

**Univerzita Pardubice**

**Fakulta chemicko-technologická**

**Nosičové systémy na bázi chitosanu pro medicínské aplikace**

**Bc. Veronika Váňová**

**Diplomová práce**

**2018**

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Váňová**  
Osobní číslo: **C16482**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Název tématu: **Nosičové systémy na bázi chitosanu pro medicínské aplikace**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

### 1. Teoretická část:

- a) Nosičové systémy (drug delivery systems)
- b) Biokompatibilní materiály, charakterizace
- c) Způsoby uchycení ligandů, léčiv, uvolňovací studie
- d) Cílené doručování látek - orální, transdermální a parenterální
- e) Testování biologických účinků nosič. systémů

### 2. Praktická část:

- a) Nanomateriály (nanovlákná, nanočástice) s kolagenázou: vazba enzymu různými technikami.
- b) Ověření účinnosti vazby stanovením enzymové aktivity, detekcí a stanovením proteinu.
- c) Aplikace nanomateriálu s kolagenázou v in vivo procesu hojení rány.
- d) Nanomateriály s modelovým proteinem/peptidem, uvolňovací studie.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Rešerše za posledních 10 let**

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

**18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce:

**11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

## **Prohlášení autora**

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne.....

.....

**Bc. Veronika Váňová**

### **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D za odborné konzultace, cenné rady a trpělivost při vedení mé diplomové práce.

## **ANOTACE**

Předmětem této diplomové práce je příprava nosičových systémů na bázi chitosanu a jejich modifikace proteiny (klostridiální kolagenáza, ovalbumin). U chitosanových nanovláken s kovalentně vázanou kolagenázou byl sledován jejich efekt na hojení excizní a nekrotické rány u laboratorního zvířete. Na nanočástice chitosan/TPP a kopolymeru chitosanu s PLA/PAA byla pomocí protein nespecifických analytických metod sledována míra sorpce modelového proteinu ovalbuminu a porovnána se sorpcí ovalbuminu na chitosanová nanovlákná. U obou nanočástic byla dále sledována kinetika uvolnění.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

cílené doručování léčiv, chitosan, nanovlákná, nanočástice, kolagenáza z *Clostridium histolyticum*, ovalbumin

## **TITLE**

Drug delivery systems based on chitosan for medicinal application

## **ANNOTATION**

The subject of this diploma thesis is preparation of chitosan support systems and their modifications of proteins (clostridial collagenase, ovalbumin). The healing effect of chitosan nanofibers with covalent immobilized collagenase were studied of excision and necrotic wound on the laboratory animals. An analytical protein nonspecific techniques were used to monitor the rate of sorption model protein ovalbumin to nanoparticles from chitosan/TPP and chitosan/PLA/PAA. The release kinetics the ovalbumin both chitosan/TPP and chitosan/PLA/PAA were monitored.

## **KEYWORDS**

drug delivery systems, chitosan, nanofiber, nanoparticle, collagenase from *Clostridium histolyticum*, ovalbumin

## Obsah

Seznam zkratk .....	10
Seznam obrázků a tabulek .....	12
Úvod.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1.1 Nosičové systémy - drug delivery systems .....	15
1.2 Biokompatibilní materiály .....	17
1.2.1 Vlastnosti biomateriálů .....	17
1.2.2 Polymery .....	18
1.2.3 Polymerní nanostruktury.....	24
1.2.4 Metody fyzikálně-chemické charakterizace biomateriálů .....	30
1.3 Imobilizační techniky ligandů do nosičových systémů .....	31
1.4 Cílené doručování léčiv.....	35
1.4.1 Strategie cíleného doručování léčiv .....	36
1.5 Metody analytické chemie využívané ke stanovení proteinu .....	40
1.5.1 Protein nespecifické metody .....	40
1.5.2 Protein specifické metody.....	42
1.6 Nosičové systémy v enzymatickém debridementu v procesu hojení rány.....	42
1.7 In vitro uvolňovací studie nosičových systémů .....	43
2 CÍLE PRÁCE.....	45
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	46
3.1 Přístroje a pomůcky.....	46
3.2 Materiál .....	47
3.2.1 Použité reagensie a chemikálie.....	47
3.2.2 Použité roztoky .....	48

3.2.3	Použitá nanovláknna .....	48
3.2.4	Použité nanočástice .....	49
3.3	Příprava a dialýza nanočástic z chitosanu/TPP .....	49
3.3.1	Příprava dialyzačních střívek .....	49
3.3.2	Dialýza nanočástic .....	50
3.4	Rehydratace nanočástic .....	50
3.5	Karbodiimidová metoda vazby kolagenázy na chitosanová nanovláknna.....	50
3.6	Sorpce kolagenázy na nanovláknno .....	51
3.7	Sorpce ovalbuminu na nanočástice a následné uvolnění .....	51
3.8	Stanovení aktivity kolagenázy .....	52
3.8.1	Solubilní kolagenáza .....	52
3.8.2	Imobilizovaná a sorbovaná kolagenáza .....	53
3.9	Stanovení koncentrace proteinů metodou mikroBCA .....	53
3.9.1	Kalibrace .....	53
3.9.2	Postup s nanovláknny .....	53
3.9.3	Postup s nanočásticemi .....	54
3.10	Spektrofotometrické stanovení množství proteinů .....	54
3.11	SDS-PAGE s Coomassie Brilliant Blue barvením .....	55
3.12	Aplikace nanovláknenného krytu na excizní ránu laboratorního zvířete .....	56
3.13	Aplikace nanovláknenného krytu na nekrotickou tkáň laboratorního zvířete .....	57
4	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	58
4.1	Příprava chitosanového nanovláknna s kolagenázou .....	58
4.2	Hodnocení vlivu chitosanového nanovláknna s kolagenázou na hojení rány u laboratorního zvířete .....	61
4.2.1	Hojení excizní rány .....	61
4.2.2	Hojení nekrotické rány.....	63
4.3	Sledování účinnosti sorpce proteinů na chitosanové nanomateriály.....	67



