European Journal of Pediatric Surgery*. 2013, roč. 23, č. 05, s. 359-364. ISSN 0939-7248. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/s-0033-1353493>. [cit. 2024-04-02].
- BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNUNG, J.; MARKHAM, A. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. Online. *The Journal*

- of cell biology*. 1988, roč. 106, č. 3, s. 761-771. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>. [cit. 2024-04-30].
- BROUWER, I. a MAISTRY, S. Blunt Force Trauma. Online. In: *Encyclopedia of Forensic Sciences, Third Edition*. Elsevier, 2023, s. 365-389. ISBN 9780128236789. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823677-2.00051-9>. [cit. 2023-12-12].
- CARPENTER, A. E.; JONES, T. R.; LAMPRECHT, M. R.; CLARKE, C.; KANG, I. et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. Online. *Genome Biology*. 2006, roč. 7, č. 10. ISSN 14656906. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>. [cit. 2024-04-29].
- ENOCH, S. a LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. Online. *Surgery (Oxford)*. 2008, roč. 26, č. 2, s. 31-37. ISSN 02639319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2007.11.005>. [cit. 2023-12-13].
- FARBER, P. L.; ISOLDI, F. C. a FERREIRA, L. M. Electric Factors in Wound Healing. Online. *Advances in Wound Care*. 2021, roč. 10, č. 8, s. 461-476. ISSN 2162-1918. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1114>. [cit. 2024-03-29].
- FOX, J. G.; OTTO, G. a COLBY, L. A. Selected Zoonoses. Online. In: *Laboratory Animal Medicine*. Elsevier, 2015, s. 1313-1370. ISBN 9780124095274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00028-6>. [cit. 2023-12-12].
- GONZALEZ, A. C. de O.; COSTA, T. F.; ANDRADE, Z. de A. a MEDRADO, A. R. A. P. Wound healing – A literature review. Online. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2016, roč. 91, č. 5, s. 614-620. ISSN 0365-0596. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>. [cit. 2023-12-13].
- GUO, S. a DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. Online. *Journal of Dental Research*. 2010, roč. 89, č. 3, s. 219-229. ISSN 0022-0345. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>. [cit. 2023-12-13].

- HULKOWER, K. I. a HERBER, R. L. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. Online. *Pharmaceutics*. 2011, roč. 3, č. 1, s. 107-124. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3010107>. [cit. 2024-04-07].
- CHANDA, A.; ADHIKARI, J.; GHOSH, A.; CHOWDHURY, S. R.; THOMAS, S. et al. Electrospun chitosan/polycaprolactone-hyaluronic acid bilayered scaffold for potential wound healing applications. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, roč. 116, s. 774-785. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.099>. [cit. 2024-04-02].
- CHATTOPADHYAY, S. a RAINES, R. T. Collagen-based biomaterials for wound healing. Online. *Biopolymers*. 2014, roč. 101, č. 8, s. 821-833. ISSN 0006-3525. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bip.22486>. [cit. 2023-12-13].
- CHO, Y.; SON, M.; JEONG, H.; SHIN, J. H. a WANG, Y. L. Electric field induced migration and intercellular stress alignment in a collective epithelial monolayer. Online. *Molecular Biology of the Cell*. 2018, roč. 29, č. 19, s. 2292-2302. ISSN 1059-1524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-01-0077>. [cit. 2024-03-31].
- ILLOUZ, Y. G. Study of subcutaneous fat. Online. *Aesthetic Plastic Surgery*. 1990, roč. 14, č. 1, s. 165-177. ISSN 0364-216X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF01578345>. [cit. 2023-12-10].
- ISLAM, S.; BHUIYAN, M. A. R. a ISLAM, M. N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. Online. *Journal of Polymers and the Environment*. 2017, roč. 25, č. 3, s. 854-866. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>. [cit. 2024-04-02].
- JANES, S. M.; LOWELL, S. a HUTTER, C. Epidermal stem cells. Online. *The Journal of Pathology*. 2002, roč. 197, č. 4, s. 479-491. ISSN 0022-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/path.1156>. [cit. 2023-11-17].
- JIA, N.; YANG, J.; LIU, J. a ZHANG, J. Electric Field: A Key Signal in Wound Healing. Online. *Chinese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*.

