



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**



Laboratory of Biomimetic
Engineering

Ústav Chemického Inženýrství
Laboratoř Biomimetického Inženýrství

Funkční Vzorek:

Model náplasti pro laboratorní testování antibakteriálních účinků

Autoři:

Ing. Viola Tokárová, Ph.D.

Ing. Ondřej Kašpar, Ph.D.

Ing. Petra Jánská

Ing. Matěj Novák

Číslo a název podpůrného projektu:

TJ01000313 - Vývoj biomimetických částic pro antibakteriální aplikace

Odpovědný pracovník:

Ing. Viola Tokárová, Ph.D.

Popis a využití funkčního vzorku

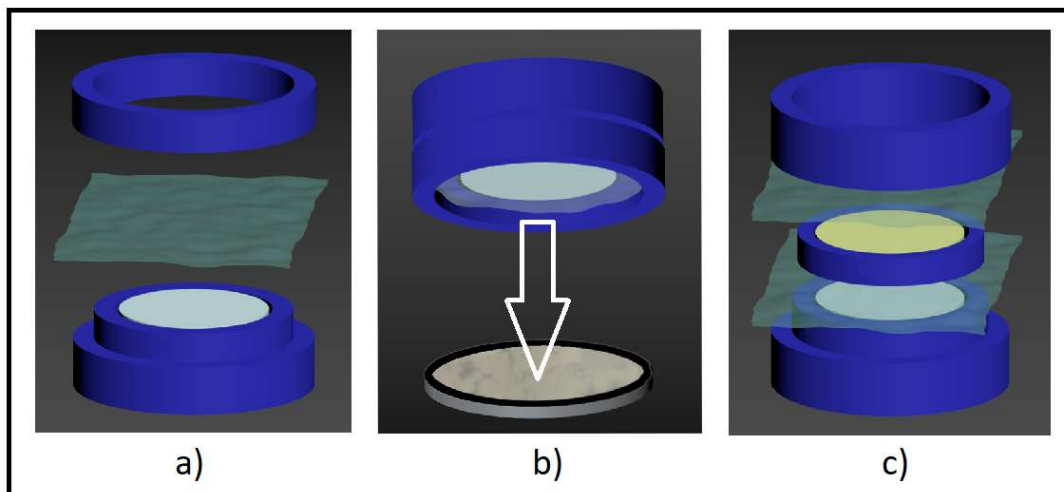
Látka alicin, produkovaná enzymatickou reakcí dvou složek (substrát alliin a enzym allináza) vyskytujících se v buňkách česneku, vykazuje výrazné antimikrobiální účinky dokonce i v případě kontaktu s bakteriemi s antibiotikální resistencí (např. rezistentní forma zlatého stafylokokku MRSA). Kvůli její nízké životnosti je ovšem nutné, aby k reakci obou složek došlo až poblíž infikovaného místa, je tedy potřeba složky izolovat, předejít jejich předčasné reakci a ve vhodné formě je k infikovanému místu dopravit. Předložený funkční vzorek představuje systém, který obě složky uzavírá do dvou typů tzv. biomimetických částicích (každá obsahuje pouze jednu ze složek), čímž napodobuje česnekovou buňku a její architekturu. Směs obou typů částic je poté umístěna do formy, umožňující aktivaci reakce po přiložení k infikovanému místu a difúzi vznikajícího alicinu skrze membránu ke zdroji infekce. Využití funkční vzorek nalézá především v oblasti léčby kožních onemocnění bakteriálního či plísňového původu.

Technické řešení

Pro potřebu ověření účinnosti představeného systému je vyrobena modelová náplast. Nejprve je technologií 3D tisku vytvořena forma, schopná pojmout biomimetické částice v suchém stavu a ohraničit je fixovanou dialyzační membránou (Obr. 1a).

Virtuální 3D nákresy formy, použité jako vzor pro 3D tisk (tiskárna Prusa i3 MK3) jsou po optimalizaci navrženy tak, že její vnější průměr je 16 mm a výška rezervoáru pro směs částic 2 mm. Tloušťka fixačního prstence i stěny rezervoáru byla navržena tak, aby odpovídala dvojnásobku šířky tiskové trysky, (2 x 0,4 mm) s nastaveným přesahem 5 %. Tím došlo k vytvoření nepropustné vrstvy bez dutin. Výška prstence byla 3 mm. Rozlišení tisku (výška jednotlivých vrstev) bylo pro větší reprodukovatelnost nastaveno na 200 µm. Pro tisk formy byly otestovány dva konvenčně prodávané biokompatibilní tiskové materiály, kyselina mléčná (PLA) a polyethylentereftalát s přídavkem glykolu (PET-G). Následné testy ukázaly, že výběr materiálu neměl na účinnost systému zásadní vliv.

