

FAKULTA MECHATRONIKY,
INFORMATIKY A MEZIOBOROVÝCH
STUDIÍ TUL

Nanomateriály pro dopravu a řízené uvolňování léčiv v gynekologických aplikacích

TEZE DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor	Ing. Mgr. Karolína Morávková
Školitel:	doc. RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.
Konzultant:	Ing. Miroslava Rysová, Ph.D.
Studijní program:	P0588D130006 – Environmentální inženýrství

Liberec 2026

Abstrakt

Vývoj moderních léčivých forem určených pro aplikaci do vaginálního prostředí vyžaduje materiály, které jsou nejen biokompatibilní, ale také schopné cíleně uvolňovat léčivo a podporovat přirozenou mikrobiální rovnováhu. Nanovláknenné struktury představují perspektivní platformu, která díky své vysoké specifické ploše a možnosti řízené modifikace nabízí široké uplatnění v lokální terapii.

Tato práce se zaměřuje na přípravu nanovláken určených pro aplikaci ve vaginálním prostředí, jejich morfologické hodnocení a komplexní analýzu jejich chování *in vitro* modelu simulovaného vaginálního prostředí. Nanovláknenné matrice tvořené kyselinou polymléčnou (PLA), polykaprolaktonem (PCL) a chitosanem v různých poměrech byly charakterizovány pomocí SEM obrazové analýzy, dále hodnoceny při kontaktu s buněčnou linií vaginálních keratinocytů VK2/E6E7 a testovány z hlediska jejich vlivu na tři klíčové druhy laktobacilů – *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* a *Lactobacillus gasseri*.

Směsná nanovláknena PCL/PLA, jejichž vhodnost pro vaginální aplikaci byla již dříve ověřena, byla následně využita jako základní matrice pro přípravu nanovláknenných vrstev s inkorporovaným konvenčním antimykotikem klotrimazolem ve třech zvolených koncentracích. Jejich potenciál pro léčbu vulvovaginální kandidózy byl posouzen prostřednictvím testů biokompatibility s vaginálními epiteliálními buňkami a hodnocením antimykotické aktivity proti oportunisticky patogenní kvasince *Candida albicans*. Použité experimentální metody zahrnovaly diskovou difuzní metodu a analýzu vlivu na růstovou křivku kvasinek.

Získané výsledky potvrzují vhodnost PLA/PCL nanovláknenných vrstev jako nosičů léčiv určených pro aplikaci do vaginální oblasti. Nanovláknena s inkorporovaným klotrimazolem vykazují výrazné antimykotické účinky a zároveň si zachovávají dobrou biokompatibilitu i při koncentracích účinných proti *Candida albicans*.

Seznam použitých zkratk

ATCC – American Type Culture Collection (sbírka buněčných kmenů)

CCM – Česká sbírka mikroorganismů

CLO – klotrimazol

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute (standardy laboratorní praxe)

CST – Community State Types (typy vaginální mikrobiální komunity)

FBS – Fetal Bovine Serum (fetální bovinní sérum)

FITC – Fluorescein Isothiocyanate (fluorescenční barvivo)

MFC – Minimum Fungicidal Concentration (nejnižší fungicidní koncentrace)

MIC – Minimum Inhibitory Concentration (nejnižší inhibiční koncentrace)

MRSB – de Man, Rogosa and Sharpe Broth (bujón pro laktobacily)

MTT - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (čínidlo pro testování viability buněk)

NFs – Nanofibers (nanovlákná)

OD600 – Optická denzita při 600 nm

PCL – polykaprolakton

PLA – kyselina polyléčná

RPMI – Roswell Park Memorial Institute Medium (kultivační médium)

SD – Standard Deviation (Směrodatná odchylka)

SEM – Rastrovací elektronová mikroskopie

VK2/E6E7 – vaginální epitelální buněčná linie

YNB – Yeast Nitrogen Base (kvasinkové médium)

Obsah

Seznam použitých zkratk	3
Úvod	5
1. Stav současného poznání	6
1.1 <i>Specifika vaginálního prostředí</i>	6
1.2 <i>Doprava léčiv do vaginální oblasti</i>	9
1.3 <i>Polymery pro nanovláknenné vrstvy</i>	10
2. Cíle disertační práce a dosud použité metody	13
2.1 <i>Příprava nanovláknenných vrstev a jejich morfologické hodnocení</i>	13
2.2 <i>Kultivace laktobacilů a testování kompatibility nanovláken s vaginální mikrobiální populací</i>	14
2.3 <i>Biokompatibilita nanovláknenných vrstev s vaginálními keratinocyty</i>	14
2.4 <i>Výběr antimykotických složek pro výrobu nanovláknenných vrstev</i>	15
2.5 <i>Antimykotický účinek nanovláken</i>	16
3. Výsledky	19
3.1 <i>Směsné nanovláknenné vrstvy PLA a PCL</i>	19
3.2 <i>Směsná nanovláknena s inkorporovaným klotrimazolem</i>	23
4. Závěr a další směřování	31
Seznam použité literatury	33
Seznam vlastních publikací vztahujících se k předkládané práci	36

Úvod

Vývoj systémů pro řízené uvolňování léčiv představuje dynamicky se rozvíjející oblast propojující materiálové inženýrství, chemii polymerů, biologii i medicínské vědy. Jejím cílem je překonat omezení tradičních lékových forem, zvýšit terapeutickou účinnost a minimalizovat nežádoucí účinky prostřednictvím pokročilých nosičů léčiv. Významnou roli zde hrají polymerní materiály, zejména nanovláknenné struktury, které díky vysokému měrnému povrchu, schopnosti efektivně vázat a uvolňovat léčiva a širokým možnostem funkcionalizace umožňují návrh adaptabilních lékových forem.

Přestože technologický pokrok v oblasti polymerních nosičů rychle pokračuje, zůstává řada výzev spojených s optimalizací transportu léčiv, jejich stabilitou, kinetikou uvolňování a interakcemi s biologickým prostředím. Tyto aspekty jsou zásadní zejména u systémů určených pro lokální aplikaci, kde je cílem dosáhnout vysoké koncentrace léčiva přímo v místě patologického procesu při současném snížení systémové zátěže. Nanovláknenné materiály se v tomto kontextu jeví jako mimořádně perspektivní platforma, neboť umožňují přesné řízení uvolňování bioaktivních látek a cílenou modifikaci fyzikálně-chemických vlastností podle požadavků konkrétní aplikace.

V posledních letech se do popředí zájmu dostává také vaginální cesta podání, která kromě léčby lokálních obtíží nabízí i možnost systémové terapie, zejména v oblasti hormonální léčby. Její výhodou je obcházení prvního průchodu játry i kyselý hydrolyzy v žaludku, což je významné zejména u léčiv na bázi peptidů a proteinů. Vývoj nových systémů pro vaginální aplikaci však vyžaduje in vitro testování v podmínkách realisticky napodobujících vaginální prostředí – jeho mikrobiální složení, epitel, kyselý pH i přítomnost cervikovaginální tekutiny. Jen tak lze spolehlivě předpovědět chování materiálu v organismu a hodnotit jeho účinnost například proti patogenům typu *Candida albicans*.

1. Stav současného poznání

1.1 Specifika vaginálního prostředí

Vaginální prostředí je komplexní systém, jehož anatomické, fyziologické a mikrobiologické charakteristiky zásadně ovlivňují chování léčiv i jejich nosičů. Vývoj materiálů pro cílenou dopravu a řízené uvolňování léčiv proto vyžaduje detailní porozumění faktorům, které určují absorpci a účinnost vaginálně podaných přípravků.

Na straně léčiva hrají roli zejména jeho chemická struktura, molekulová hmotnost, lipofilita, ionizační stav či rozpustnost ve vaginální tekutině. Z fyziologických faktorů jsou významné cyklické změny permeability epitelu, věk, sexuální aktivita, enzymatická aktivita omezující prostup peptidů a proteinů a také množství, složení a pH vaginální tekutiny. Ta je přirozeně kyselá, s hodnotami pH obvykle v rozmezí 3,8–5, udržovanými metabolickou aktivitou lokálních probiotických bakterií (Carr et al., 1998).

Tyto aspekty společně vytvářejí specifické prostředí, které je nutné zohlednit při návrhu účinných vaginálních lékových forem. Následující části kapitoly se proto věnují jednotlivým složkám vaginálního mikroprostředí – epitelu, mikrobiomu, vaginální tekutině a patogenům.

1.1.1. Vaginální epiteliální tkáň

Vaginální epitel představuje klíčovou součást lokální bariéry a zároveň primární místo interakce léčiv s vaginálním prostředím. Jedná se o mnohvrstevný nerohovatějcí dlaždicový epitel, jehož struktura, tloušťka a funkční vlastnosti se dynamicky mění v závislosti na hormonálním stavu organismu (García et al. 2018). Tyto cyklické změny ovlivňují jak permeabilitu epitelu, tak jeho schopnost poskytovat ochranu před patogeny a fyzikálně-chemickými vlivy. Estrogeny proliferaci epitelu zvyšují, stejně jako obsah glykogenu, zatímco postmenopauzální období vede k jeho ztenčení a snížení ochranné funkce.

Z hlediska transportu léčiv je vaginální epitel charakteristický relativně nízkou enzymatickou aktivitou, což jej činí vhodným místem pro podávání látek citlivých na degradaci v gastrointestinálním traktu, zejména peptidů a proteinů (Hussain a Ahsan 2005). Propustnost epitelu je dále ovlivněna organizací buněčných vrstev, přítomností těsných spojů, množstvím cervikovaginálního hlenu a lokálním pH. Tyto faktory společně určují, do jaké míry je léčivo schopné pronikat do hlubších vrstev tkáně nebo působit lokálně na povrchu epitelu. Studie ukazují, že epitel umožňuje průnik i makromolekul nad 10 kDa, zejména při použití vhodných nosičů nebo enhancerů propustnosti (Machado a Cerca 2015).

Významnou roli hraje také interakce epitelu s vaginálním mikrobiomem, zejména s laktobacily, které prostřednictvím produkce kyseliny mléčné udržují fyziologicky kyselé pH (Carr et al. 1998). Tato acidita podporuje integritu epitelu a současně ovlivňuje stabilitu a rozpustnost některých léčiv. Narušení epitelu či mikrobiální rovnováhy může vést ke změně jeho permeability a tím i k odlišné farmakokinetice podaných látek (Brotman 2011).

Z těchto důvodů je detailní znalost struktury a funkce vaginálního epitelu zásadní pro racionální návrh moderních nosičů léčiv. Materiály určené pro vaginální aplikaci musí být navrženy tak, aby respektovaly specifika této tkáně, umožňovaly adekvátní retenci, kontrolované uvolňování léčiva a současně nenarušovaly fyziologické vlastnosti epitelu ani jeho mikrobiální ekosystém. Nové systémy pro dopravu léčiv, jako jsou nanovlákná, hydrogely a polymerní filmy umožňují prodloužené uvolňování, ochranu léčiva před předčasnou degradací a mohou zajišťovat cílené působení proti patogenům (Sanchez Armengol et al. 2025).

1.1.2. Vaginální mikrobiom

Odhaduje se, že přibližně 9 % z celkové lidské mikrobiální komenzální populace sídlí v urogenitálním traktu člověka (Sirota et al. 2014). Vaginální mikrobiom je přitom velice komplexní. Jeho složení se mění nejen u jednotlivých etnik (Ravel et al. 2011), ale je proměnlivé i na individuální úrovni (Gilbert et al. 2019). Faktory ovlivňující složení vaginálního mikrobiomu jsou například fáze menstruačního cyklu, těhotenství, sexuální aktivita a hygienické návyky jedince (Gajer et al. 2012). Dominantním typem vaginálních bakterií jsou u většiny žen reprodukčního věku za fyziologického stavu bakterie rodu *Lactobacillus* (Hyman et al. 2005). Jedná se o grampozitivní bakterie především tyčinkovitého tvaru, anaerobního či mikroaerobního metabolismu. Na povrchu slizničního epitelu vytváří laktobacily kompaktní biofilm, který představuje významnou ochrannou bariéru proti patogenním mikroorganismům (Martinez et al. 2020). Metabolismus těchto bakterií je založen na anaerobní fermentaci sacharidů. Ty se na slizničních epitelech vyskytují především ve formě glykogenu, ze kterého jsou odštěpovány jednotlivé molekuly glukózy lidskou α -amylázou (Spear et al. 2014). Glukózu poté metabolickým procesem fermentace využívají laktobacily, za produkce hlavního odpadního produktu - kyseliny mléčné. Tato opticky aktivní molekula je hlavní příčinou kyselého prostředí vagíny. Většina kmenů *Lactobacillus* má acidobazické metabolické optimum velice nízko a prosperuje v nízkých hodnotách pH, které jsou udržovány právě produkcí kyseliny mléčné – projevuje se zde tedy silný zpětnovazebný systém (Matoulková a Kubizniaková 2015). U zdravých žen reprodukčního věku se hodnoty pH pohybují okolo 3,8-4,5, stabilizují mikrobiom podporou dominance laktobacilů a vytvářejí prostředí nepříznivé pro většinu patogenů.