4.3.1	Sorpce kolagenázy na chitosanová nanovlákná.....	68
4.3.2	Sorpce ovalbuminu na chitosanová nanovlákná.....	71
4.3.3	Sorpce ovalbuminu na CS/TPP nanočástice.....	74
4.3.4	Sorpce ovalbuminu na kopolymerní nanočástice CS/PLA/PAA.....	76
4.3.5	Porovnání účinnosti sorpce z přímého a nepřímého měření proteinu na nanomateriálu.....	78
4.4	Sledování kinetiky uvolnění ovalbuminu z nanočástic.....	80
5	ZÁVĚR.....	83
	Použitá literatura.....	85

## **Seznam zkratek**

AFM - mikroskopie atomárních sil

BCA - Bicinchoninová metoda

CLEA - metoda zesíťovaných enzymových agregátů (Cross-Linking Enzyme Aggregates)

CLEC - metoda zesíťovaných enzymových krystalů (Cross-Linking Enzyme Crystals)

CS - chitosan

DDS - drug delivery system

DLS - dynamický rozptyl světla

DSC - diferenciální skenovací kalorimetrie

EDC - (3dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid

EDH - elektrohydrodynamické techniky

EPR - fenomén zvýšené permeability a retence (Enhanced permeability and retention effect)

FTIR - infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

HA - hyaluronová kyselina

HPLC - vysokotlaká kapalinová chromatografie

IR - infračervená spektrometrie

MS - hmotnostní spektrometrie

NHS - N-hydrosulfosukciimid

NSOM - optická skenovací mikroskopie v blízkém poli

PAA - polyakrylová kyselina

PDLA - D- izomer kyseliny polymléčné

PGA - kyselina polyglykolová

PLA - kyselina polymléčná

PLLA - L- izomer kyseliny polymléčné

PVA - polyvinyl alkohol

RTG - rengenová krystalografie

SDS-PAGE - elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

SEM - skenovací elektronová mikroskopie

STM - skenovací tunelová mikroskopie

SUKL - úřad pro kontrolu potravin a léčiv

TEM - transmisní elektronová spektrometrie

TPP - tripolyfostát

UV-VIS - ultrafialovo-viditelná spektroskopie

XPS - fotoelektronová spektrometrie

ZDF - Zucker Diabetic Fatty Rat

## Seznam obrázků a tabulek

Obr. č. 1 : Přehled biomateriálů .....	19
Obr. č. 2 : Chemická struktura chitosanu a chitinu .....	21
Obr. č. 3 : SEM snímky vzniku chitosanových struktur metodou electrospinning .....	25
Obr. č. 4 : Typy polymerních nanočástic pro drug delivery systémy .....	26
Obr. č. 5 : Schematické znázornění struktury liposomů .....	27
Obr. č. 6 : Schéma principů imobilizačních technik .....	32
Obr. č. 7 : Schéma strategií pro cílený transport léčiv .....	37
Obr. č. 8 : Porovnání transdermálního průniku léčiva .....	40
Obr. č. 9 : Schéma ošetření laboratorního zvířete 1 .....	56
Obr. č. 10 : Schéma ošetření laboratorního zvířete 2 .....	57
Obr. č. 11 : Kalibrace pro spektrofotometrické stanovení aktivity kolagenázy ve 2 ml .....	59
Obr. č. 12 : Kalibrace pro stanovení koncentrace kolagenázy metodou microBCA .....	59
Obr. č. 13 : Spektrofotometrické stanovení aktivity kolagenázy na nanovláčkách .....	60
Obr. č. 14 : Stanovení koncentrace kolagenázy na mg nanovláčka metodou microBCA .....	60
Obr. č. 15 : Průměrné procentuální hodnoty hojení skupin krys .....	62
Obr. č. 16 : Hodnoty hojení rány jednotlivých zvířat .....	62
Obr. č. 17 : Schéma ošetření a fotografie nekrotické tkáně .....	63
Obr. č. 18 : Procentuální hojení nekrotické rány 1 .....	64
Obr. č. 19 : Schéma ošetření a fotografie hojení nekrotické tkáně 2 .....	65
Obr. č. 20 : Hojení nekrotické rány v čase .....	65
Obr. č. 21 : Porovnání velikosti jizvy s velikostí rány .....	66
Obr. č. 22 : Stanovení koncentrace kolagenázy sorbované na nanovláčkách microBCA .....	68
Obr. č. 23 : Aktivita kolagenázy v přítomnosti směsi proteázových inhibitorů .....	70
Obr. č. 24 : Kalibrace pro stanovení koncentrace ovalbuminu metodou microBCA .....	71
Obr. č. 25 : Elektroforeogram sorce ovalbuminu na nanovláčko .....	72
Obr. č. 26 : Elektroforeogram sorce ovalbuminu na CS/TPP .....	74
Obr. č. 27 : Elektroforeogram sorbovaného ovalbuminu na CS/PLA/PAA .....	76
Obr. č. 28 : Přímé porovnání sorce ovalbuminu na biomateriály .....	78
Obr. č. 29 : Nepřímé porovnání účinnosti sorce ovalbuminu na biomateriály .....	79
Obr. č. 30 : Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z nanočástic .....	81
Tab. č. 1: Druhy DDS a mechanismy kontroly uvolňování léků .....	16
Tab. č. 2: Metody pro analýzu fyzikálně-chemických vlastností nosičů .....	30
Tab. č. 3: Metody pro analýzu fyzikálně-chemických vlastností komplexů materiál- léčivo .....	31
Tab. č. 4: Porovnání metodik poskytování léčiv .....	35
Tab. č. 5: Ideální vlastnosti léčiva pro transdermální drug delivery systém .....	39
Tab. č. 6: Příprava elektroforetických gelů .....	55
Tab. č. 7: Stanovení koncentrace kolagenázy na nanovláčko .....	69
Tab. č. 8: Spektrofotometrické stanovení sorce ovalbuminu na nanovláčka .....	72
Tab. č. 9: Stanovení koncentrace sorbovaného ovalbuminu na nanovláčka .....	73
Tab. č. 10: Spektrofotometrické stanovení sorbovaného ovalbuminu na CS/TPP .....	74
Tab. č. 11: Stanovení sorbovaného ovalbuminu na CS/TPP .....	75
Tab. č. 12: Spektrofotometrické stanovení sorce ovalbuminu na CS/PLA/PAA .....	77
Tab. č. 13: Přímé a nepřímé stanovení koncentrace sorce ovalbuminu na CS/PLA/PAA .....	77
Tab. č. 14: Uvolňování ovalbuminu z nanočástic CS/PLA/PAA a CS/TPP .....	80