- 2021, roč. 3, č. 2, s. 95-102. ISSN 20966911. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S2096-6911\(21\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S2096-6911(21)00090-X). [cit. 2024-02-11].
- KAI, H.; YAMAUCHI, T.; OGAWA, Y.; TSUBOTA, A.; MAGOME, T. et al. Accelerated Wound Healing on Skin by Electrical Stimulation with a Bioelectric Plaster. Online. *Advanced Healthcare Materials*. 2017, roč. 6, č. 22. ISSN 2192-2640. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adhm.201700465>. [cit. 2024-03-30].
- KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A. a GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin. Online. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. 2011, roč. 3, č. 4, s. 203-213. ISSN 1945-760X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>. [cit. 2023-11-17].
- KRAMER, N.; WALZL, A.; UNGER, C.; ROSNER, M.; KRUPITZA, G. et al. In vitro cell migration and invasion assays. Online. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2013, roč. 752, č. 1, s. 10-24. ISSN 13835742. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.08.001>. [cit. 2024-04-05].
- LU, C.; KOLBENSCHLAG, J.; NÜSSLER, A. K.; EHNERT, S.; MCCAIG, C. D. et al. Direct Current Electrical Fields Improve Experimental Wound Healing by Activation of Cytokine Secretion and Erk1/2 Pathway Stimulation. Online. *Life*. 2021, roč. 11, č. 11. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life11111195>. [cit. 2024-04-30].
- MCKNIGHT, G.; SHAH, J. a HARGEST, R. Physiology of the skin. Online. *Surgery (Oxford)*. 2022, roč. 40, č. 1, s. 8-12. ISSN 02639319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.11.005>. [cit. 2023-11-17].
- MENON, G. K.; CLEARY, G. W. a LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, roč. 435, č. 1, s. 3-9. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>. [cit. 2023-12-11].
- MIR, M.; ALI, M. N.; BARAKULLAH, A.; GULZAR, A.; ARSHAD, M. et al. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. Online. *Progress in Biomaterials*. 2018, roč. 7, č. 1, s. 1-21. ISSN 2194-

0509. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40204-018-0083-4>. [cit. 2024-04-02].
- MOHAMED, S. A. a HARGEST, R. Surgical anatomy of the skin. Online. *Surgery (Oxford)*. 2022, roč. 40, č. 1, s. 1-7. ISSN 02639319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.11.021>. [cit. 2023-11-17].
- MONSUUR, H. N.; BOINK, M. A.; WEIJERS, E. M.; ROFFEL, S.; BREETVELD, M. et al. Methods to study differences in cell mobility during skin wound healing in vitro. Online. *Journal of Biomechanics*. 2016, roč. 49, č. 8, s. 1381-1387. ISSN 00219290. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.01.040>. [cit. 2024-04-05].
- NAGY, A.; ROSSANT, J.; NAGY, R.; ABRAMOW-NEWERLY, W. a RODER, J. C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993, roč. 90, č. 18, s. 8424-8428. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8424>. [cit. 2024-04-30].
- PARK, H. H.; JO, S.; HOON SEO, C.; JEONG, J. H.; YOO, Y. E. et al. An indirect electric field-induced control in directional migration of rat mesenchymal stem cells. Online. *Applied Physics Letters*. 2014, roč. 105, č. 24. ISSN 0003-6951. Dostupné z: <https://doi.org/10.1063/1.4904801>. [cit. 2024-04-30].
- PERCIVAL, N. J. Classification of Wounds and their Management. Online. *Surgery (Oxford)*. 2002, roč. 20, č. 5, s. 114-117. ISSN 02639319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1383/surg.20.5.114.14626>. [cit. 2023-12-12].
- POWELL, J. Skin physiology. Online. *Women's Health Medicine*. 2006, roč. 3, č. 3, s. 130-133. ISSN 17441870. Dostupné z: <https://doi.org/10.1383/wohm.2006.3.3.130>. [cit. 2023-11-17].
- RIBEIRO, M. P.; ESPIGA, A.; SILVA, D.; BAPTISTA, P.; HENRIQUES, J. et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. Online. *Wound Repair and Regeneration*. 2009, roč. 17, č. 6, s. 817-824. ISSN 1067-1927. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00538.x>. [cit. 2024-04-02].

- SARABAHI, S. a TIWARI, V. K. *Principles and Practice Of Wound Care* [online]. B.m.: JP Medical Ltd, 2012, s. 42-49. ISBN 978-93-5025-864-4
Dostupné z: https://booksgooglecom.translate.google/books?id=W7SoCO5Zm7cC&printsec=frontcover&source=gbs_atb&_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=cs&_x_tr_hl=cs&_x_tr_pto=sc#v=onepage&q&f=false. [cit. 2023-12-12].
- STECMILLER, J. K. Understanding the Role of Nutrition and Wound Healing. Online. *Nutrition in Clinical Practice*. 2010, roč. 25, č. 1, s. 61-68. ISSN 0884-5336. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0884533609358997>. [cit. 2024-04-08].
- TAI, G.; TAI, M. a ZHAO, M. Electrically stimulated cell migration and its contribution to wound healing. Online. *Burns & Trauma*. 2018, roč. 6. ISSN 2321-3876. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s41038-018-0123-2>. [cit. 2024-03-05].
- TRINH, X. T.; LONG, N. V.; VAN ANH, L. T.; NGA, P. T.; GIANG, N. N. et al. A Comprehensive Review of Natural Compounds for Wound Healing: Targeting Bioactivity Perspective. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 17. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23179573>. [cit. 2024-04-02].
- VENUS, M.; WATERMAN, J. a MCNAB, I. Basic physiology of the skin. Online. *Surgery (Oxford)*. 2010, roč. 28, č. 10, s. 469-472. ISSN 02639319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2010.07.011>. [cit. 2023-11-17].
- WALTER, M. N. M.; WRIGHT, K. T.; FULLER, H. R.; MACNEIL, S. a JOHNSON, W. E. B. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. Online. *Experimental Cell Research*. 2010, roč. 316, č. 7, s. 1271-1281. ISSN 00144827. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.026>. [cit. 2024-04-06].
- WANG, L.; ZHONG, Y.; WU, Q.; WANG, Y.; TANG, R. et al. Spermidine-functionalized biomaterials to modulate implant-induced immune response and enhance wound healing. Online. *Chemical Engineering Journal*. 2023,