Vaginální mikrobiom žen reprodukčního věku lze podle klasifikace Ravel et al. (2011) rozdělit do pěti hlavních Community State Types (CST), které se liší dominantními bakteriálními druhy, metabolickou aktivitou i schopností udržovat kyselé pH. Typy CST I, II, III a V jsou charakterizovány převahou jednotlivých druhů rodu *Lactobacillus*: CST I dominuje *Lactobacillus crispatus*, CST II *L. gasseri*, CST III *L. iners* a CST V *L. jensenii*. Zatímco *L. crispatus*, *L. gasseri* a *L. jensenii* jsou spojovány se stabilním, protektivním mikrobiálním prostředím s vysokou produkcí kyseliny mléčné a nízkým pH, *L. iners* představuje výjimku. Tento druh je považován za nestabilní a méně protektivní, protože produkuje jeden izomer kyseliny mléčné, postrádá řadu genů spojených s antimikrobiální aktivitou a často se vyskytuje ve stavech přechodu mezi zdravým a dysbiotickým mikrobiomem (Petrova et al. 2017). Jeho dominance je proto spojována s vyšší náchylností k bakteriální vaginóze a recidivujícím infekcím. Naproti tomu CST IV je charakterizován nízkým zastoupením laktobacilů a převahou anaerobních bakterií, jako jsou *Gardnerella*, *Atopobium* či *Prevotella*, což je stav spojený s vyšším pH a zvýšeným rizikem infekcí (Miller et al. 2016). Tato klasifikace poskytuje důležitý rámec pro pochopení variability vaginálního prostředí a jeho relevance pro testování biomateriálů a vaginálních léčiv.

1.1.3. Vaginální tekutina

Vaginální tekutina představuje komplexní biologickou směs, jejíž objem, složení a fyzikálně-chemické vlastnosti se dynamicky mění v průběhu menstruačního cyklu. Je tvořena kombinací cervikálního hlenu, transudátu přes vaginální epitel, sekretů žláz vulvy a exfoliovaných epiteliálních buněk. Objem vaginální tekutiny se běžně pohybuje v rozmezí několika set mikrolitrů až jednotek mililitrů, přičemž významně narůstá během ovulace a sexuální stimulace (Mitchell et al. 2011). Tekutina je přirozeně kyselá, s pH typicky mezi 4,0–4,5, což je dáno metabolickou aktivitou laktobacilů produkujících kyselinu mléčnou. Složení zahrnuje vodu, elektrolyty, proteiny, imunoglobuliny, antimikrobiální peptidy a enzymy, které přispívají k lokální imunitě a ochraně epitelu. Enzymatická aktivita zahrnuje zejména proteolytické a glykolytické enzymy, které ovlivňují viskozitu a interakci s léčivý (Valore et al. 2002). Pro výzkum vaginálních lékových forem se využívají simulované vaginální tekutiny, jejichž složení je navrženo tak, aby napodobovalo fyziologické parametry vaginální tekutiny, zejména pH, iontovou sílu a obsah organických složek. Jejich význam pro testování uvolňování léčiv a rozpouštění vaginálních formulací zdůrazňuje práce Tietz a Klein (2018), která popisuje biorelevantní simulované genitální tekutiny a jejich využití při *in vitro* hodnocení vaginálních lékových forem.

1.1.4. Vaginální patogeny

Vaginální prostředí představuje dynamický ekosystém, jehož stabilita je zásadně ovlivněna rovnováhou mezi komensální mikrobiotou a potenciálními patogeny. Zatímco zdravý mikrobiom

dominovaný laktobacily vytváří kyselé a antimikrobiálně aktivní prostředí, narušení této rovnováhy může umožnit kolonizaci a přemnožení mikroorganismů schopných vyvolat infekci. Mezi nejčastější vaginální patogeny patří bakterie spojené s bakteriální vaginózou, kvasinky rodu *Candida*, protozoa jako *Trichomonas vaginalis* a řada virových agens přenášených pohlavním stykem. Tyto organismy se liší svými biologickými vlastnostmi, mechanismy patogenity i interakcemi s vaginálním epitelem a imunitním systémem.

Candida albicans

Kvasinka *Candida albicans* představuje běžného oportunistického patogena přítomného na kůži, v ústní dutině i jako součást střevního či vaginálního mikrobiomu (Kuramae et al. 2006). Je to polymorfní kvasinka schopná přecházet mezi třemi morfologickými formami – kvasinkovou (blastospor), přechodovou pseudohyfální a hyfální (Talapko et al. 2021). Přejít mezi morfotypy představuje klíčový faktor její adaptability a patogenity - morfologická plasticita umožňuje této kvasince reagovat na změny prostředí a přispívá k jejímu invazivnímu potenciálu, tvorbě biofilmu a úniku před imunitní odpovědí hostitele. V *in vitro* podmínkách je přechod do virulentní hyfální formy řízen především teplotou a dostupností nutrientů. *C. albicans* je běžným komenzálem lidského vaginálního mikrobiomu, kde spolu mikroorganismy soutěží o zdroje živin a přístup k epitelialním buňkám. Mykotické vaginální onemocnění, tzv. kandidózy se rozvíjí při dysbalanci systému a nejsou tedy řazeny mezi sexuálně přenosné choroby. Terapie vulvovaginální kandidózy je založena především na azolových antimykotikách, jako je systémově podávaný flukonazol, lokální klotrimazol či mikonazol. Problémem se nicméně stává rychle narůstající incidence antimykotická rezistence (Vitiello et al. 2023).

Z hlediska vývoje vaginálních lékových forem představuje *C. albicans* zásadní modelový organismus, protože její schopnost tvořit biofilm, měnit morfologii a interagovat s epitelem významně ovlivňuje chování aplikovaných materiálů, jejich retenci, uvolňování léčiv i účinnost. Proto je zahrnutí *C. albicans* do *in vitro* testování systémů pro dopravu vaginálních léčiv nezbytné pro realistické hodnocení jejich antifungální aktivity a interakcí v komplexním vaginálním mikroprostředí.

1.2 Doprava léčiv do vaginální oblasti

Vaginální administrační cesta se používá především k podávání léků s lokální funkcí, jako jsou antimykotika (Alexander et al. 2004), antimikrobiální látky (Palmeira-de-Oliveira et al. 2015) spermicidy (Jalalvandi et al. 2020) nebo lokálně podávané hormonální léky (Erel a Ozcivit Erkan 2025). V posledních letech se velká pozornost věnuje také možnosti *in situ* terapie při imunoprofylaxi sexuálního přenosu HIV (Zhernov et al. 2024).

Léčivé látky je nutné aplikovat vhodnou, pro ženskou vagínu uzpůsobenou lékovou formou, jak kapalného, polotuhého nebo tuhého charakteru (Kováčik a Vraníková 2021). Mezi kapalné patří roztoky, gely, emulze či suspenze, k polotuhým hydrokrémy, a k tuhým kuličky, globule a inserty/kroužky.

Vaginální kandidóza se nejčastěji léčí lokálními lékovými formami, jako jsou vaginální čípky, tablety, krémy či gely, které umožňují rychlé dosažení vysoké koncentrace antimykotika přímo v místě infekce. Léčivem první volby u akutního onemocnění je klotrimazol. U těžších nebo opakujících se infekcí se používá také jednorázově perorální flukonazol. Moderní bioadhezivní systémy, například filmy, hydrogely či nanovláknenné matrice, nabízejí delší retenci a řízené uvolňování léčiva, což je činí perspektivními pro další vývoj. Nanovláknena s antimykotiky jako povrch menstruačních tamponů by mohla poskytovat novou možnost léčby chronických kandidóz.

1.2.1. Klotrimazol

Klotrimazol je široce používané imidazolové antimykotikum, jehož účinnost vychází z jeho specifické chemické struktury i farmakokinetických vlastností. Molekula klotrimazolu (1-[(2-chlorfenyl)-difenylmethyl]-1*H*-imidazol) je tvořena imidazolovým jádrem navázaným na lipofilní aromatické skupiny, což jí umožňuje snadnou integraci do lipidových membrán hub (Spampinato a Leonardi 2013). Tento strukturální motiv je klíčový pro jeho mechanismus účinku, který spočívá v inhibici enzymu lanosterol-14 α -demethylázy, nezbytného pro syntézu ergosterolu; jeho nedostatek vede k destabilizaci buněčné membrány *C. albicans* a následné buněčné smrti (Da Silva et al. 2024). Po lokální aplikaci se klotrimazol vstřebává pouze minimálně, a pokud k absorpci dojde, je metabolizován především v játrech oxidativními a dealkylačními procesy na farmakologicky neaktivní metabolity (Mendling et al. 2020). V léčbě vulvovaginální kandidózy patří klotrimazol k lékům první volby díky vysoké lokální účinnosti, nízké toxicitě a širokému spektru účinku. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro *C. albicans* se běžně pohybuje v rozmezí 0,03–1 $\mu\text{g/ml}$, přičemž většina klinických kmenů vykazuje citlivost v nižší části tohoto spektra (Frej-Mądrzak et al. 2021). Tyto vlastnosti činí z klotrimazolu stabilní a spolehlivý terapeutický prostředek, který zůstává relevantní i v době rostoucí rezistence vůči jiným azolovým antimykotikům (Pais et al. 2016).

1.3 Polymery pro nanovláknenné vrstvy

Polymerní nanovláknena představují klíčovou platformu pro moderní systémy řízeného uvolňování léčiv, přičemž využívají širokou škálu syntetických i přírodních polymerů. K často studovaným materiálům patří polyvinylalkohol (PVA), který je díky své vodorozpustnosti a biokompatibilitě využíván pro rychlé uvolňování léčiv (Sill & von Recum, 2008), polyvinylpyrrolidon umožňující

stabilizaci léčiv v amorfní formě (Moghe & Gupta, 2008), polyuretan vhodný pro elastické a dlouhodobé uvolňovací systémy (Li et al., 2002) či biodegradabilní kopolymer PLGA, který umožňuje přesné řízení degradační kinetiky (Jain, 2000). Mezi přírodní polymery se řadí želatina, kyselina hyaluronová a alginát, které poskytují bioadhezivitu a dobrou kompatibilitu se slizničními tkáněmi (Huang et al., 2003). Mezi nejvýznamnější a nejčastěji využívané polymery však patří kyselina polymléčná (PLA), polykaprolakton (PCL) a chitosan, které díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě a možnostem chemické modifikace tvoří základ mnoha nanovláknenných systémů určených pro lokální i systémovou terapii (Bhattarai et al., 2010). Následující kapitoly se proto podrobněji věnují právě těmto třem polymerům a jejich specifickým vlastnostem v kontextu nanovláken pro dopravu léčiv. Nanovláknena na bázi chitosanu vykazují díky své bioadhezivitě, antimikrobiálním vlastnostem a biokompatibilitě značný potenciál pro lokální aplikace (Ibrahim et al., 2023).

1.3.1. Kyselina polymléčná (PLA)

Polymléčná kyselina (PLA) patří mezi nejrozšířenější polymery používané pro nanovláknenné systémy řízeného uvolňování léčiv díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě a možnosti ladění degradační rychlosti. PLA nanovláknena umožňují inkorporaci širokého spektra léčivých látek a poskytují kontrolované, postupné uvolňování, které lze ovlivnit molekulovou hmotností, krystalinitou či přidávkem kopolymerů. Díky své stabilitě a mechanickým vlastnostem se PLA nanovláknenné nosiče uplatňují v lokální terapii, hojení ran, tkáňovém inženýrství i implantabilních systémech, kde umožňují dlouhodobé působení léčiva bez nutnosti opakované aplikace (Sill a Von Recum 2008).

Polymery kyseliny mléčné (PLA) se v organismu rozkládají na monomery – kyselinu mléčnou, nebo na oxid uhličitý a vodu. Kyselina mléčná je jednoduchá molekula s jedním chirálním centrem, vykytuje se tedy ve dvou enantiomerech, tedy L- a D-mléčná kyselina. Stejná molekula představuje odpadní produkt laktobacilů, který jim zpětnovazebně pomáhá udržovat příznivé prostředí pro růst a zabráňovat patogenům. Biodegradace polymerního materiálu z kyseliny polymléčné by tedy mohla představovat cestu k okyselení vnitřního vaginálního prostředí, a tím přispívat terapii bez konvenčního léčiva. V kombinaci s jinými polymerními materiály, jako například chitosanem, který poskytuje hydrofilní, a přitom biokompatibilní a biodegradabilní složku by mohl nanovláknenný materiál představovat slibný potenciální nosič léčiva do vaginálního prostředí, poskytující v kombinaci s léčivem zároveň terapeutickou i podpůrnou léčbu. Z tohoto důvodu byla kyselina polymléčná vybrána pro tuto práci.

1.3.2. Polykaprolakton

Polykaprolakton (PCL) je široce využívaný polymer pro tvorbu nanovláknenných systémů určených k dopravě léčiv díky své vysoké biokompatibilitě, pomalé biodegradaci a výborné zvláknitelnosti. Jeho dlouhá degradační doba umožňuje dlouhodobé, stabilní uvolňování léčiv, což z něj činí vhodný materiál pro implantabilní nosiče, tkáňové inženýrství i lokální terapii (Sill a Von Recum 2008). PCL nanovláknena dokáží nést jak hydrofobní, tak hydrofilní léčiva a jejich uvolňovací profil lze dále modifikovat přidáním kopolymerů nebo povrchovými úpravami. Významné přehledové studie potvrzují, že PCL je jedním z nejvíce studovaných polymerů pro drug delivery díky své mechanické stabilitě, nízké cytotoxicitě a univerzálním možnostem formulace (Dash a Konkimalla 2012).