## Úvod

Tato práce se zabývá nosičovými systémy na bázi chitosanu, nanovláknů a nanočásticemi, a jejich modifikaci proteiny, které nacházejí široké uplatnění v medicíně především v rychle se rozvíjející oblasti cíleného doručování léčiv. Chitosan je snadno dostupný materiál a díky jeho antibakteriálním a dalším unikátním vlastnostem, jako je biodegradabilita, biokompatibilita a netoxičita, je slibným materiálem zejména v kombinaci s léčivy, enzymy nebo buňkami. [1]

Právě charakterizace druhů dostupných biokompatibilních materiálů, způsobů uchycení ligandů na povrch nosičových systémů, možnosti cíleného doručování látek v organismu, sledování uvolňování ligandů detekčními technikami analytické chemie a jejich přehled je předmětem teoretické části této práce.

Náplní experimentální části práce je příprava a modifikace chitosanových biomateriálů vybranými proteiny. V práci jsou použity nanočástice z kopolymeru polylaktidu a polyakrylové kyseliny roubovaného na chitosanu (CS/PLA/PAA) z Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, nanočástice chitosan/tripolyfosfát (CS/TPP) a chitosanová nanovlákná od společnosti Nanovia s.r.o, Litvínov. První část práce se zabývá imobilizací kolagenázy z mikroorganismu *Clostridium histolyticum* na chitosanová nanovlákná a výběrem optimální navážky kolagenázy pro získání aktivního nosiče. Enzymaticky aktivní nanovláknenný kryt bude testován ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové v oblasti hojení ran. Vyvinutý nanomateriál bude aplikován na excizní a nekrotické rány u laboratorních zvířat, konkrétně u ZDF (Zucker Diabetic Fatty Rat) potkanů a hodnocen z pohledu hojení, velikosti zahojené jizvy a také vlastností materiálu

Druhou částí práce je modifikace nanomateriálů s obsahem chitosanu prostou sorpcí modelovým proteinem ovalbuminem. Výhodou nanomateriálů je jejich velký měrný povrch. Sorpce látek na nosiče s nanostrukturou je jednou z možností využití materiálu v transportních soustavách využívajících strategie přímého doručování, u trans - dermálních a trans - mukózních aplikací. Strukturální vlastnosti nosiče, povrchové i vnitřní, a způsob uchycení léčivé látky mohou zajistit řízené uvolňování léčivé látky.

V rámci rozvíjející se spolupráce na Katedře epidemiologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Hradci Králové bude u modelového systému polymerních nanočástic sledována míra sorpce a kinetika uvolnění ovalbuminu pomocí technik analytické chemie zahrnujících protein nespecifické metody - spektrofotometrické a elektromigrační.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Nosičové systémy - drug delivery systems