Takto vzniklou modelovou náplast je poté možné přiložit ke zdroji infekce (Obr. 1b) a pomocí vlhkosti (v případě kůže např. potu) dojde k aktivaci reakce a následné difúzi vzniklého alicinu. Představený systém svým mechanismem imituje případný finální výrobek, tedy náplast pro dlouhodobé působení přímo na infikované oblasti kůže. Pro konečnou aplikaci tedy stačí směs částic umístit do aktivní vrstvy běžné kožní náplasti, mezi adhezivní a krycí vrstvou. V případě, kdy je kvůli charakteru onemocnění potřeba dávku alicinu rozložit do delšího časového úseku, je možné použít dvoukompartimentovou variantu formy s oddělenými typy částic (Obr. 1c).



Obr. 1: a) Jednokompartmentový prototyp náplasti, skládající se z vytištěné formy (modrá), směsi obou typů biomimetických částic (bílá) a dialyzační membrány, upevněné fixačním kroužkem; b) Prototyp je přiložen k místu účinku, v tomto případě k vrstvě agarů, obsahujícího bakterie; c) Pro dosažení dlouhodobějšího účinku je možno použít dvoukompartmentovou variantu náplasti, obsahující dvě oddělené složky či směsi (bílá a žlutá), při aktivaci systému např. vlhkostí nastává nejprve difúze složek, jejich vzájemná reakce je tedy zpomalena.

Ověření účinnosti

Antibakteriální účinek představeného systému (ve formě modelové náplasti) byl analyzován za pomoci agarového média v Petriho misce, obsahujícího gram negativní bakteriální kmen *Escherichia coli* (K12). Nejprve byla pro kontrolu ověřena účinnost okamžité přítomnosti alicinu, vzniklého smícháním alliinů a allinázy v kapalně formě. Poté byla obdobně analyzována účinnost v případě představeného systému, tedy enkapsulace obou složek do biomimetických částic. Pro vyhodnocení antibakteriálního účinku alicinu, produkovaného v modelové náplasti, byla zvolena metoda inhibičních zón.