1.3.3. Chitosan

Chitosan je přírodní polysacharid vznikající deacetylací chitinu, tvořený převážně jednotkami D-glukosaminu, díky čemuž nese pozitivní náboj a vykazuje výraznou bioadhezivitu a antimikrobiální aktivitu. Tyto vlastnosti z něj činí mimořádně atraktivní polymer pro nanovláknenné systémy určené k dopravě léčiv, zejména pro slizniční aplikace, kde elektrostatická interakce s negativně nabitými biologickými povrchy podporuje prodlouženou retenci léčiva (Moharir et al. 2022). Chitosanová nanovláknena jsou biokompatibilní, biodegradabilní a umožňují inkorporaci širokého spektra léčiv včetně antibiotik, antitumorik, proteinů či nukleových kyselin. Jejich uvolňovací profil lze dále modifikovat stupněm deacetylace, molekulovou hmotností nebo kombinací s dalšími polymery (Bhattarai et al. 2010). Pro možnost zlepšit mukoadhezní vlastnosti nanovláken byl vybrán mezi kandidátní polymery pro tuto práci.

2. Cíle disertační práce a dosud použité metody

Cílem disertační práce je vývoj a testování nanovláknenných vrstev jako nosičů léčiv do vaginální oblasti.

- Návrh a výroba nanovláken z biodegradabilních polymerů – kyseliny polymléčné (PLA), poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) a chitosanu a jejich fyzikální charakterizace pomocí SEM a hodnocení smáčivosti.
- Testování vybraných materiálů *in vitro* v simulovaném vaginálním prostředí – jejich biokompatibilita s vaginálními epiteliálními vrstvami, biokompatibilita s kmenovými probiotickými laktobacily a stabilita v simulované vaginální tekutině.
- Výběr nanovláknenných vrstev s vhodnými vlastnostmi vůči *in vitro* simulovanému vaginálnímu prostředí a jejich použití jako základní matrice pro výrobu vrstev s inkorporovanými antimykotiky, jejich testování, především pro antimykotické účinky a ověření biokompatibility.

2.1 Příprava nanovláknenných vrstev a jejich morfologické hodnocení

Pro přípravu nanovláken byly použity biodegradabilní polyesterové polymery poly(mléčná) kyselina (PLA, Corbion, Mw 200 000) a poly- ϵ -kaprolakton (PCL, Sigma-Aldrich, Mw 80 000).

Nanovláknenné vrstvy byly připraveny z chloroformového rozpouštědlového systému pomocí bezjehlového DC elektrospinningového zařízení Nanospider™ (NS Line 1WS500U, Elmarco, výrobní šíře: 500 mm), nastaveného na produkční rychlost 15 mm/min při napětí -10/35 kV.

2.1.1. Analýza morfologie materiálů pomocí elektronové mikroskopie

Struktura a morfologie vláken v nanovláknenných vrstvách byla hodnocena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) modelu Vega 3 Tescan (model 64) při různých zvětšeních. Vzorky byly nejdříve vyříznuty na malé čtverce a přilepeny na kovové terče pomocí oboustranné lepicí pásky. Vzorky byly poté pokryty vrstvou Pt případně Au/Pt 80:20 (2 nm) na naprašovacím zařízení Q150R ES PLUS (Quarum). Průměry vláken byly následně změřeny pomocí built-in softwaru pro obrazovou analýzu (VegaTCx64). Pro každý vzorek bylo změřeno minimálně 100 průměrů vláken při zvětšení 5000x. Data byla dále vyhodnocena ve formě střední hodnoty $\pm$ směrodatné odchylky (SD) a vynesena do grafu.

2.1.2. Smáčivost povrchu nanovláknenné vrstvy

Míra smáčivosti nanovláknenných vrstev byla hodnocena metodou měření kontaktního úhlu přisedlé kapky pomocí bench-top aparatury (FS TUL) skládající se z vzorkového stolku, kamery a počítače vybaveného softwarem See software 7.6. Průměrný kontaktní úhel přisedlé kapky (CA(m)) destilované vody o objemu 3 μ l byl hodnocen v triplicátu pro každý testovaný vzorek (nanovláknena s aditivou i bez nich). Dynamický vývoj kontaktního úhlu u přisedlé kapky byl po stabilizaci kapky hodnocen v desetivteřinovém intervalu po dobu až 5 minut.

2.2 Kultivace laktobacilů a testování kompatibility nanovláken s vaginální mikrobiální populací

Použité bakteriální kmeny byly *Lactobacillus jensenii* (CCM 7560), *Lactobacillus gasseri* (CCM 7009) a *Lactobacillus crispatus* (CCM 7776). Na začátku každý kmen laktobacilů prošel třemi pasážemi během exponenciální růstové fáze pro optimální metabolickou aktivitu. Všechny tři kmeny byly inkubovány v bujónu De Man, Rogosa a Sharpe (MRSB, HiMedia), doplněném o 0,1 % L-cysteinu (Merck) jako redukčního činidla při 37 °C se zvýšenou tenzí CO₂. Média byla připravena pomocí deionizované vody a sterilizována autoklárováním po dobu 15 minut při 121 °C a 1 atm. Materiály byly nařezány na kruhy o průměru 1 cm a sterilizovány UV světlem. Pro experiment byl každý vzorek ponořen do 3,9 ml bakteriální suspenze a 0,1 ml třetí pasáže bakteriálního kmene. Optická hustota při 600 nm (OD₆₀₀) byla měřena v určených intervalech (0, 2, 4, 6, 8, 12, 17, 19, 21, 24, 32 a 44 hodin) pro posouzení zákalu. Zvýšení hodnoty OD₆₀₀ odráží nárůst koncentrace bakteriálních buněk. Toto bylo zaznamenáno do grafů růstových křivek bakterií. Po 44 hodinách inkubace byly materiály jemně omyty sterilním fosfátovým pufovaným fyziologickým roztokem a fixovány 2,5% paraformaldehydem po dobu 10 minut. Poté byly materiály hodnoceny pomocí SEM na přítomnost přilnutých bakterií.

2.3 Biokompatibilita nanovláknenných vrstev s vaginálními keratinocyty

2.3.1. In vitro cytotoxicita nanovláknenných vrstev v přímém kontaktu s vaginálními keratinocyty a jejich adheze

Buněčná linie vaginálních keratinocytů VK2/E6E7 získané z ATCC (CRL-2616) byla použita pro hodnocení cytotoxicity nanovláknenných vrstev. Buněčná linie byla kultivována v bezsérovém keratinocytovém médiu (Invitrogen) suplementovaném bovinním hypofyzárním extraktem (50 μ g/ml) a epidermálním růstovým faktorem (0,1 ng/ml) při teplotě 37 °C.

Keratinocyty byly nasazeny v hustotě 20 000 buněk na jamku do 24jamkové destičky den před zahájením experimentu. Po 24 hodinách od nasazení byl do každé jamky ve třech replikách přidán testovaný materiál (UV vysterilizované disky o průměru 6 mm) spolu s čerstvým médiem a po dalších 24 hodinách byla životaschopnost buněk vyhodnocena pomocí MTT testu. Stanovení spočívá v měření metabolické aktivity buněk. Podstatou testu je redukce látky MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu) mitochondriálními enzymy za vzniku fialového formazanu. Formazan je ve fyziologickém prostředí buněk špatně rozpustný a tvoří krystaly. Ty se rozpouští přidáním acidifikovaného isopropanolu. Poté je barevná změna měřena jako hodnota absorbance (570 nm, 670nm jako odečet pozadí) a porovnány vůči buněčné kontrole. Vzorky vykazující životaschopnost přesahující 70 % buněčné kontroly jsou považovány za biokompatibilní.

2.3.2. Hodnocení morfologie vaginálních keratinocytů v přímém kontaktu s NFs

Hodnocení vnitřní morfologie vaginálních keratinocytů pomocí imunofluorescence představuje důležitý doplněk k testům buněčné cytotoxicity, protože umožňuje detailně sledovat strukturální změny, které nemusí být zachytitelné pouze metabolickými metodami. Imunofluorescenční značení cytoskeletálních proteinů (v našem případě aktinových vláken) a jaderných struktur poskytuje náhled na integritu buněk a případné známky stresové odpovědi či apoptózy při kontaktu s nanovláknem. Tato metoda tak umožňuje odhalit subcelulární poškození, které může předcházet poklesu viability, a poskytuje komplexnější obraz o biokompatibilitě materiálu a jeho možném vlivu na funkci epitelu.

Vaginální epiteliální buňky VK2/E6E7 byly kultivovány v přímém kontaktu s nanovláknennými vrstvami a kontrolou po dobu 24 hodin či přímo nasazeny pro adhezi na klotrimazolová vlákna a kontrolu. Po inkubaci byly buněčné kultury omyty fosfátovým pufrům a barveny standardním procesem imunofluorescenčního barvení (fixace paraformaldehyde 4 % 15 min; permeabilizace 0,1 % Triton X-100, 20 min; blokování 1 % FBS + 0,05 % Tween v PBS 30 min; barvení aktinových vláken, zelená – Phalloidin – FITC Alexa Fluor (488, Invitrogen) – 1 hod, ředění dle protokolu výrobce, barvení DNA – DAPI, ředění 1:1000, 10 minut). Vzorky byly poté montovány na podložní sklíčka a analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX73 vybavený fotoaparátem Olympus DP74.

2.4 Výběr antimykotických složek pro výrobu nanovláknenných vrstev

Bylo třeba vybrat vhodné antimykotikum pro zvláknění. Na základě dostupné literatury byly vybrány čtyři kandidátní látky, nejčastěji používané pro lokální či systémovou léčbu vulvovaginální kandidiázy – klotrimazol, nystatin, miconazol a flukonazol. Tato antimykotika patří do skupiny azolů a polyenů (nystatin).

Každý kmen je na dané antimykotikum citlivý v jiné koncentraci. Pro hodnocení účinnosti se používá klíčový parametr MIC – minimální inhibiční koncentrace. Tento parametr umožňuje porovnávat jednotlivé látky a sledovat rezistenci. Jeho stanovení se provádí standardizovaným mikrodilučním testem podle metodik CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), kdy se kvasinka kultivuje v přítomnosti postupně klesajících koncentrací antimykotika. Po inkubaci se hodnotí, při které koncentraci již není patrný růst a výsledek se uvádí v $\mu\text{g/ml}$. Vzhledem k rychlému vzniku antimykotické rezistence jednotlivých kmenů a tedy rozdílům mezi jednotlivými kmeny i stejného druhu byla hodnocena hodnota MIC pro kmen CCM 8320. Pro koncentraci a ředění bylo vycházeno z literatury, jak je uvedeno v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) antimykotik a *C. albicans* – literatura:

Antimykotikum	Hodnota MIC z literatury
Miconazol	0,002 $\mu\text{g/ml}$ – 0,125 $\mu\text{g/ml}$ (Haya <i>et al.</i> , 2024)
Clotrimazol	0,0009 – 40 $\mu\text{g/ml}$ (Frej-Madrzak <i>et al.</i> , 2021)
Flukonazol	0,25 – 1 $\mu\text{g/ml}$ (Maenchantrarath <i>et al.</i> , 2022)
Nystatin	0,0625 – 1 $\mu\text{g/ml}$ (Arikan <i>et al.</i> , 2002)

Hodnocení koncentrace, ve které již v jamce není růst se obvykle provádí pouze vizuálně hodnocením zákalu. Pro zpřesnění odhadu bylo použito také metabolického barvení Alamar Blue. Tento redoxní indikátor mění barvu podle úrovně metabolické aktivity – resazurin (modrý), představuje oxidovanou formu barviva. Živé organismy jej svými metabolickými procesy redukují na resorufin (růžový až žlutý). Po 24hodinové inkubaci se do každé jamky přidá resazurin v 10% objemu roztoku v dané jamce a inkubuje se 2 hodiny. Po tomto čase se hodnotí změna barvy. MIC hodnota potom odpovídá nejnižší koncentraci antimykotika, tedy poslední jamce, ve které zůstává roztok modrý.

Hodnota MIC představuje koncentraci inhibiční, nikoli fungicidní, tedy smrtící. Po dosažení MIC se mikroorganismy přestávají množit. Hodnotou, která může poskytnout další informaci o efektu antimykotika je MFC – Minimum Fungicidal Concentration, tedy nejnižší koncentrace usmrcující $\geq 99,9$ % populace původního testovaného kmene. Tento test se provádí přeočkováním na pevné médium bez přítomnosti antimykotika a stanovením koncentrace, při které k růstu nedochází.

2.5 Antimykotický účinek nanovláken

2.5.1. Kultivace kvasinky *Candida albicans* a testování morfologického růstu

Laboratorní kultivace CA vyžaduje speciální tekuté médium (bujón) a speciální pevné růstové médium (agarové plotny). Pro přípravu kultivačního inokula byla nakoupena kultura z České sbírky

mikroorganismů, kód CCM 8320/ATCC 24433, používaný jako referenční kmen pro testování antifungálního efektu pomocí metody postupného ředění (broth dilution metoda). Jako tekuté médium bylo pro kvasinkový růst bujón YNB – Yeast Nitrogen Base a pro hyfální růst médium RPMI 1640. Jako pevné růstové médium byl zvolen Sabouraudův agar. Kultivační teplota ovlivňuje morfolotyp stejně jako dostupnost nutrientů - 30 °C pro testování růstu kvasinkového typu a 37 °C pro testování růstu hyfálního typu. Při dlouhodobé kultivaci za podmínek vhodných pro hyfální růst se tvoří biofilm. Kolonie *C. albicans* jsou na agaru typicky krémově zbarvené s hladkým okrajem, drožděvitého zápachu.

Morfologie kvasinkových buněk byla zhodnocena pomocí elektronové mikroskopie po 24hodinovém růstu na PCL/PLA vláknech bez navázaného antimykotika v prostředí vhodném pro daný morfolotyp. Nanovláknenné disky byly po kultivaci jemně opláchnuty od volných kvasinek, fixovány ve 4% glutaraldehydu (4 % v/v, 30 minut), a poté dehydratovány ve stoupající koncentraci etanolu (25 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %), každý 10 minut. Poté byly vzorky vysušeny na vzduchu v pokojové teplotě po 3 hodiny. Vzorky byly dále připraveny pro SEM mikroskopii a snímány na přístroji Tescan Vega 3.