K cílenému podávání léčiv se využívá transportních a aplikačních soustav neboli drug delivery systems (DDSs). Principem cílené aplikace je distribuce léčivé látky transportními nosiči na základě napodobení biochemických signálů organismu, kde se využívá specifických vlastností cílových buněk. Pomocí DDS systémů probíhá transport komplexů nosič-lék pouze do postiženého místa tak, aby léčivo působilo pouze v transportním cíli a nemělo negativní vliv na okolní zdravé buňky. [2; 3] Konvenční podávání léčiv bez záměrného cílení na orgán je často doprovázeno systémovými vedlejšími účinky, které jsou způsobeny především nespecifickou biologickou distribucí a nekontrolovatelnými uvolňovacími charakteristikami léčiva. V porovnání s konvenčními způsoby léčby, cílené doručování snižuje frekvenci podávání léčiva (udržením léčivé látky v cílových tkáních/orgánech po delší časový úsek) a zároveň zvyšuje jejich specifitu a biologickou dostupnost. Dalším důvodem pro vývoj terapeutik ve spojení s nosiči je zvýšení jejich stability, rozpustnosti, zvýšení ochrany před degradací nebo předčasnou exkrecí a omezení vzniku rezistence. [2; 4] V ideálním případě by se měla léčivá látka aktivovat až v cílovém místě transportu a následně po dosažení maximálního léčebného účinku se zcela vyloučit včetně nosiče. [2] Nosiče pro DDS systémy jsou vyráběny z přírodních nebo syntetických materiálů kontrolovanými postupy, které umožňují zhotovit materiál na míru pro určité biologické aplikace. [3] Látky vázané na transportní nosiče nemusí být vždy pouze léčiva, tj. je možné na povrch nosiče navázat také sondy, enzymy, růstové faktory, protilátky nebo buňky a vakcinační antigeny. [1; 5; 6].

DDS lze rozdělit do čtyř různých kategorií: difúzně řízené systémy, chemicky řízené systémy, systémy aktivované rozpouštědly a magneticky řízené systémy. Shrnutí druhů DDS a jejich mechanismy kontroly uvolňování léku jsou uvedeny v tabulce č. 1. [3; 4; 7; 8; 9]

Tab.č. 1: Druhy DDS a mechanismy kontroly uvolňování léků. Převzato a upraveno z [3]

<b>DDS typ</b>	<b>Princip kontroly uvolňování léku</b>
<b>Difúzně řízené systémy</b>	Difúze přes membránu nebo přes polymer
<b>Chemicky řízené systémy</b>	Hydrolýza nebo enzymatické štěpení volných skupin a difúze přes polymer nebo biodegradace a eroze polymeru
<b>Systémy aktivované rozpouštědly</b>	Osmóza vody přes polopropustnou membránu nebo sorpce vody do polymeru
<b>Magneticky řízené systémy</b>	Vnější magnetické pole a dynamická síla krevního oběhu

Difúzně řízené systémy, jak už sám název napovídá, kontrolují uvolňování léku pomocí difúze. Difúze léčiva může probíhat přes membránu nebo přes samotný polymer v závislosti na tom, jaká imobilizační technika byla k zachycení léčiva použita. [3; 10; 8]

Do chemicky řízených systémů řadíme uvolňování léčiva na základě degradace polymerního systému nebo specifického konjugovaného komplexu nosič-léčivo. K uvolnění léčiva se využívá přirozených degradačních vlastností polymerů. Materiály v prostředí lidského organismu podléhají degradaci a erozi tj. dojde k porušení celistvosti matrix a následnému uvolnění léčiva. [3; 4; 7] Dále se využívá specifické vazby k spojení léčiva a polymerního řetězce, která je v prostředí lidského těla hydrolyticky nebo enzymaticky štěpena. Obvykle tyto komplexy obsahují ještě dopravní systém např. protilátku zajišťující doručení do cílové tkáně. [3]

Systémy aktivované rozpouštědly kontrolují uvolňování léčiv osmózou nebo zvětšením objemu polymeru tzv. bobtnáním. Systémy řízené osmózou se spoléhají na zařízení obsahující semipermeabilní membránu, přes kterou rozpouštědlo proudí do komory s léčivem. Následně vypuzení léčiva je závislé na zvyšujícím se tlaku uvnitř komory. Systémy řízené změnou velikosti objemu polymerního nosiče jsou vyrobeny z hydrofilních materiálů schopných absorbovat velké množství vody, aniž by docházelo k rozpouštění matrice. Difúze léčiva ven z polymerního nosiče je úměrná množství absorbované vody. [3; 8]

Magneticky řízené systémy kombinují polymery s magnetickými částicemi. Na základě magnetických vlastností může být částice uvnitř těla směřována pomocí vnějšího magnetického pole. Aby bylo možné účinně kontrolovat pohyb částic, musí být velikost magnetického pole větší než hemodynamická síla krevního oběhu. Při aplikaci *in vivo* se používají materiály s vysokými magnetizačními vlastnostmi při pokojové teplotě (kobalt,



nikl, železo), aby se na lidské tělo působilo co nejnižšími hodnotami magnetizačního pole. Tento typ systémů se zejména využívá k léčbě rakoviny. [3; 8; 11] V následujících kapitolách budou probrány nosiče používané v nosičových systémech, a jejich vlastnosti.

## **1.2 Biokompatibilní materiály**

Biokompatibilní látka je látka, která je schopna snášenlivosti vůči živé hmotě. Biomateriály jsou navrhovány tak, aby interagovaly s buňkami, tkáněmi a tělními tekutinami v extra či intracelulárním prostoru a následně v různých formách např. jako dočasné mechanické opory, implantáty či katétry, nahrazovaly tkáň narušené nemocemi či jinými traumaty. [12] Novější definice charakterizuje biomateriály jako materiály určené k propojení s biologickými systémy za účelem vyhodnocování, léčby, augmentace či nahrazení jakékoliv tkáň nebo funkce těla. [13] Při vývoji nových biokompatibilních látek je nutné spojit poznatky z materiálového inženýrství a lékařství. Z pohledu materiálního inženýra jsou důležité hlavně fyzikální a mechanické vlastnosti materiálu zahrnující zejména pevnost, pružnost, stabilitu a další konstrukční vlastnosti. Následně je vyvinutý materiál svěřen do rukou lékaře, který provede klinické studie a testy podle nichž posoudí, zda je materiál vhodným kandidátem pro použití v proměnlivém biologickém prostředí organismu a je-li tzv. biokompatibilní. [2] Použití biomateriálů schvaluje a posuzuje úřad pro kontrolu potravin a léčiv (SÚKL).