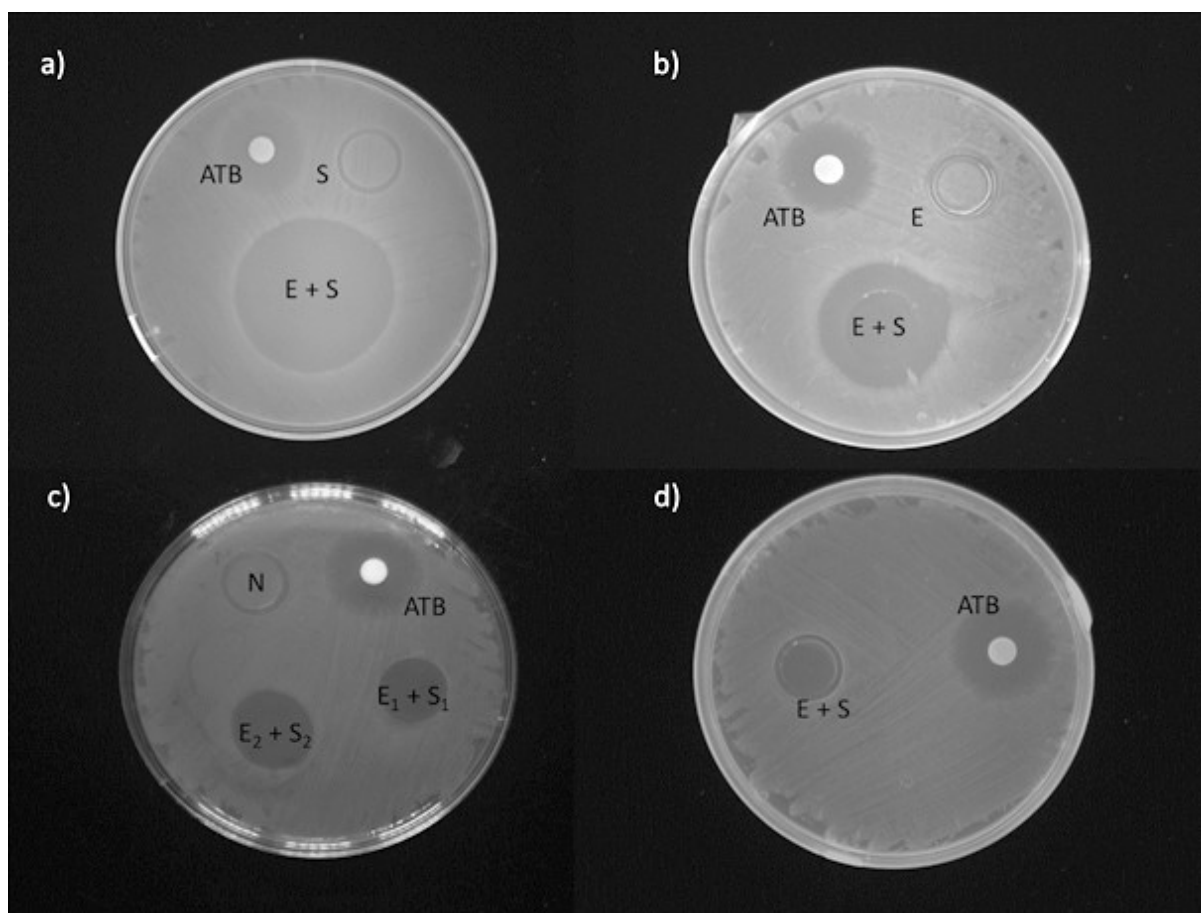
Sterilizovaný živný agar byl umístěn do Petriho misek, kde zgeloval za pokojové teploty do pevné formy. Bakteriální kultura byla přenesena na povrch sterilní agarové desky (100 μ l, OD 0,1) a poté byla na povrch agarů umístěna modelová náplast s danou koncentrací alliinů a allinázy o celkovém objemu 100 μ l. Petriho misky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí inkubační doby byly inkubované misky studovány z hlediska velikosti tzv. inhibičních zón (obsahujících nyní již zneškodněné bakterie), vytvořených okolo a pod vzorkem. Jako negativní kontrola bylo zvoleno antibiotikum kanamycin (50 mg/ml, 10 μ l). Pro pozitivní kontrolu byl zvolen samotný prototyp náplasti, prototyp náplasti s alliinem a dále pouze s allinázou. Průměrná šířka zóny inhibice (ZOI) byla vypočítaná podle vzorce:

$$ZOI = \frac{W}{D} \cdot 100 (\%),$$

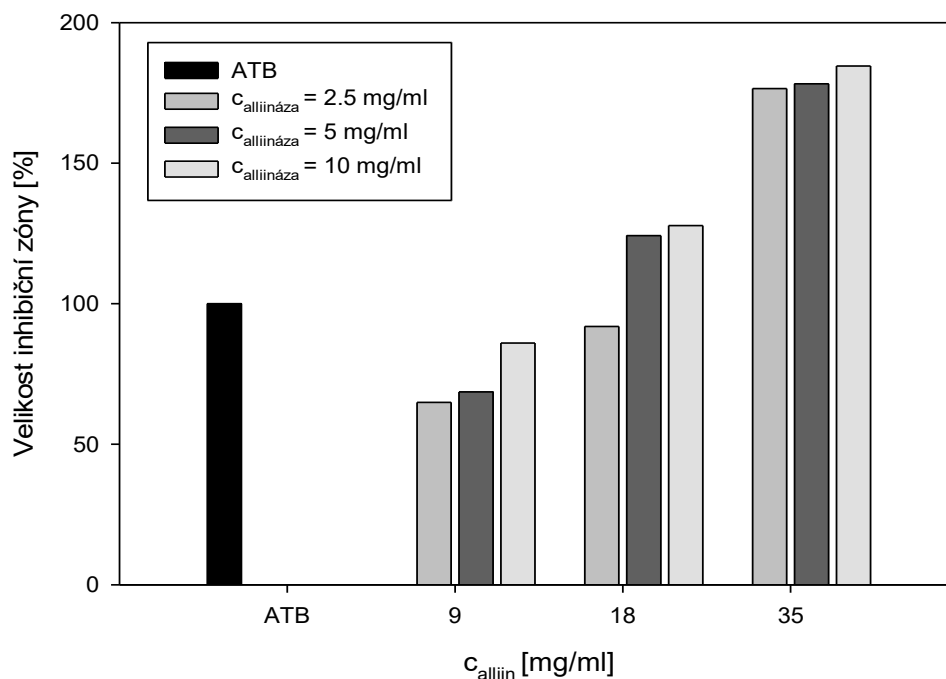
kde W je průměr šířky inhibiční zóny okolo prototypu náplasti, D je průměr šířky inhibiční zóny kontrolního antibiotika. Tyto parametry jsou určeny z pořízených snímků ZOI pomocí nástrojů obrazové analýzy.