2.5.2. Evaluace antimykotického účinku pomocí diskové difúzní metody

Hodnocení antimykotického účinku nanovláknenných materiálů představuje klíčový krok při ověřování jejich potenciálu pro aplikace v lokální terapii vulvovaginální infekce. Toto hodnocení bylo na kompozitních nanovlákněch PCL/PLA s navázaným klotrimazolem provedeno pomocí diskové difúzní metody, která umožňuje kvantifikovat inhibiční zónu růstu kvasinkového modelu. Pro testování antimykotické aktivity materiálů *in vitro* byla na Sabouraudův agar (4% glukóza, Roth) naočkována 1 ml suspenze kvasinek *C. albicans* o zákalu 0,5 McFarland. Na povrch agaru byly ve trojicích umístěny nanovláknenné disky o průměru 10 mm a kultivovány po dobu 24 hodin při 30 °C. Experiment byl prováděn v triplicátech. Po uplynutí expoziční doby byla změřena a fotograficky zdokumentována velikost difúzní zóny inhibující růst kvasinek v okolí jednotlivých vzorků.

2.5.3. Evaluace antimykotického účinku pomocí hodnocení růstové křivky *C. albicans* v 24h eluátu vláken

Vyjma diskové difúzní metody byla posouzena dynamika účinku uvolněného léčiva prostřednictvím sledování růstové křivky kvasinky v 24hodinovém eluátu, což poskytuje detailnější informaci o účinnosti uvolňování klotrimazolu z nanovláknenné matrice do tekutého média, imitujícího vnitřní vaginální prostředí. Tato kombinace metod umožňuje komplexní zhodnocení antifungální aktivity připravených vláken a jejich potenciálu pro další biomedicínské využití. Sterilní materiály byly

inkubovány v médiu YNB; do 2 ml YNB byl vložen disk nanovláknenného materiálu o průměru 10 mm a inkubován po dobu 24 hodin při 37 °C za účelem přípravy eluátu jednotlivých vzorků. Suspenze kvasinek *C. albicans* s turbiditou 0,5 McFarland byla následně smíchána v poměru 1:1 s každým eluátem v jamkách 96jamkové mikrotitrační destičky, ve třech technických replikátech, a inkubována při mírné agitaci při 30°C. Růst kvasinek byl hodnocen měřením optické hustoty při 550 nm (OD_{550}) v hodinových intervalech po dobu 24 hodin, přičemž pro každou jamku byly provedeny tři měřicí cykly.

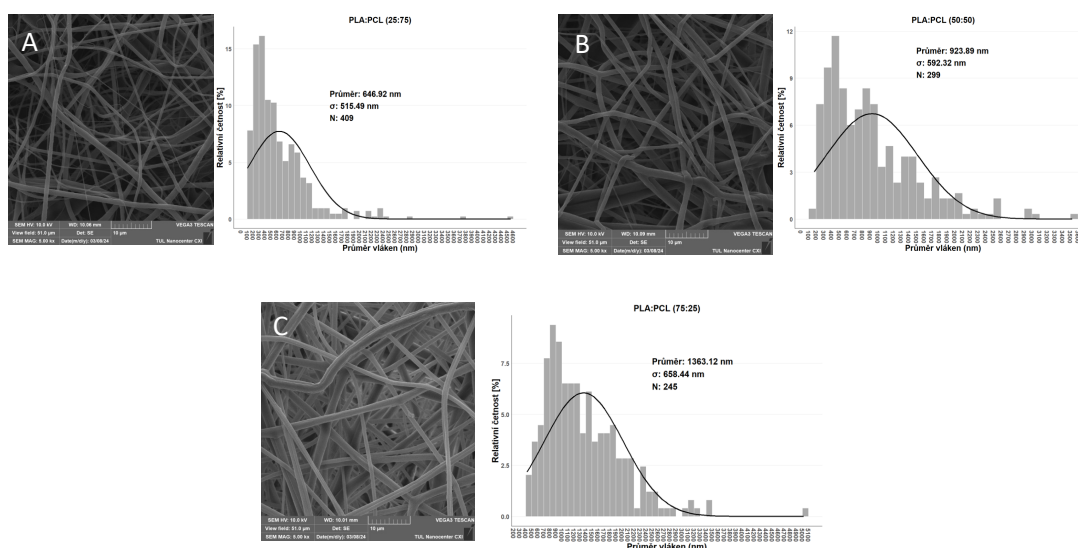
3. Výsledky

3.1 Směsné nanovláknenné vrstvy PLA a PCL

Kyselina polymléčná (PLA) představuje ideální materiál pro vaginální aplikace. Její biodegradace v kyselém prostředí přirozeně vede k tvorbě kyseliny mléčné, která je běžnou součástí vaginálního mikrobiomu a přispívá k udržení podmínek podporujících růst laktobacilů. PLA tak představuje vhodný základní polymer pro proces zvláknění. Pro zlepšení mechanických vlastností a zajištění potřebné elasticity byl do směsi zařazen polykaprolakton (PCL), který se vyznačuje velmi dobrými zvláknovacími vlastnostmi. Kombinace PLA a PCL umožňuje vytvářet homogenní, stabilní a morfologicky vyrovnané vláknenné struktury. Oba polymery jsou navíc netoxické, biokompatibilní a běžně používané v medicínských aplikacích, což jejich využití dále podporuje.

3.1.1. Příprava nanovláknenných vrstev a jejich morfologické hodnocení

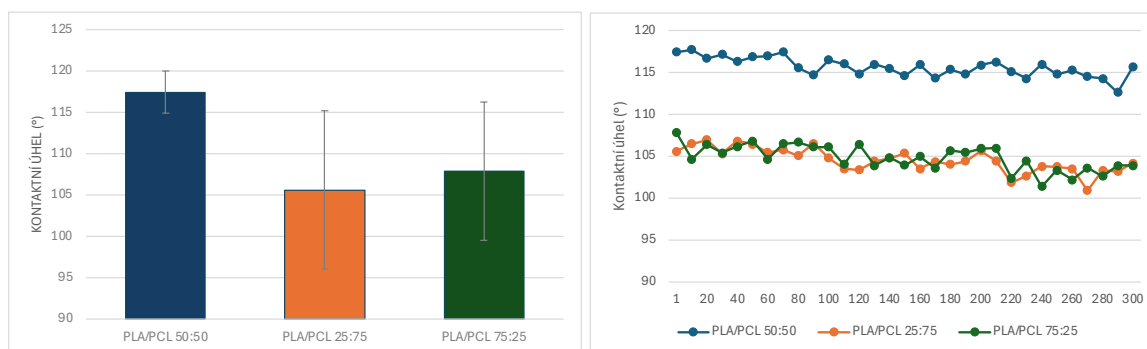
Směsná nanovláknna PLA/PCL byla připravena z chloroformového rozpouštědlového systému ve třech různých poměrech polymerů – 50:50, 75:25 a 25:50. S rostoucím obsahem PLA se zvyšoval střední průměr vláken z $646,92 \pm 515,49$ nm u 25% podílu PLA až po $1363,12 \pm 658,44$ nm u 75% podílu PLA ve vláknech a došlo tedy k vývoji morfologie od submikronových vláken a k mikrovláknenné struktuře. Vývoj distribuce průměrů vláken v jednotlivých vzorcích byl vizualizován prostřednictvím histogramu relativních četností (viz Obr. č. 1).



Obrázek č. 1 - Morfologie nanovláknenných vrstev na snímcích SEM, histogramy relativní četnosti distribuce průměrů. A – PLA/PCL 25:75, B – PLA/PCL 50:50, C – PLA/PCL 75:25. SEM zvětšení 5,000x (měřítko = 10 μ m)

3.1.2. Smáčivost povrchu nanovláknenných vrstev PLA/PCL

Obrázek č. 2 ukazuje smáčivost povrchu nanovláknenných vrstev PLA/PCL měřenou metodou kontaktního úhlu přisedlé kapky. Ačkoli u všech poměrů PLA/PCL byla získána nanovláknna s hydrofobním povrchem (hodnota nad 90°), rozdílný podíl jednotlivých složek měl prokazatelný vliv na míru hydrofobity povrchu. Nejvyšší hodnoty kontaktního úhlu byly zaznamenány u vzorku PLA/PCL 50/50 a to i v dynamickém testu. U tohoto materiálu činila počáteční průměrná hodnoty CA $117,44 \pm 2,5496^\circ$. V průběhu dynamického testu došlo k poklesu na $115,65 \pm 0,7788^\circ$. U materiálů s poměry 25/75 a 75/25 se hodnoty kontaktního úhlu pohybovaly mezi 105° a 110°. Všechny testované materiály byly prokazatelně hydrofobní a pouze mírným poklesem kontaktního úhlu v čas a zachovávají svůj hydrofobní charakter.

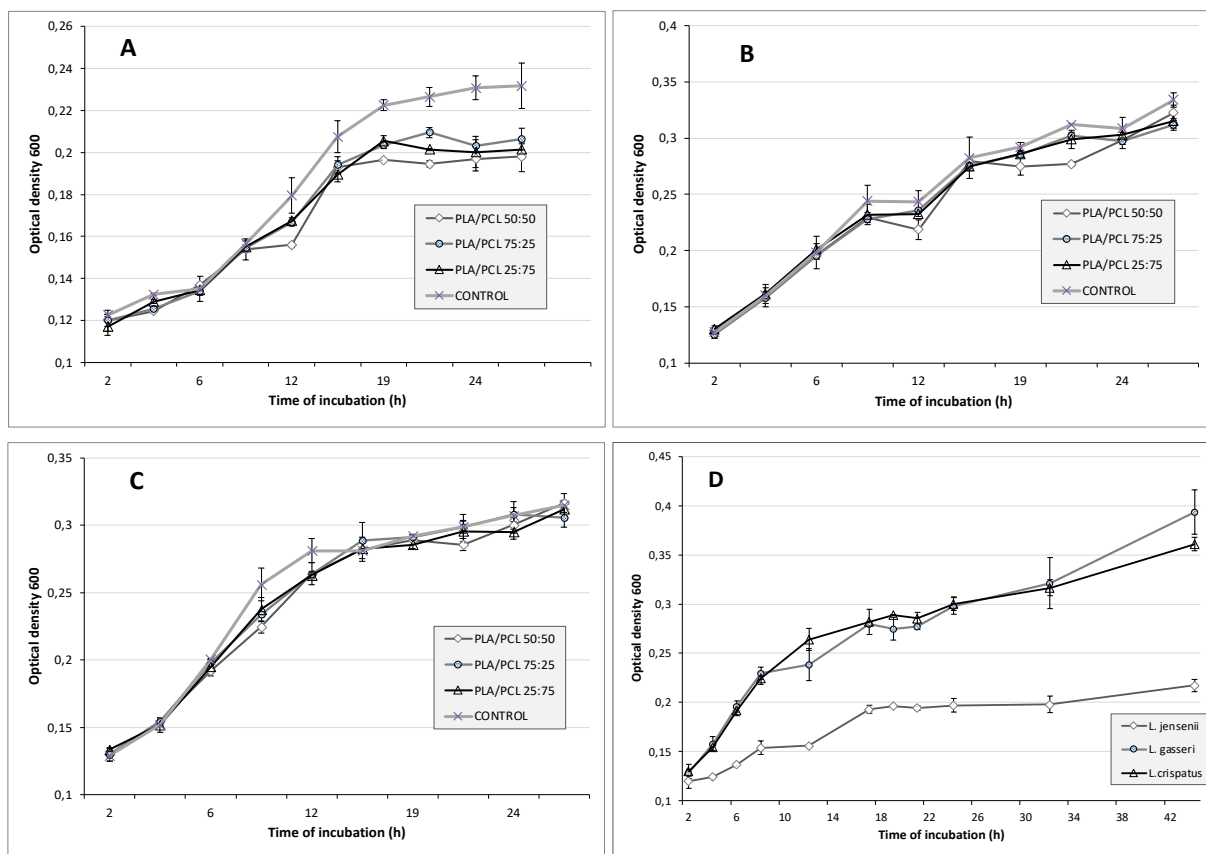


Obrázek č. 2 - Smáčivost povrchu nanovláken PLA/PCL; měřeno metodou kontaktního úhlu (CA) přisedlé kapky. Vlevo: Počáteční statický kontaktní úhel, směrodatná odchylka; Vpravo: Vývoj smáčivosti v čase, měření každý 10 s po dobu 5 min

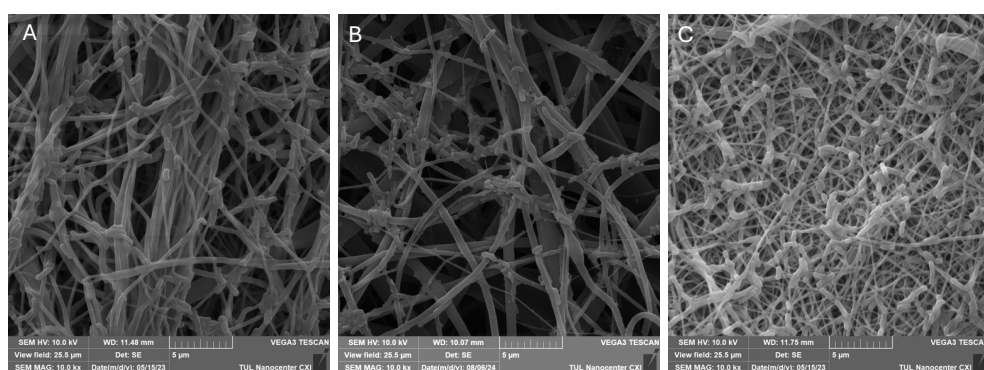
3.1.3. Kultivace laktobacilů a testování kompatibility nanovláken s vaginální mikrobiální populací

Byla hodnocena růstová křivka tří testovaných bakteriálních kmenů *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus crispatus* při inkubaci s nanomateriálovými vrstvami PLA/PCL. Z naměřených hodnot na Obrázku č. 3 je zřejmé, že inkubace s nanomateriály neovlivňuje růst komenzálních vaginálních bakterií *L. gasseri* (B) a *L. crispatus* (C). Na grafu růstu *L. jensenii* (A) je patrné ovlivnění růstu kultur v přítomnosti materiálů – bakteriální suspenze se všemi materiály kopírovala tvar růstové křivky, ale s nižšími dosaženými hodnotami vrcholu exponenciální fáze. *L. jensenii* představuje bakteriální kmen citlivý na přítomnost kyslíku, s nejnižší rychlostí růstu a nejnižší maximální vzniklou biomasou (D). Jeho citlivost na manipulaci, včetně vortexování před každým měřením optické denzity přispívalo k nižší růstové rychlosti tohoto kmene.