Momentálně se návrh nových biomateriálů zaměřil zejména na napodobování funkcí tkání, které mohou regulovat odpověď hostitele s přesně definovaným způsobem. Nanomateriály vytvořené z biokompatibilních látek jsou populárním tématem moderní medicíny, protože je možné z nich připravit specifické nosiče např. pro léky a následně je využít ke kontrolované léčbě i v takových místech organismu, které jsou běžně jiným lékovým formám nepřístupné. Zároveň biokompatibilní materiály se využívají v chirurgii, dentálním lékařství, ortopedii, estetické medicíně, oftalmologii, tkáňovém inženýrství, regenerativní medicíně a nanomedicíně. [4]

### **1.2.1 Vlastnosti biomateriálů**

Lidské tělo je složitým a komplexním systémem, ve kterém probíhá nespočet chemických reakcí nutných k životaschopnosti organismu. Před vlastním praktickým zavedením biomateriálů do klinické praxe, např. k ošetření ran, je důležité, aby materiál splňoval několik všeobecně známých podmínek. I přesto, že úroveň znalostí lidského těla se každým dnem prohlubují, je velmi těžké naleznout univerzální či ve všech směrech ideální materiál.

Momentálně je reálné vytvořit takové materiály, které se tomuto ideálu alespoň přibližují. Důležitou vlastností materiálu je schopnost biokompatibility.

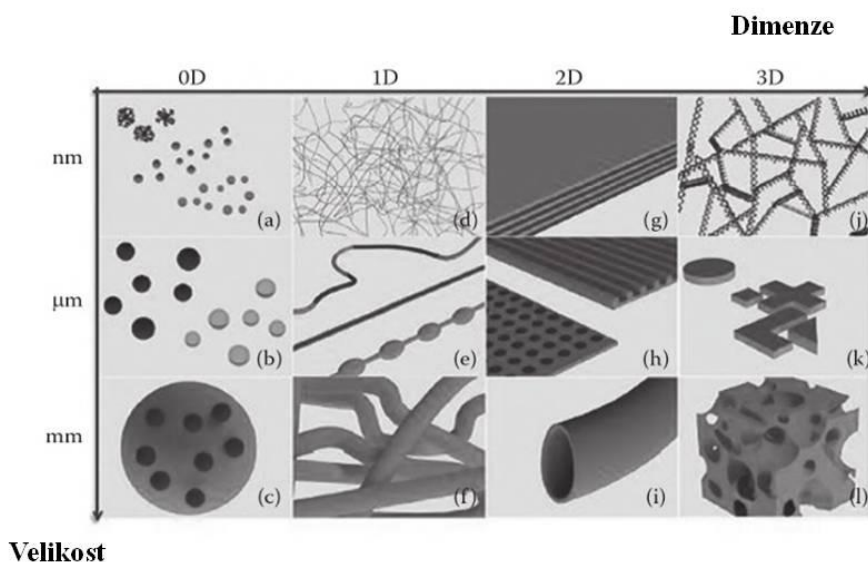
**Biokompatibilita** je schopnost „chytrého“ materiálu interagovat s proměnlivým prostředím organismu tak, aniž by vyvolával obrannou akutní nebo chronickou reakci a zůstal neautogenním vůči okolní tkáni. [13] Kritérium biokompatibility kromě samotného materiálu musí splňovat i jeho degradační molekuly. Biokompatibilní materiály se mohou rozdělit na biotolerantní, bioaktivní a bioresorbovatelné. Biotolerantní materiály jsou vůči okolí neaktivní a tělo materiál přijímá bez imunologické reakce. To znamená, že mezi implantovaným materiálem a živou tkání nevzniká přímá vazba. Naopak mezi bioaktivním materiálem a živou tkání dochází k vytvoření pevného spojení pomocí chemické vazby. Bioresorbovatelné materiály jsou takové materiály, které se po umístění do lidského organismu začnou rozpouštět, resorbovat a postupně nahrazovat živou tkáň. [14] Nekompatibilní materiály mohou způsobit nevratná poškození jako je trvalá destrukce tkání, nekróza nebo fibróza. [9] Další důležitou vlastností je míra biodegradability v organismu.

**Biodegradabilita** neboli rozložitelnost je schopnost látky být odbourána v organismu. Na tomto chemickém procesu se podílí více faktorů, a to: teplota, přítomnost kyslíku, bakterie, plísně, světlo a biologická dostupnost materiálu. V lidském těle se přes chemické reakce a s pomocí mikroorganismů materiál biodegraduje do jiné formy, která by se měla ideálně vyloučit z organismu pryč bez zanechání jakékoliv stopy. Některé používané materiály jsou nebiodegradovatelné, a tak zůstávají v organismu, hromadí se a jsou potenciálními stimulem imunitního systému. [1] Biodegradace nosičů se obvykle testuje ve fosfátovém pufru o pH 7,4 a teplotě 37°C, kdy se sleduje stupeň bobtnání a stupeň eroze materiálu. [15; 3] Zároveň biomateriály by měly být rozpustné v rozpouštědlech, netoxické, mechanicky pevné, chemicky, strukturně a aplikačně všestranné. Neodmyslitelně k dalším podmínkám vývoje nových biomateriálů patří jejich příznivá finanční cena. S čímž se pojí další kritérium, a to schopnost zpracovávat biomateriály s dostupným vybavením a přístroji v laboratoři. Další kritéria se odvíjejí od dalších modifikací nanomateriálů a od způsobu použití a další aplikace. Biokompatibilní látky je možné připravit z polymeru, které pochází přírodních materiálů nebo z materiálů, které jsou uměle syntetizovány.