V dalším experimentu byly použity připravené částice s enkapsulovaným alliinem (16 w/w %) a částice s enkapsulovanou allinázou (2 w/w %). Byl sledován antibakteriální účinek alicinu na kmenu *E. Coli*. Na agarové plotny byly nanесeny bakterie a následně inkubovány v inkubátoru po dobu 20 min. Dále byly naváženy částice o celkové hmotnosti 30 mg. Cěla s částicemi byla vložena na bakterie a inkubovaná při 37 °C po dobu 24 hodin. Vliv produkovaného alicinu na bakteriím *E. Coli* byl vyhodnocen podle výše uvedeného postupu.

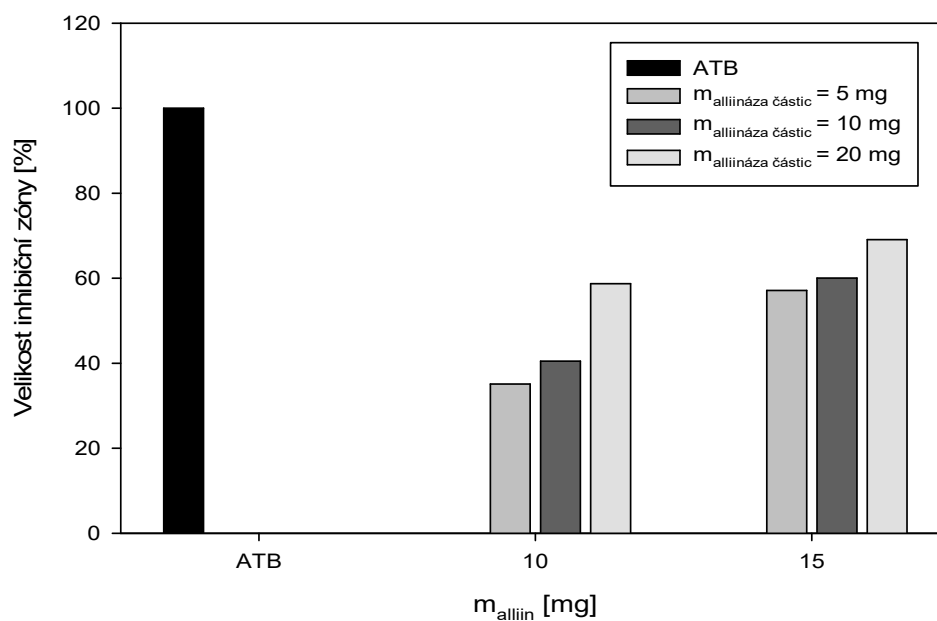
Data prokázala, že produkovaný alicin má silný účinek na bakterie *E. Coli*. Z Obr. 2 je vidět, že citlivost bakterií se postupně zvyšuje se zvyšující se koncentrací alliinu, stejně tak i allinázy. To ukazuje, že velikost inhibičních zón závisí nejen na celkovém teoretickém množství vyloučeného alicinu, ale i na rychlosti jeho tvorby.



Obr. 2 Inhibiční zóny produkovaného alicinu, ATB reprezentuje antibiotikum (kanamycin, 50 mg/ml, 10 μ l), S - reprezentuje substrát (alliin, 200 mM), E - enzym (allináza, 10 mg/ml), E + S je různá koncentrace allinázy a N - samotný vzorek náplasti; a, b, c) substrát a enzym jsou přítomné v **kapalně** formě; d) substrát a enzym v **enkapsulované** formě.



Obr. 3 Velikost inhibičních zón v závislosti na koncentraci alliinu a allinázy v **kapalném** stavu.



Obr. 4 Velikost inhibičních zón v závislosti na koncentraci **enkapsulovaného** alliinu a aliinázy.

Poděkování

Financováno z účelové podpory projektu TAČR Zéta (TJ01000313) „Vývoj biomimetických částic pro antibakteriální aplikace“.