Všechny tři kmeny laktobacilů adherovaly na vlákna PLA/PCL po 44 hodinách. Na Obrázku č. 4 je ukázán růst *L. crispatus* na všech třech typech vláken.



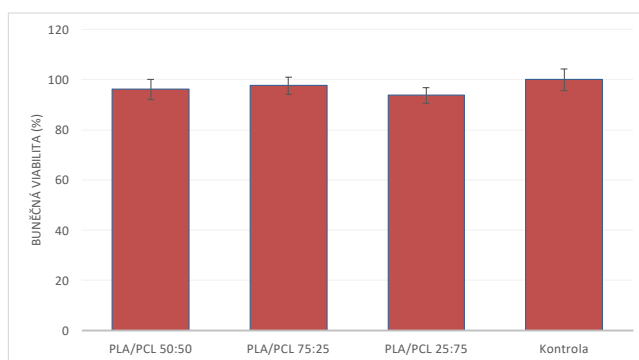
Obrázek č. 3 – Růstové křivky tří vaginálních kmenů kultivovaných s nanovláknými nanomateriály PLA/PCL, měření OD 600; 42 hod., 37 °C, zvýšená tenze CO₂, A: *L. jensenii*, B: *L. gasseri*, C: *L. crispatus*, D: porovnání jednotlivých kmenů



Obrázek č. 4 – Adheze *L. crispatus* kultivovaných 44 hodin s nanovláknými nanomateriály PLA/PCL, 37 °C, zvýšená tenze CO₂, SEM, A: PLA/PCL 50:50, B: PLA/PCL 75:25, C: PLA/PCL 25:75, (měřítko = 5 μm)

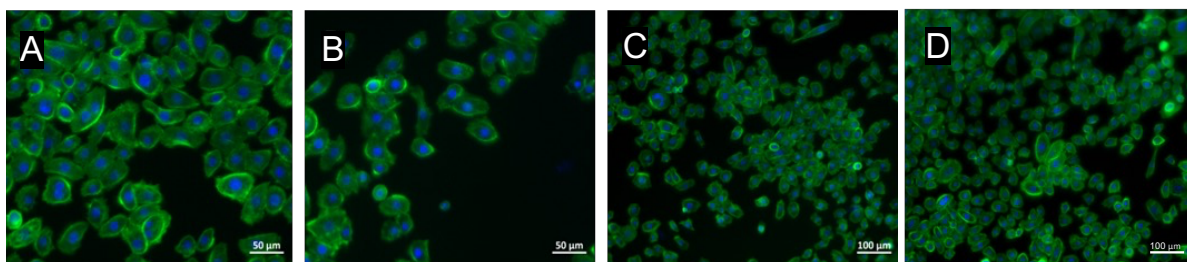
3.1.4. *In vitro* cytotoxicita nanovláknenných vrstev PLA/PCL v přímém kontaktu s vaginálními keratinocyty

Odezva buněk VK2/E6E7 byla hodnocena kombinací metabolického testu (MTT) a morfologického hodnocení po expozici. Výsledky MTT testu vaginálních keratinocytů v přímém kontaktu s nanovláknem PCL/PLA (Obr. č 5) potvrzují, že všechny materiály jsou *in vitro* biokompatibilní, tedy viabilita buněk po 24hodinové expozici je vyšší, než 70 %. Viabilita linie vaginálních keratinocytů s pohybovala mezi 93 % (vzorek PLA/PCL 25:75) a 97 % (vzorek PLA/PCL 75:25).



Obrázek č. 5 – Hodnocení cytotoxicity nanovláken PLA/PCL *in vitro* testem MTT. VK2/E6E7, 60 mm disky, 24 hod expozice, 37 °C

Na Obrázku č. 6 je imunofluorescenční barvení vaginálních keratinocytů VK2/E6E7 po expozici v přímém kontaktu s PLA/PCL nanovláknem a kontrolou po dobu 24 hodin. Ze snímků je zřejmé, že kontakt vaginálních keratinocytů s materiálem nijak neovlivňuje jejich morfologii, což odpovídá výsledkům metabolického MTT testu. Tento typ nanovláken tedy na základě tohoto testu bez ohledu na poměr polymerů představuje vhodný nosič pro vaginální aplikaci.



Obrázek č. 6 - Imunofluorescenční barvení vaginálních keratinocytů VK2/E6E7 rostoucích v přímém kontaktu s PLA/PCL vlákny. Expozice 24 hod, 37 °C, zelená barva = aktinová vlákna (Alexa Fluor 488), modrá barva = jádro (DAPI); A: PLA/PCL80, 50:50, B: PLA/PCL80 25:75, C: PLA/PCL80 75:25, D: buněčná kontrola bez materiálu

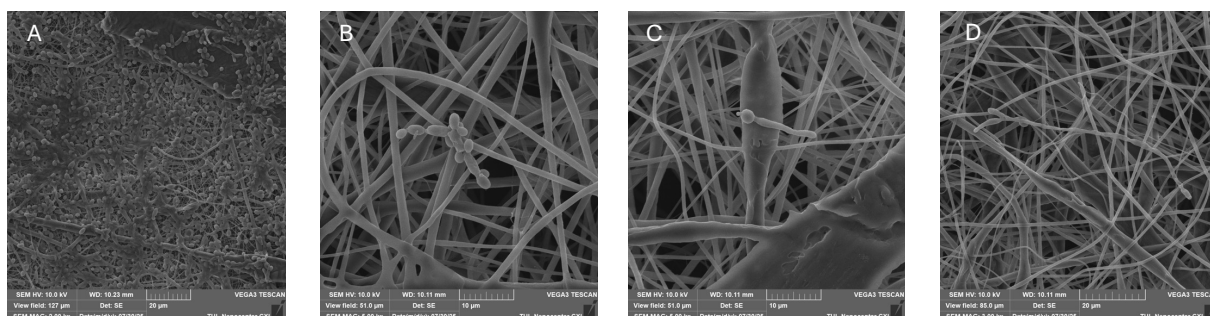
3.2 Směsná nanovláknina s inkorporovaným klotrimazolem

Na základě testování PLA/PCL vláken byl jako nosná směs pro přidavek klotrimazolu zvolen poměr polymerů PLA:PCL 25:75. Pro výběr antimykotika a jeho koncentrace ve výsledných vláknech bylo nejdříve třeba optimalizovat kultivaci kvasinky *C. albicans* a stanovit hodnoty MIC pro jednotlivá antimykotika.

3.2.1. Kultivace kvasinek

Kvasinka *Candida albicans* tvoří tři morfotypy – kvasinkovou, pseudohyální a hyální, podle kultivačních podmínek. Nanovláknina bez aditiva – PLA/PCL 50:50 byla použita pro kultivaci kvasinkové kultury a hodnocení, zda jsou na těchto vláknech schopny adherovat a proliferovat všechny morfotypy, což by naznačovalo potenciál vzniku biofilmu při použití bez aditiv.

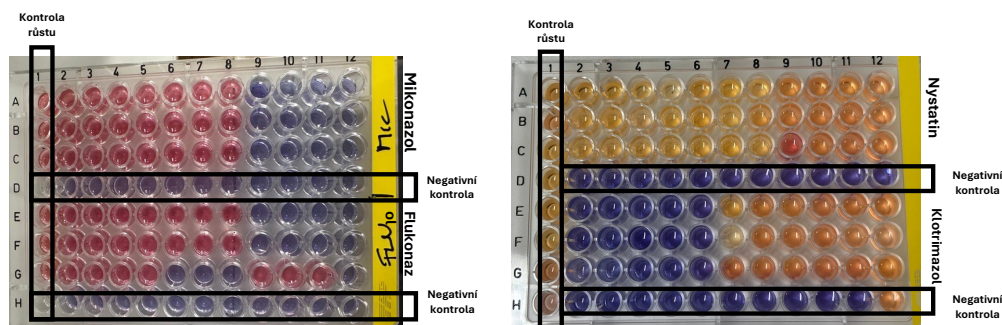
Na Obrázku. 7 jsou jednotlivé morfotypy, včetně počáteční fáze vzniku 3D struktury biofilmu s pseudohyálním a hyálním buněčným typem. Na vláknech bez klotrimazolu jsou tedy hyální a pseudohyální kvasinkové buňky schopné proliferace, i vzniku biofilmu.



Obrázek č. 7 – Snímky SEM morfologie kvasinkových buněk *C. albicans* narostlých na PCL/PLA vláknech bez antimykotika, 24 hod. A: Začínající biofilm, pseudohyální, hyální i kvasinkový typ buněk, RPMI 1640, 37 °C. B: Kvasinkový typ buněk, YNB bujón, 30 °C, C: Pseudohyální buňka s viditelnou konstrikcí, odlišující ji od hyální formy, RPMI 1640, 37 °C, D: Hyální forma kvasinky, s čistě vláknitou strukturou, RPMI 1640, 37 °C; SEM zvětšení 5,000x (měřítko = 10µm)

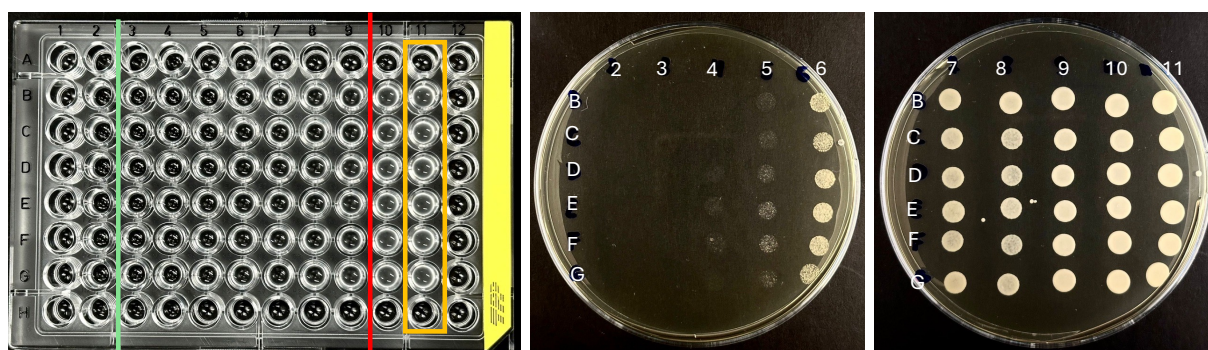
3.2.2. Volba vhodného antimykotika

Byla testována citlivost kmene CCM 8320 čtyři antimykotika. Hodnocení MIC s koncentracemi dle dostupné literatury ukázalo, že je kmen CCM 8320 rezistentní k nystatinu (viz Obr. č. 8, vpravo). Hodnota MIC klotrimazolu odpovídala literatuře (0,457 µg/ml), stejně jako hodnoty mikonazolu a flukonazolu. Flukonazol, jako lék nejčastěji používaný pro systémovou léčbu kandidóz byl z kandidátních antimykotik pro zvláknění vyloučen.



Obrázek č. 8 – Reprezentativní ukázka hodnocení hodnoty MIC pro čtyři antimykotika, *C. albicans*, 24 hodin inkubace, 30 °C, Alamar Blue inkubace 2 hod; vlevo – hodnocení mikonazolu a flukonazolu, vpravo – hodnocení nystatinu a klotrimazolu. Fialová barva ukazuje jamky, ve kterých nedochází k růstu kvasinek, a tedy neprobíhá metabolická aktivita. Kmen CCM 8320 je navzdory předpokladům rezistentní vůči nystatinu v koncentracích až 40 µg/ml, což je nahlášeno na Českou sbírku mikroorganismů.

Jako nejvhodnější pro zvláknění z hlediska relevance byl zvolen klotrimazol, který je nejčastěji používán pro místní léčbu vaginální kandidózy. U něj byla zhodnocena nejen hodnota MIC, ale i MFC. Hodnota MIC byla stanovena na 0,457 µg/ml (Obr. č. 9). Subkultivace z jamek na agarovou plotnu bez antimykotika prokázala, že i přes vizuální hodnocení absence zákalu, a tedy inhibici růstu, byly kvasinkové buňky stále životaschopné a fungicidní koncentrace MFC odpovídá v dané ředící řadě hodnotě 58,6 µg/ml (Obr. č. 9, sloupec č. 3 vlevo).