### 1.2.2 Polymery

Primární surovinou pro výrobu vláken jsou sacharidy (glukosa, sacharóza, celulóza, kukuřičný škrob) a bílkoviny získané z mléka, sóji, kukuřice nebo podzemnice olejné.

Velikost polymerů se pohybuje od 1 do 100 nm, avšak pro účely řízeného doručování léčiv je rozměr proměnlivý. Rozměr nanomateriálů je obvykle 50 - 500 nm. Velikost nanomateriálů ovlivňuje způsob podání léčiva, které také může změnit jeho účinnost. Přehled velikosti a struktury nanomateriálů je uveden na obrázku č. 1. Nejdůležitějšími parametry nanočástic a nanovláken je jejich velikost a osud v organismu. Klasifikační systém rozděluje nanomateriály do čtyř skupin: I. biodegradovatelné nad 100 nm, II. nebiodegradovatelné nad 100 nm, III. biodegradovatelné pod 100 nm a IV. nebiodegradovatelné pod 100 nm. [1] Nanomateriály lze také rozdělit podle jejich chemické povahy a fyzikálních vlastností na kovové materiály, polovodivé materiály, izolátory, sloučeniny odvozené od uhlíku, magnetické nanočástice a materiály odvozené od biomolekul.



Obr. č. 1: Přehled biomateriálů: (a-c) částice se sférickým charakterem o velikost nano- (a), mikro- (b) a větší makro- rozměrů (c). (d-f) 1-D struktury o velikostech nano-, micro- a macro- (nanovlákná, vlákna) (g - i) 2-D struktury využívané jako tenké filmy (g), mikrostrukturální (h) či makrostrukturální substráty (h). (j - l) 3-D struktury využívané jako nanofibrilární hydrogely (j) mikroskopické tkáně využívané jako stavební podpory (k) nebo jako pórovité scaffoldy (l). Převzato a upraveno podle [12]

### 1.2.2.1 Přírodní materiály

Přírodní materiály jsou většinou nerozpustné ve vodě. Vzhledem k tomu, že polymery se získávají z přírodních zdrojů, mohou být potenciálním zdrojem nečistot (těžké kovy, endotoxiny, proteiny), a proto je kladen velký důraz na čistotu materiálu. [22] Zároveň tyto

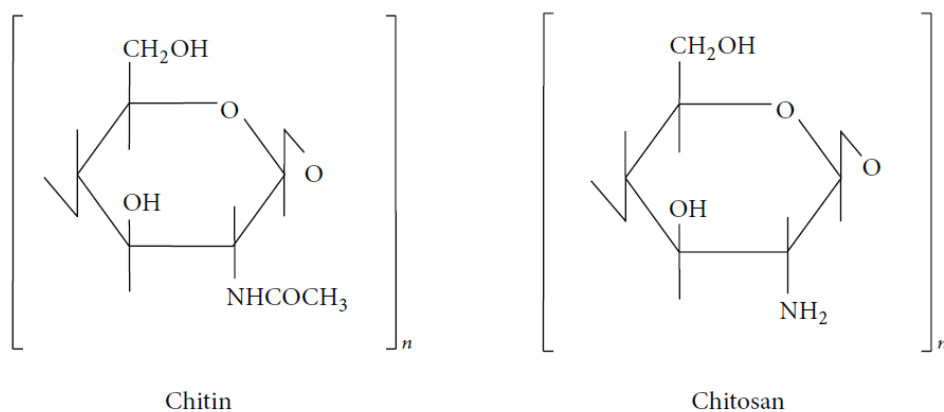
materiály obsahují struktury, které mohou sloužit jako receptory usnadňující buněčnou adhezi, s čímž souvisí možné riziko imunologické odpovědi hostitele. Nejvyužívanějšími přírodními polymery jsou chitin a kolagen. [23; 24]

**Kolagen** je vláknitý protein, který je základním stavebním kamenem všech pojivových tkání tzn., vyskytuje se v kostech, šlachách, chrupavkách, vazivu a extracelulární matrix. Tvoří 25 - 30 % všech proteinů v těle savců a podle výskytu v těle rozlišujeme kolagen I, II, III, IV a V. Díky jeho všudypřítomnosti a dobré biokompatibilitě je hojně využíván při tvorbě nosičů v tkáňovém inženýrství. [16] Kolagen je schopen do určité míry přizpůsobit své molekulární vlastnosti na vnější odpory či síly, které jsou na něj vkládány. Změnou molekulárních vlastností dochází ke spuštění kaskády několika biochemických reakcí, v důsledku kterých je indukována buněčná regenerace a růst tkáně. [13] Kolagen disponuje nejen biokompatibilitou ale také histokompatibilitou, soudržností, kohezními vlastnostmi, vysokou porozitou a schopností kombinace s dalšími materiály. Naopak nevýhodou kolagenu je rychlý poločas rozpadu, nízká mechanická odolnost a nestabilita ve vodném prostředí. Rychlost degradace, porozita a velikost pórů kolagenu může být měřena velkou škálou chemických a fyzikálních metod. Následně tyto vlastnosti mohou být modifikovány a přizpůsobeny podle konkrétních požadavků na uplatnění materiálu. [16]