- roč. 476. ISSN 13858947. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146416>. [cit. 2024-04-02].
- WANG, S. L.; LI, X. W.; XU, W.; YU, Q. Y. a FANG, S. M. Advances of regenerated and functionalized silk biomaterials and application in skin wound healing. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024, roč. 254. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128024>. [cit. 2024-02-03].
- WOODLEY, D. T. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis. Online. *Dermatologic Clinics*. 2017, roč. 35, č. 1, s. 95-100. ISSN 07338635. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.det.2016.07.004>. [cit. 2024-04-02].
- YOUSEF, H.; ALHAJJ, M. a SHARMA S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *PubMed* [online]. 2022. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/> [cit. 2023-12-11].
- YU, R.; ZHANG, H. a GUO, B. Conductive Biomaterials as Bioactive Wound Dressing for Wound Healing and Skin Tissue Engineering. Online. *Nano-Micro Letters*. 2022, roč. 14, č. 1. ISSN 2311-6706. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40820-021-00751-y>. [cit. 2024-04-02].
- ZHAO, M. Electrical fields in wound healing—An overriding signal that directs cell migration. Online. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2009, roč. 20, č. 6, s. 674-682. ISSN 10849521. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.12.009>. [cit. 2024-03-31].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle médium
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
MEM NEAA	MEM roztok neesenciálních aminokyselin 100X
PBS	ROTI® Cell fyziologický roztok s fosfátovým pufrem
LIF	faktor inhibující leukémii
NIH/3T3	buněčná linie myších embryonálních fibroblastů
HaCaT	buněčná linie lidských epidermálních keratinocytů
ES-R1	buněčná linie myších embryonálních kmenových buněk

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Epidermis (Yousef <i>et al</i> , 2022)	12
Obrázek 2 Hematom (Brouwer a Maistry 2023)	12
Obrázek 3 Rána po kousnutí psem (Fox <i>et al</i> , 2015).....	12
Obrázek 4 Popálenina třetího stupně (Alharbi <i>et al</i> , 2012)	12
Obrázek 5 Fáze hojení ran (Trinh <i>et al</i> , 2022).....	21
Obrázek 6 Bioelektrická náplast (Kai <i>et al</i> , 2017).....	28
Obrázek 7 Testování bioelektrické náplasti v porovnání s hydrogelem (B) a přirozeným hojením (A) (Kai <i>et al</i> , 2017; upraveno)	28
Obrázek 8 Boydenova komorová zkouška (Hulkower a Herbe, 2011)	29
Obrázek 9 Test s vyloučenou buněčnou zónou (Hulkower a Herbe, 2011)	30
Obrázek 10 Crop. Vlevo před úpravou, vpravo po	36
Obrázek 11 ColorToGray. Vlevo před úpravou, vpravo po	36
Obrázek 12 ImageMath. Vlevo před úpravou, vpravo po	37
Obrázek 13 EnhanceOrSuppressFeatures. Vlevo před úpravou, vpravo po.....	37
Obrázek 14 Smooth. Vlevo před úpravou, vpravo po	38
Obrázek 15 Identifikace plochy	38
Obrázek 16 Mikrofotografie ze scratch testů fibroblastů v časech 0, 8 a 24 hodin. Zvětšení 40×.	39
Obrázek 17 Grafická závislost poměru plochy rány na době trvání testu u fibroblastů	40
Obrázek 18 Mikrofotografie ze scratch testů keratinocytů v časech 0, 8 a 24 hodin. Zvětšení 40×.	41
Obrázek 19 Grafická závislost poměru plochy rány na době trvání testu u keratinocytů ...	42
Obrázek 20 Mikrofotografie ze scratch testů kmenových buněk v časech 0, 8 a 24 hodin. Zvětšení 40×.	43
Obrázek 21 Grafická závislost poměru plochy rány na době trvání testu u kmenových buněk.....	44