Obrázek č. 9 – Hodnocení MIC a MFC klotrimazolu pro kmen *C. albicans* CCM 8320. Žlutý sloupec představuje kontrolní růst. Červená linie představuje vizuální hodnotu MIC – v daném ředění je to 0,457 µg/ml. Hodnocení MFC ukazuje, že fungicidní koncentrace klotrimazolu v daném ředění je 58,6 µg/ml (zelená čára na obrázku vlevo)

3.2.3. Příprava a morfologie nanovláknenných vrstev s inkorporovaným CLO

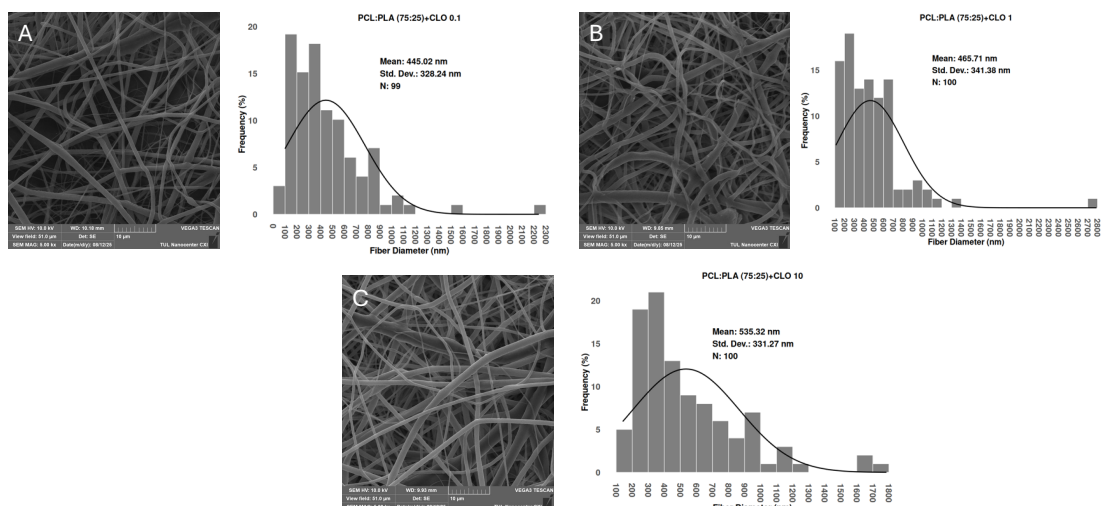
Poměr polymerů PCL:PLA ve zvlákňovacím roztoku byl na základě předchozích experimentů stanoven na 75:25. Základ pro zvlákňovací roztok byl mísen s roztokem klotrimazolu (CLO) při zachování stejného mísícího poměru. Koncentrace klotrimazolu v roztoku činila 0,1 mg/ml, 1 mg/ml a 10 mg/ml. Koncentrace CLO byly zvoleny na základě hodnocení MIC a MFC klotrimazolu vůči *C. albicans*. Zvolený rozsah umožnil následné hodnocení vlivu dávky CLO na biokompatibilitu a antimykotickou aktivitu nanovláken. Elektrostatické zvlákňování nanovláken probíhalo stejným postupem jako v případě polymerní směsi bez aditiva. Pro zvýšení výrobnosti procesu bylo použito napětí -10/45 kV.

Finální dávka klotrimazolu v nanovlákněch byla stanovena na základě dávky CLO ve zvlákňovacím roztoku vzhledem k obsahu celkové sušiny (Tabulka č. 2). Nanovláknenné vrstvy byly dále v testech značeny jako PCL/PLA+0,1 CLO, PCL/PLA+1 CLO a PCL/PLA+10 CLO.

Vláknna vykazovala hladkou a neporézní morfologii. Průměr vláken se se zvyšujícím se koncentrací inkorporovaného klotrimazolu zvětšovala (Obr. č. 10).

Tabulka č. 2 - Množství klotrimazolu v nanovláknenných vrstvách na základě dávky CLO ve zvlákňovacím roztoku vzhledem k obsahu celkové sušiny

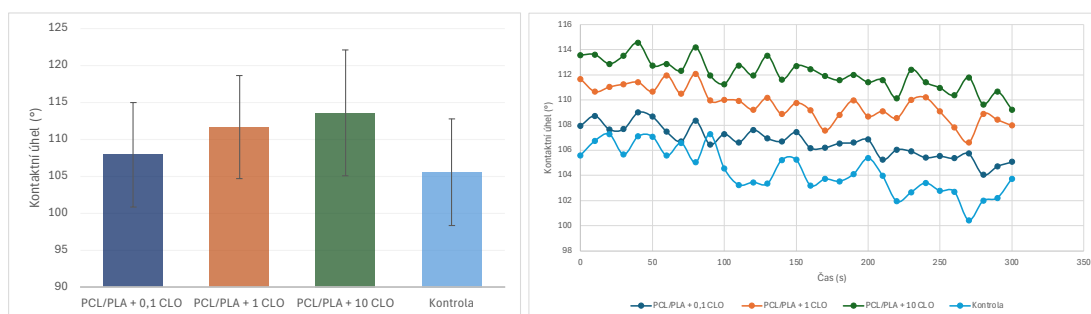
Označení zvlákňovacího roztoku	Hmotnostní poměr klotrimazolu k nanovláknenným vrstvám
PCL/PLA + 0.1 mg/ml CLO	0.3898 µg g klotrimazol/mg NFs
PCL/PLA + 1 mg/ml CLO	3.95 µg klotrimazol/mg NFs
PCL/PLA + 10mg/ml CLO	36.736 µg klotrimazol/mg NFs



Obrázek č. 10 - Morfologie nanovláknenných vrstev na snímcích SEM, histogramy relativní četnosti distribuce průměrů. A – PCL/PLA + 0,1 CLO, B – PCL/PLA + 1 CLO, C – PCL/PLA + 10 CLO. SEM zvětšení 5,000x (měřítko = 10 μ m)

3.2.4. Smáčivost povrchu nanovláknenné vrstvy měřená metodou kontaktního úhlu u přisedlé kapky

Obrázek č. 11 ukazuje vliv přídavku klotrimazolu na smáčivost povrchu nanovláken. Nanovláknna si po inkorporaci CLO zachovávají hydrofobní charakter základní matrice PCL/PLA. Hodnoty kontaktního úhlu u všech vzorků jsou vyšší než 90° a přídavek CLO dokonce vede k nárůstu hydrophobicity povrchu nanovláken. S rostoucí dávkou CLO byl pozorován nárůst středního kontaktního úhlu ve všech časových bodech – 107,9° u vzorku 0,1 CLO, 111,6° u vzorku 1 CLO a 113,6° u vzorku 10 CLO, oproti vláknům bez klotrimazolu s počáteční hodnotou 105,6°. Je tedy zřejmé, že čím větší je koncentrace klotrimazolu přidaného do zvláknovacího roztoku, tím vyšší je hodnota kontaktního úhlu. Tato hodnota nicméně při pětiminutovém kontaktu postupně klesá. Po 5 minutách měření došlo k mírnému snížení kontaktního úhlu u všech vzorků, avšak u žádného nebyla zaznamenána hodnota pod 90° a všechna si tak zachovávají svůj hydrofobní charakter.

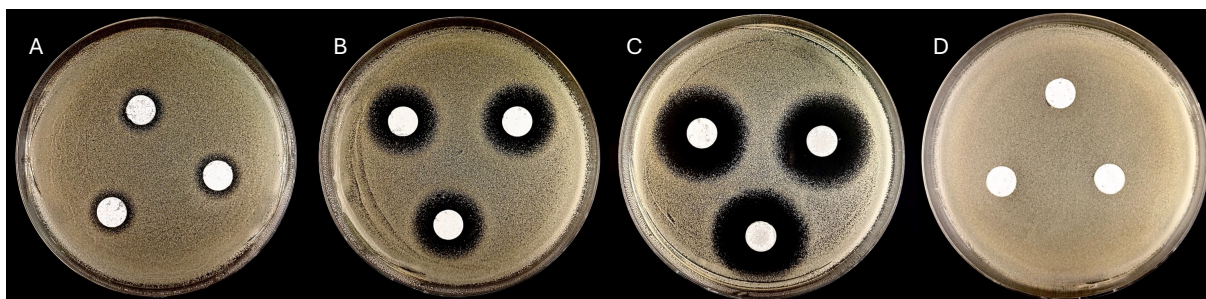


Obrázek č. 11 - Smáčivost povrchu nanovláken s klotrimazolem a kontrolou bez klotrimazolu; měřeno metodou kontaktního úhlu přisedlé kapky. Vlevo: Počáteční statický kontaktní úhel, směrodatná odchylka; Vpravo: Vývoj smáčivosti v čase, měření každý 10 s po dobu 5 min

3.2.5. Antimykotický účinek

Evaluace antimykotického účinku pomocí diskové difúzní metody

Všechny testované materiály vykazovaly po 24 hodinách inkubace zřetelnou inhibiční zónu, jejíž průměr rostl se zvyšující se koncentrací inkorporovaného klotrimazolu (viz Obrázek č. 12). Naměřené hodnoty průměrů inhibičních zón jsou uvedeny v Tabulce č. 3. Rozměr inhibičních zón byl přímo úměrný podílu CLO v nanovlákněch. Největší zóna $3,334 \pm 0,577$ mm byla zaznamenána u zorku PCL/PLA + 10 CLO. Tyto výsledky jednoznačně potvrzují schopnost antimykotika efektivně difundovat z nanovlákněné matrice v průběhu prvních 24 hodin inkubace i v nízkých dávkách a působit jako inhibitor růstu či mykotoxický agens v závislosti na své koncentraci v materiálu.



Obrázek č. 12 - Inhibiční zóny nanovlákněných vrstev s klotrimazolem v kontaktu s *C. albicans* na Sabouraudově agaru. A – PCL:PLA + 0.1 CLO, B – PCL:PLA + 1 CLO, C – PCL:PLA + 10 CLO, D – PCL:PLA nanovlákně bez klotrimazolu

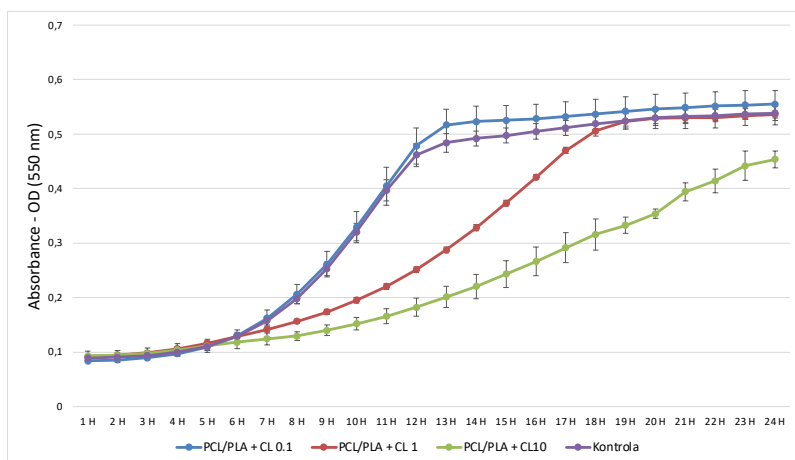
Tabulka č. 3 – Hodnoty průměrů inhibičních zón klotrimazolu k *C. albicans*

	PCL:PLA + 0.1 CLO	PCL:PLA + 1 CLO	PCL:PLA + 10 CLO
Inhibiční zóna (mm)	14,556	22,778	30,334
Směr. odchylka	0,769	0,384	0,577

Evaluace antimykotického účinku pomocí hodnocení růstové křivky *C. albicans* v 24h eluátu vláken

Inkubace suspenze *C. albicans* s eluátem z nanovláken s inkorporovaným klotrimazolem vedla ke změně průběhu růstové křivky. Přestože kvasinkové buňky byly schopny postupně překonat účinek klotrimazolu v médiu a po 24 hodinách dosáhnout obdobné optické hustoty (OD) jako neovlivněná kontrola. Počáteční vliv na délku lag fáze i strmost exponenciální fáze byl závislý na koncentraci klotrimazolu, jak je patrné z Obrázku č. 13. Eluát z materiálu s nejnižší koncentrací klotrimazolu nevykazoval měřitelný efekt na růst buněk *C. albicans*, což je v kontrastu s výsledky diskové difúzní metody. Zároveň může být tento rozpor v dosažených výsledcích způsoben rozdílem v použitých metodách. Tento rozdíl pravděpodobně souvisí s odlišným působením přímého kontaktu materiálu s

buňkami při diskové difuzi oproti působení samotného eluátu, který nevyvolává stejný inhibiční efekt na růst kvasinek.