**Želatina** je přírodní protein vznikající hydrolýzou kolagenu. Díky rozvolnění proteinových fibril je hydrolýza kolagenu nevratná. Želatina je snadno dostupná a je považována za univerzální materiál, protože její degradační produkty vykazují minimální antigenicitu. V závislosti na izoelektrickém bodě želatiny je možná modifikace již během výrobního procesu tak, aby vznikla želatina s pozitivními kyselými nebo negativními bazickými skupinami. Následně ve fyziologickém pH lze vytvořit pomocí elektrostatické interakce komplex nabitá biomolekula a želatina, čehož se využívá zejména v cíleném doručování léčiv či vytváření scaffoldů. [17; 18] Želatina byla úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (SÚKL) uznána všeobecně bezpečným materiálem. [17]

**Chitosan** vzniká hydrolytickým štěpením acetylové skupiny chitinu v alkalickém prostředí. Chitin je přirozeně vyskytující se polysacharid a po celulóze je druhým nejrozšířenějším polysacharidem v přírodě. Vyskytuje se zejména v cytoskeletu korýšů, měkkýšů a hmyzu. Chitosan je lineární a hydrofilní molekula, která se skládá z jednotek glukosaminu a N-acetylglukosaminu. [19] Jedná se o polysacharid s nízkou molekulovou hmotností pohybující se od 100 do 500 kDa. [20] Na základě stupně acetylace molekuly polysacharidu je možné

rozlišit, zda se jedná o chitosan či chitin. [19] Chemická struktura chitosanu a chitinu je znázorněna na obrázku č. 1. Důležitým rysem chitosanu, zvláště když je formulován ve formě částic a podáván parenterálně nebo trans - mukózně, je to, že může být odebrán a poté zpracován antigenem prezentující buňkou, což je účinek, který iniciuje imunitní odpověď. [5; 6] Materiály tvořené chitosanem jsou biokompatibilní, biodegradabilní, netoxické a na základě změny pH a teploty jsou schopny změnit svou strukturu. [19] Zároveň je chitosan schopen vázat kovové ionty, snižuje hodnoty cholesterolu, působí jako antioxidant, má antifungicidní a antibakteriální účinky proti širokému spektru mikroorganismů. Za tyto unikátní vlastnosti chitosanu je zodpovědná volná aminová skupina na  $\beta$ -uhlíku, která poskytuje molekule velký potenciál k využití v širokém rozpětí biotechnologií, např. v cíleném doručování léčiv, buněčném a tkáňovém inženýrství, ale také v potravinářství či zemědělství. [20] Polymerní materiály složené z chitosanu lze formovat do vláken, filmů, gelů či nanomateriálů. [25]



Obr. 2: Chemická struktura chitosanu a chitinu. Převzato z [20]

**Celulóza** je nejhojnějším zastoupeným organickým polymerem na planetě. Je součástí buněčných stěn rostlin, řas, hub a bakteriálních biofilmů. Skládá se z několika stovek monosacharidových jednotek glukózy a tvoří tak lineární polysacharid, který je biokompatibilní a pevnou složkou buněčných membrán. Většina živočichů, včetně člověka, nedisponuje enzymy, které by rozštěpily glykosidickou vazbu mezi jednotlivými jednotkami glukózy, a nedokáže tak celulózu rozložit. Celulóza je nerozpustná ve vodě. Na základě těchto

vlastností se zdá slibným materiálem pro regenerativní medicínu. Nicméně zatím její aplikace se doposud dostala jen na předklinické a klinické studie. [21]

**Alginát** je polysacharid vyskytující se ve značném množství v buněčných stěnách hnědých řas či jako polysacharidový produkt bakterií čeledí *Azotobacter* a *Pseudomonas*. [21] Alginát je biokompatibilní, netoxický, minimálně imunogenní, finančně přijatelný a snadno tvoří gely po přidání dvojmocných kovů. Alginát je u savců nedegradovatelný, protože postrádají enzym algináza, který degraduje polymerní řetězce. Jedinou možnou degradací alginátu je jeho oxidace, tj. uvolnění dvojmocných kationtů a rozpuštění gelu. Při rozpuštění gelu je molekulová hmotnost většiny fragmentů větší než je práh ledvinné clearance, a proto s velkou pravděpodobností alginát není úplně odstraněn z organismu. [22] Alginátové hydrogely lze připravit různými způsoby zesílení a jejich strukturní podobnost s živými tkáněmi umožňuje široké využití. Příkladem mohou být alginátové obvazy, které jsou vhodné k ošetření ran, neboť udržují fyziologické vlhké prostředí, minimalizují výskyt bakteriální infekce a napomáhají procesu hojení. [13] Tyto obvazy se vytvářejí iontovým zesílením alginátu s ionty vápníku za vzniku gelu a následným zpracováním do lyofilizovaných porézních archů. Alginát se rovněž využívá v kombinaci s chitosanem v odvětví cíleného doručování léčiv. [22] SÚKL schválila používání těchto přírodních polymerů v obvazech na rány (Comfeel Plus®, Kaltostat®, Askina® Calgitrol Thin), také jako léčiva proti pálení žáhy a refluxu (Gaviscon), vředů nebo k ztrátě hmotnosti. [21; 26; 27]