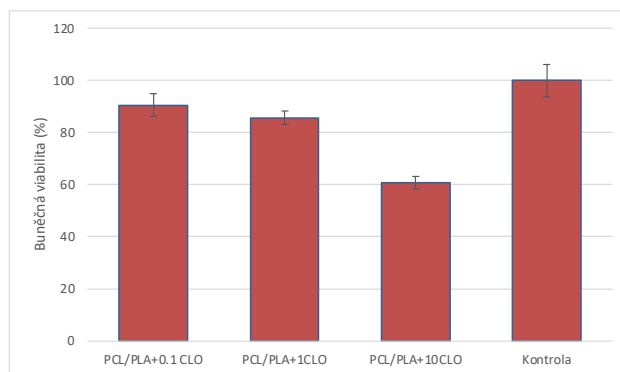


Obrázek č. 13 - Růstová křivka *C. albicans* v 24hodinovém eluátu nanovláken v médiu YNB při 30 °C

3.2.6. Biokompatibilita s vaginálními keratinocyty

In vitro cytotoxicita nanovláknenných vrstev s klotrimazolem v přímém kontaktu s vaginálními keratinocyty

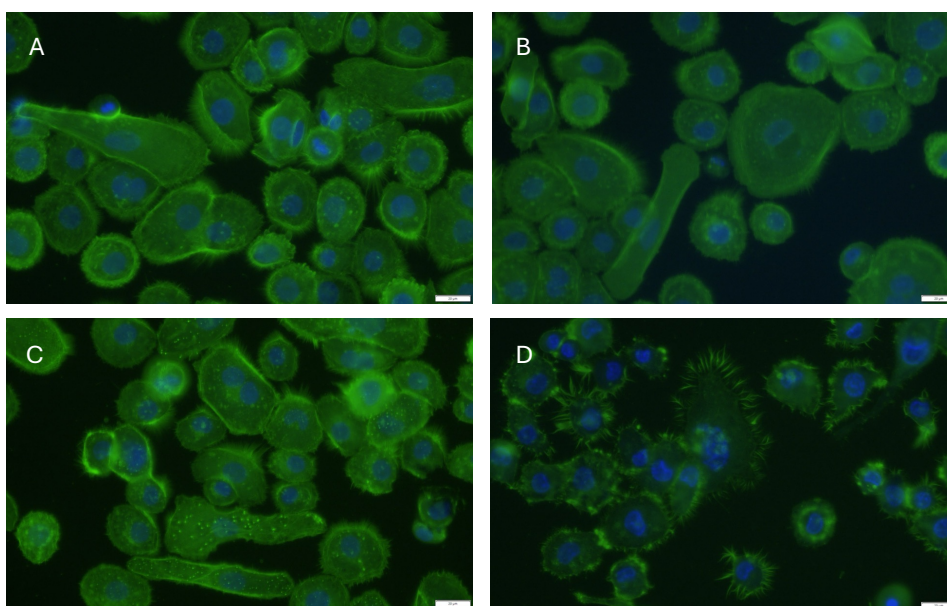
Výsledky MTT testu vaginálních keratinocytů v přímém kontaktu s nanovláknem obsahujícím klotrimazol (Obrázek č. 14) ukazují, že materiály s nižší koncentrací antimykotika jsou *in vitro* biokompatibilní, tedy viabilita buněk po 24hodinové expozici je vyšší, než 70 %. Vzorky PCL/PLA + 0,1 CLO a PCL/PLA + 1 CLO vykazují po 24 hodinách expozice životaschopnost buněk přesahující 70 %. Naproti tomu nanovláknenná vrstva s nejvyšší koncentrací (PCL/PLA + 10 CLO) zjevně inhibuje růst a metabolickou aktivitu vaginálních keratinocytů, neboť naměřená životaschopnost klesá pod hranici 70 %. Konkrétně byla dosažena hodnota 60,77 %.



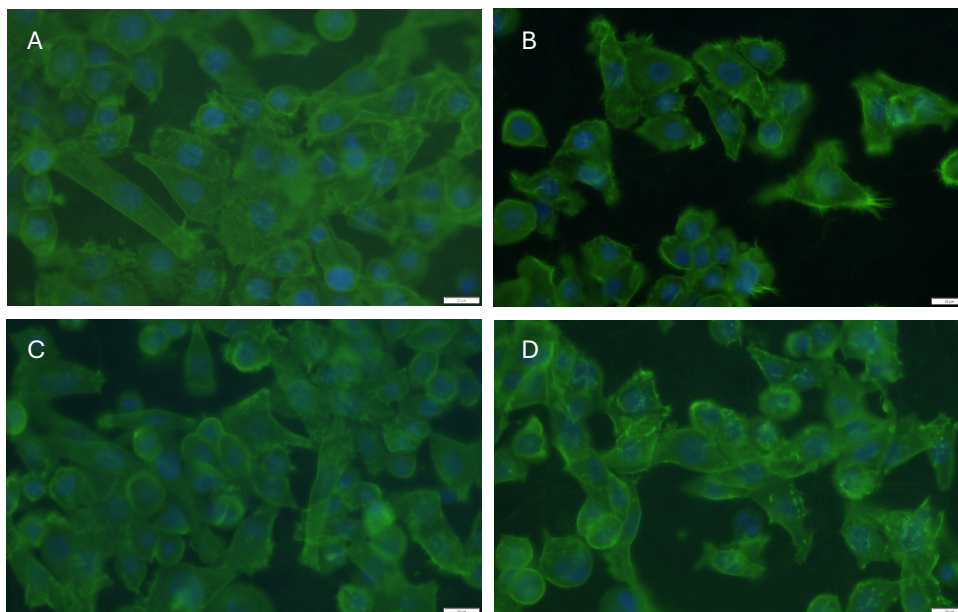
Obrázek č. 14 – Hodnocení cytotoxicity nanovláken s přidavkem klotrimazolem *in vitro* testem MTT, VK2/E6E7, 60 mm disky, 24 hod expozice

Vliv nanovláken s klotrimazolem na morfologii vaginálních keratinocytů

Na Obrázku č. 15 je imunofluorescenční barvení vaginálních keratinocytů VK2/E6E7 v přímém kontaktu s aditivovanými vlákny a kontrolou po dobu 24 hodin. Obrázek č. 16 ukazuje adhezi buněk nasazených přímo na nanovláknová vlákna a kontrolu. Ze snímků je zřejmé, že přímý kontakt vaginálních keratinocytů s materiálem obsahujícím nejvyšší dávku klotrimazolu vede k výrazným vnitřním strukturním změnám u těchto buněk – a to jak u aktinových vláken, tak i u jaderných struktur. Především u přímého kontaktu je výrazná fragmentace jader, indikující apoptotické procesy v různém stádiu, což odpovídá výsledkům MTT testu, kde tato koncentrace vyšla jako cytotoxická.



Obrázek č. 15 – Imunofluorescenční barvení vaginálních keratinocytů VK2/E6E7 rostoucích v přímém kontaktu s klotrimazolovými vlákny. Expozice 24 hod, 37 °C, zelená barva = aktinová vlákna (Alexa Fluor 488), modrá barva = jádro (DAPI). Vaginální keratinocyty v kontaktu s A: PCL/PLA nanovláknem bez klotrimazolu, B: PCL/PLA + 0,1 CLO, C: PCL/PLA + 1 CLO, D: PCL/PLA + 10 CLO. Měřítko = 20 µm



Obrázek č. 16 – Imunofluorescenční barvení vaginálních keratinocytů VK2/E6E7 rostoucích na klotrimazolových vláknech. (Expozice 24 hod, 37 °C, zelená barva = aktinová vlákna (barva), modrá barva = jádro. Vaginální keratinocyty v kontaktu s A: kontrolou (PCL/PLA nanovláknem bez CLO), B: PCL/PLA + 0,1 CLO, C: PCL/PLA + 1 CLO, D: PCL/PLA + 10 CLO. Měřítka = 20 μm)

Výsledky testování nanovláknenných vrstev s inkorporovaným klotrimazolem potvrzují jejich potenciál pro využití v terapii vulvovaginální kandidózy. Směsná vlákna s nejnižší koncentrací léčiva (PCL/PLA + 0,1 CLO) vykazovala dobrou biokompatibilitu a vytvářela inhibiční zónu na agaru, avšak jejich účinek na růst *Candida albicans* v eluátu byl minimální. Naopak nejvyšší testovaná koncentrace (PCL/PLA + 10 CLO) sice výrazně ovlivňovala růstovou dynamiku kvasinek a potlačovala jejich proliferaci na agaru, zároveň však vykazovala cytotoxické účinky na vaginální epitelální buňky, a to jak v metabolických testech, tak při morfologickém hodnocení pomocí imunofluorescence. Za nejvhodnější se proto jeví nanovláknem se střední koncentrací klotrimazolu (PCL/PLA + 1 CLO), která prokázala signifikantní antifungální účinek v obou testovacích systémech a současně si zachovala dobrou biokompatibilitu s vaginálními keratinocyty.

4. Závěr a další směřování

Výsledky této práce potvrzují, že nanovláknenné materiály představují mimořádně perspektivní biokompatibilní platformu pro lokální vaginální aplikaci léčiv, zejména v kontextu léčby vulvovaginální kandidózy. Bylo prokázáno, že polymerní směsi na bázi PCL/PLA umožňují efektivní zabudování klotrimazolu a jeho postupné uvolňování, přičemž zachovávají vhodné povrchové a morfologické vlastnosti pro kontakt s vaginálním epitelem. Testování MIC a MFC potvrdilo vysokou citlivost *Candida albicans* na klotrimazol a ukázalo, že i nízké koncentrace léčiva jsou schopny účinně inhibovat růst patogenu.

Biologické testy s linií vaginálních keratinocytů VK2/E6E7 dále ukázaly, že materiály s nízkým a středním obsahem klotrimazolu jsou dobře tolerovány a nevyvolávají zásadní morfologické změny buněk. Naopak nejvyšší testovaná koncentrace vedla k výrazným cytotoxickým projevům, včetně fragmentace jader a narušení aktinového cytoskeletu, což odpovídá aktivaci apoptotických procesů. Tato zjištění zdůrazňují nutnost pečlivé optimalizace dávky léčiva v nanovláknenné matici tak, aby byla zachována terapeutická účinnost při současném minimalizování nežádoucích účinků na buňky zdravé tkáně.

Komplexní charakterizace materiálů, zahrnující morfologii, smáčivost, kinetiku uvolňování léčiva i biologickou odezvu, poskytla ucelený pohled na chování klotrimazolových nanovláken v podmínkách relevantních pro vaginální prostředí. Získané výsledky potvrzují, že správně navržené nanovláknenné systémy mohou představovat účinnou a bezpečnou alternativu ke konvenčním lékovým formám.

Pro další směřování výzkumu navrhuje rozšířit experimentální část o několik perspektivních oblastí, které mohou významně zvýšit terapeutický potenciál vyvíjených nanovláknenných systémů. Jedním z klíčových kroků bude začlenění chitosanu do polymerní matrice, a to díky jeho přirozeným antibakteriálním vlastnostem, bioadhezi a schopnosti podporovat hojení tkání. Paralelně plánujeme testování přírodního extraktu s prokázanými antimykotickými účinky, který by mohl představovat šetrnější alternativu k syntetickým léčivům a zároveň snížit riziko vzniku rezistence. Zároveň bude důležité ověřit kombinovaný efekt přírodních látek s konvenčními antimykotiky, protože synergické působení může umožnit snížení potřebných dávek léčiv, zvýšit účinnost a omezit cytotoxické projevy. Tento navrhovaný výzkumný směr tak otevírá prostor pro vývoj multifunkčních nanovláknenných systémů, které budou schopny cíleně působit proti širokému spektru vaginálních infekcí a zároveň zachovat vysokou biokompatibilitu.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory SGS projektu SGS-2025-3589, SGS 2023-4406 FP TUL, projektu OP TAK NanoMed a projektu TAČR NanoMed, jejichž příspěvní umožnilo realizaci experimentální části i rozvoj odborného zázemí.

Mé velké poděkování patří především školiteli za trpělivost, podporu a popohánění. Stejně tak děkuji své konzultantce za veškerou podporu, pochopení a nesmírnou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegyním, které byly neocenitelnou oporou v každodenní laboratorní práci i při řešení nečekaných výzkumných výzev. Zvláštní poděkování patří Bc. Elišce Prokopcové za pomoc s měřením kontaktního úhlu, Ivě Víchové a Markétě Schaabové za provedení SEM měření, Olče Buchar Klinovské za pomoc s mikroskopií a Mischeel Gantsogt za veškerou spolupráci.

V neposlední řadě děkuji své rodině za jejich trpělivost, podporu a víru v to, že tuto cestu úspěšně dokončím. Bez jejich pochopení a povzbuzení by tato práce nemohla vznikat.

Seznam použité literatury

ALEXANDER, Nancy J; Edward BAKER; Marc KAPTEIN; Ulrich KARCK; Leslie MILLER a Edio ZAMPAGLIONE, 2004. Why consider vaginal drug administration? *Fertility and Sterility*. Online. **82**(1), 1–12. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2004.01.025

BHATTARAI, Narayan; Jonathan GUNN a Miqin ZHANG, 2010. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Online. **62**(1), 83–99. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2009.07.019

BROTMAN, Rebecca M., 2011. Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective. *Journal of Clinical Investigation*. Online. **121**(12), 4610–4617. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI57172

CARR, Phyllis L; Donna FELSENSTEIN a Robert H FRIEDMAN, [nedatováno]. Evaluation and Management of Vaginitis.

DA SILVA, Maria Lucilene Queiroz; Gabriela Ribeiro DE SOUSA; Natália Ferreira DE SOUSA; Antonia Thassya Lucas DOS SANTOS; Henrique Douglas Melo COUTINHO; José Maria Barbosa FILHO; Jailton DE SOUZA FERRARI; Marcus Tullius SCOTTI; João Batista Teixeira DA ROCHA a Maria Flaviana Bezerra MORAIS-BRAGA, 2024. In vitro inhibitory activity of Riparins against Candida spp. strains and in silico interaction with multi-drug-resistance proteins. *Process Biochemistry*. Online. **142**, 46–61. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2024.04.005

DASH, Tapan K. a V. Badireenath KONKIMALLA, 2012. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*. Online. **158**(1), 15–33. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.064

EREL, Cemal Tamer a Ipek Betül OZCIVIT ERKAN, 2025. Oral versus vaginal micronized progesterone in menopausal hormone therapy. *Gynecological Endocrinology*. Online. **41**(1), 2592400. ISSN 0951-3590, 1473-0766. Dostupné z: doi:10.1080/09513590.2025.2592400

FREJ-MĄDRZAK, Magdalena; Sabina GOLEC; Katarzyna WŁODARCZYK; Irena CHOROSZY-KRÓL a Urszula NAWROT, 2021. Susceptibility to Clotrimazole of Candida spp. Isolated from the Genitourinary System—A Single Center Study. *Pathogens*. Online. **10**(9), 1142. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens10091142

GAJER, Paweł; Rebecca M. BROTMAN; Guoyun BAI; Joyce SAKAMOTO; Ursel M. E. SCHÜTTE; Xue ZHONG; Sara S. K. KOENIG; Li FU; Zhanshan (Sam) MA; Xia ZHOU; Zaid ABDO; Larry J. FORNEY a Jacques RAVEL, 2012. Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. *Science Translational Medicine*. Online. **4**(132) [vid. 2026-01-11]. ISSN 1946-6234, 1946-6242. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.3003605

GILBERT, Nicole M; Warren G LEWIS; Guocai LI; Dorothy K SOJKA; Jean Bernard LUBIN a Amanda L LEWIS, 2019. Gardnerella vaginalis and Prevotella bivia Trigger Distinct and Overlapping Phenotypes in a Mouse Model of Bacterial Vaginosis. *The Journal of Infectious Diseases*. Online. **220**(7), 1099–1108. ISSN 0022-1899, 1537-6613. Dostupné z: doi:10.1093/infdis/jiy704

- HUSSAIN, Alamdar a Fakhrul AHSAN, 2005. The vagina as a route for systemic drug delivery. *Journal of Controlled Release*. Online. **103**(2), 301–313. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2004.11.034
- HYMAN, Richard W.; Marilyn FUKUSHIMA; Lisa DIAMOND; Jochen KUMM; Linda C. GIUDICE a Ronald W. DAVIS, 2005. Microbes on the human vaginal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Online. **102**(22), 7952–7957. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0503236102
- JALALVANDI, Esmat; Hafez JAFARI; Christiani A. AMORIM; Denise Freitas Siqueira PETRI; Lei NIE a Amin SHAVANDI, 2020. Vaginal Administration of Contraceptives. *Scientia Pharmaceutica*. Online. **89**(1), 3. ISSN 2218-0532. Dostupné z: doi:10.3390/scipharm89010003
- KOVÁČIK, Andrej a Barbora VRANÍKOVÁ, 2021. Vaginal medicinal preparations available in the Czech Republic and the basic principles of their application. *Praktické lékařství*. Online. **17**(2), 129–134. ISSN 18012434, 18035329. Dostupné z: doi:10.36290/lek.2021.023
- KURAMAE, Eiko E.; Vincent ROBERT; Berend SNEL; Michael WEIß a Teun BOEKHOUT, 2006. Phylogenomics reveal a robust fungal tree of life. *FEMS Yeast Research*. Online. **6**(8), 1213–1220. ISSN 15671356, 15671364. Dostupné z: doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00119.x
- MACHADO, António a Nuno CERCA, 2015. The influence of biofilm formation by *Gardnerella vaginalis* and other anaerobes on bacterial vaginosis.
- MARTINEZ, Stacy; Jonathan Gomez GARCIA; Roy WILLIAMS; Moamen ELMASSRY; Andrew WEST; Abdul HAMOOD; Deborah HURTADO; Brent GUDENKAUF; Gary VENTOLINI a Natalia SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, 2020. Lactobacilli spp.: real-time evaluation of biofilm growth. *BMC Microbiology*. Online. **20**(1), 64. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-020-01753-3
- MATOULKOVÁ, Dagmar a Petra KUBIZNIAKOVÁ, 2015. Lactic acid bacteria and cultivation methods of their detection - Part I. *Kvasny Prumysl*. Online. **61**(3), 76–88. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2015012
- MENDLING, Werner; Maged ATEF EL SHAZLY a Lei ZHANG, 2020. Clotrimazole for Vulvovaginal Candidosis: More Than 45 Years of Clinical Experience. *Pharmaceuticals*. Online. **13**(10), 274. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph13100274
- MILLER, Elizabeth A.; DeAnna E. BEASLEY; Robert R. DUNN a Elizabeth A. ARCHIE, 2016. Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why Is the Human Vaginal Microbiome Unique? *Frontiers in Microbiology*. Online. **7** [vid. 2025-11-08]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01936
- MITCHELL, Caroline; Kathleen PAUL; Kathy AGNEW; Reggie GAUSSMAN; Robert W. COOMBS a Jane HITTI, 2011. Estimating Volume of Cervicovaginal Secretions in Cervicovaginal Lavage Fluid Collected for Measurement of Genital HIV-1 RNA Levels in Women. *Journal of Clinical Microbiology*. Online. **49**(2), 735–736. ISSN 0095-1137, 1098-660X. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00991-10
- MOHARIR, Keshav S.; Mallesh KURAKULA; Vinita KALE; El-Refaie KENAWY; Sheikh MURTUJA; Mohd Neyaz AHSAN; Md Saquib HASNAIN a Amit Kumar NAYAK, 2022. Biomedical applications of electrospun chitosan nanofibers. In: *Chitosan in Biomedical Applications*. Online. No publisher: Elsevier, s. 75–110 [vid. 2026-01-11]. ISBN 978-0-12-821058-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-821058-1.00004-6

PAIS, Pedro; Carla PIRES; Catarina COSTA; Michiyo OKAMOTO; Hiroji CHIBANA a Miguel C. TEIXEIRA, 2016. Membrane Proteomics Analysis of the *Candida glabrata* Response to 5-Flucytosine: Unveiling the Role and Regulation of the Drug Efflux Transporters CgFlr1 and CgFlr2. *Frontiers in Microbiology*. Online. **7** [vid. 2026-01-11]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.02045

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, Rita; Ana PALMEIRA-DE-OLIVEIRA a José MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, 2015. New strategies for local treatment of vaginal infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Online. **92**, 105–122. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2015.06.008

PETROVA, Mariya I.; Gregor REID; Mario VANEECHOUTTE a Sarah LEBEER, 2017. *Lactobacillus iners* : Friend or Foe? *Trends in Microbiology*. Online. **25**(3), 182–191. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2016.11.007

RAVEL, Jacques; Pawel GAJER; Zaid ABDO; G. Maria SCHNEIDER; Sara S. K. KOENIG; Stacey L. MCCULLE; Shara KARLEBACH; Reshma GORLE; Jennifer RUSSELL; Carol O. TACKET; Rebecca M. BROTMAN; Catherine C. DAVIS; Kevin AULT; Ligia PERALTA a Larry J. FORNEY, 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Online. **108**(supplement_1), 4680–4687. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1002611107

SANCHEZ ARMENGOL, Eva; Florina VEIDER; Gioconda MILLOTTI; Gergely KALI; Andreas BERNKOP-SCHNÜRCH a Flavia LAFFLEUR, 2025. Exploring the potential of vaginal drug delivery: innovations, efficacy, and therapeutic prospects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Online. **77**(9), 1149–1165. ISSN 0022-3573, 2042-7158. Dostupné z: doi:10.1093/jpp/rgaf045

SILL, Travis J. a Horst A. VON RECUM, 2008. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. Online. **29**(13), 1989–2006. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.011

SIROTA, Ido; Shvetha ZAREK a James SEGARS, 2014. Potential Influence of the Microbiome on Infertility and Assisted Reproductive Technology. *Seminars in Reproductive Medicine*. Online. **32**(01), 035–042. ISSN 1526-8004, 1526-4564. Dostupné z: doi:10.1055/s-0033-1361821

SPAMPINATO, Claudia a Darío LEONARDI, 2013. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*. Online. **2013**(1), 204237. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1155/2013/204237

SPEAR, Gregory T.; Audrey L. FRENCH; Douglas GILBERT; M. Reza ZARIFFARD; Paria MIRMONSEF; Thomas H. SULLIVAN; William W. SPEAR; Alan LANDAY; Sandra MICCI; Byung-Hoo LEE a Bruce R. HAMAKER, 2014. Human α -amylase Present in Lower-Genital-Tract Mucosal Fluid Processes Glycogen to Support Vaginal Colonization by *Lactobacillus*. *The Journal of Infectious Diseases*. Online. **210**(7), 1019–1028. ISSN 0022-1899, 1537-6613. Dostupné z: doi:10.1093/infdis/jiu231

TALAPKO, Jasminka; Martina JUZBAŠIĆ; Tatjana MATIJEVIĆ; Emina PUSTIJANAC; Sanja BEKIĆ; Ivan KOTRIS a Ivana ŠKRLEC, 2021. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of Fungi*. Online. **7**(2), 79. ISSN 2309-608X. Dostupné z: doi:10.3390/jof7020079

TIETZ, Katharina a Sandra KLEIN, 2018. Simulated Genital Tract Fluids and Their Applicability in Drug Release/Dissolution Testing of Vaginal Dosage Forms. *Dissolution Technologies*. Online. **25**(3), 40–51. ISSN 1521298X. Dostupné z: doi:10.14227/DT250318P40

VALORE, Erika V.; Christina H. PARK; Sorina L. IGRETI a Tomas GANZ, 2002. Antimicrobial components of vaginal fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Online. **187**(3), 561–568. ISSN 00029378. Dostupné z: doi:10.1067/mob.2002.125280

VITIELLO, Antonio; Francesco FERRARA; Mariarosaria BOCCELLINO; Annarita PONZO; Carla CIMMINO; Emilio COMBERIATI; Andrea ZIVI; Salvatore CLEMENTE a Michela SABBATUCCI, 2023. Antifungal Drug Resistance: An Emergent Health Threat. *Biomedicines*. Online. **11**(4), 1063. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines11041063

ZHERNOV, Yury V.; Vladislava O. PETROVA; Mark Y. SIMANDUYEV; Denis V. SHCHERBAKOV; Roman V. POLIBIN; Oleg V. MITROKHIN; Artem A. BASOV; Nadezhda N. ZABRODA; Sonya O. VYSOCHANSKAYA; Ezzulddin AL-KHALEEFA; Kamilla R. PASHAYEVA a Narmina Yu. FEYZIYEVA, 2024. Microbicides for Topical HIV Immunoprophylaxis: Current Status and Future Prospects. *Pharmaceuticals*. Online. **17**(6), 668. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph17060668

Seznam vlastních publikací vztahujících se k předkládané práci

MORÁVKOVÁ, K., M. GANTSOGT, M. ŘEZANKA a M. RYSOVÁ. The effect of PCL/PLA blend nanofibers with clotrimazole on *Candida albicans* growth.. NANOCON Conference Proceedings – International Conference on Nanomaterials. Ostrava: TANGER Ltd., 2025. 2 s. ISBN 978-80-88365-29-7. ISSN 2694-930X.

MORÁVKOVÁ, K., Š. HAUZEROVÁ, M. ŘEZANKA a M. RYSOVÁ. The effect of molecular weight of polycaprolactone in blend nanofibers on the vaginal microbiome response. In: NANOCON Conference Proceedings – International Conference on Nanomaterials. Ostrava: TANGER Ltd., 2024. 2 s. ISBN 978-80-88365-24-2. ISSN 2694-930X.

RYSOVÁ, M., H. TOMÁNKOVÁ, **K. MORÁVKOVÁ,** M. SCHAABOVÁ, V. PUNTÉS, R. NUNES PEREIRA, E. AMLER, R. DIVÍN a A. ŠEVCŮ. Mucoadhesive nanomaterials – Composition and size matters. *Tissue Engineering Part A*. New York: Mary Ann Liebert, 2023, s. PP-313. ISSN 1937-3341.

Výsledky prezentované na konferencích

MORÁVKOVÁ, Karolína, Hana TOMÁNKOVÁ, Michal ŘEZANKA a Miroslava RYSOVÁ. Využitelnost nanovláken pro hojení ran ve vaginálním prostředí. In: IV. Česko-slovenský kongres Mezioborové přístupy v hojení ran. Lednice, 27.–28. 2025. Vystoupení formou e-posterů.

MORÁVKOVÁ, Karolína, Hana TOMÁNKOVÁ, Michal ŘEZANKA a Miroslava RYSOVÁ. Vliv směsných nanovláken PCL/PLA na růstové parametry kvasinky *Candida albicans*. In: Biomateriály a jejich

povrchy XVIII. Herbertov: České vysoké učení technické v Praze, 2025, s. 71–72. ISBN 978-80-01-07464-0. Vystoupení formou posteru.

MORÁVKOVÁ, Karolína, Šárka HAUZEROVÁ, Kateřina KUBOVÁ, Michal ŘEZANKA a Miroslava RYSOVÁ. Vliv PLA nanovláknenného systému na simulované vaginální prostředí. In: Biomateriály a jejich povrchy XVII. Herbertov: České vysoké učení technické v Praze, 2024, s. 33–34. ISBN 978-80-01-07334-6. Vystoupení formou přednášky; **práce oceněna 1. místem ve studentské soutěži**

MORÁVKOVÁ, Karolína, Miroslava RYSOVÁ, Šárka HAUZEROVÁ, Michal ŘEZANKA, Kateřina KUBOVÁ a Alena ŠEVCŮ. Vliv složení nanovláken na odpověď simulovaného vaginálního prostředí in vitro. In: Biomateriály a jejich povrchy XVI. Herbertov: České vysoké učení technické v Praze, 2023, s. 74–75. ISBN 978-80-01-07212-7. Vystoupení formou posteru.