**Hyaluronová kyselina** (HA) je lineární glykosaminoglykan s velkou molekulovou hmotností, který se přirozeně vyskytuje v mezibuněčné hmotě a je součástí pojivové, epiteliální a nervové tkáně. V těle se vyskytuje také v podobě solí, a proto se v některé literatuře označuje jako hyaluronan. [28] Kyselina hyaluronová je vysoce biokompatibilní a je schopná regulace angiogeneze pomocí stimulace endoteliálních prekursorů buněk k jejich proliferaci a růstu. Zároveň kyselina hyaluronová je schopna citlivě reagovat na změny pH, a proto je velmi perspektivním materiálem v odvětví hojení ran a cíleného doručování léčiv. [29; 30]

### 1.2.2.2 Syntetické materiály

Nejčastějšími biodegradabilními syntetickými polymery jsou kyselina polymlečná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a polyvinyl alkohol (PVA). Složení syntetických polymerů je přesně definováno. Jednotlivé polymery je možné vzájemně kombinovat, a tak vytvořit velké množství kopolymerů s odlišnými vlastnostmi, které určují míru jejich biokompatibility a biodegradability. [31] Jejich degradace probíhá především mechanismem hydrolýzy

nestabilních esterových vazeb v polymerním řetězci. [15] S porovnáním s přírodními polymery tyto materiály vykazují horší adhezi buněk v důsledku nepřítomnosti buněčných receptorů. Výhodou syntetických materiálů je výborná mechanická odolnost.

**Kyselina polymléčná** je lineární, alifatický polyester kyseliny mléčné derivovaný z obnovitelných zdrojů jako je kukuřice, brambory, cukr a jiné zemědělské produkty. PLA je chirální molekula a vyskytuje se ve dvou opticky aktivních izomerech L (PLLA) a D (PDLA). Třetí variantou kyseliny polymléčné je racemát z obou izomerů označovaný jako PDLLA. L-izomer PLA a racemát PDLLA jsou krystalické látky, zatímco PDLA je vždy amorfni. Stupeň krystalizace a reaktivita polymeru je dána i poměrem zastoupení izomerů L a D v molekule kyseliny polymléčné. Na základě odlišných vlastností každého typu PLA se rozlišuje, jaký materiál je na co vhodný. Na příklad materiál z PDLLA se používá při cíleném doručování léčiv na základě schopnosti udržení jednofázové struktury. Materiál z PLLA je vhodný ve tkáňovém inženýrství, kde je zapotřebí dobrých mechanických vlastností. Materiály čistě pouze z PLA při uvedení do provozu vykazují mnoho omezení jako je křehkost, špatná osteoindukce a nekontrolovatelná degradace. Pro oddálení degradace se do molekuly zavádí látky s nízkou molekulovou hmotností např. sorbitol nebo glycerol. Degradací PLA vzniká kyselina mléčná, která se běžně vyskytuje v lidském organismu a snadno se metabolizuje v citrátovém cyklu na vodu a oxid uhličitý. PLA je biokompatibilním materiálem a její metabolity jsou netoxické, a proto její využívání v medicíně bylo schváleno úřadem SÚKL. [32]

**Kyselina polyglykolová** je hydrofilní polyester kyseliny glykolové. PGA je mechanicky odolná, biokompatibilní, netoxická a nerozpustná v organických rozpouštědlech. Zároveň je vysoce biodegradabilní, kdy rychlost degradace oproti ostatním syntetickým polymerům je jedna z nejrychlejších. PGA velmi snadno podléhá hydrolytické degradaci, a proto při použití tohoto materiálu je nutné dodržovat striktní podmínky pro manipulaci. Degradace PGA probíhá ve dvou fázích, kdy nejprve dochází k jednoduchému esterovému štěpení za přítomnosti vody a následně k degradaci krystalických oblastí polymeru. PGA se degraduje na kyselinu glykolovou, která se běžně vyskytuje v lidském organismu a metabolizuje se v citrátovém cyklu. Kyselina glykolová je metabolizována na oxid uhličitý a vodu a je pro organismus přirozeným metabolitem. I přesto ve vysokých koncentracích může způsobit lokální poškození v důsledku zvýšeného okyselení. [33]

**Polyvinylalkohol** je netoxický, ve vodě rozpustný, vysoce krystalický a biokompatibilní polymer. Obecně je PVA snadno dosažitelným materiálem, má relativně nízké výrobní náklady a je vhodným pro tvorbu kopolymerů s přírodními polymery. [34] PVA je nenabitým a relativně hydrofilním materiálem, a proto je vhodný k tvorbě hydrogelů. Na druhou stranu se PVA hůře integruje do živých tkání a má poměrně omezenou biologickou rozložitelnost. PVA byl schválen jako nosič léků proti rakovině prostaty, děložních myomů a endometrióze (Lupron Depot®, Zoladex LA Depot®). [15; 27; 35]

**Polyakrylová kyselina (PAA)** je stabilní polymer, který má díky přítomnosti karboxylových skupin v molekule mírně kyselý charakter. PAA se využívá zejména k tvorbě hydrogelů, do kterých se zabudovávají povrchově aktivní látky a léčiva. [36]

### 1.2.3 Polymerní nanostruktury

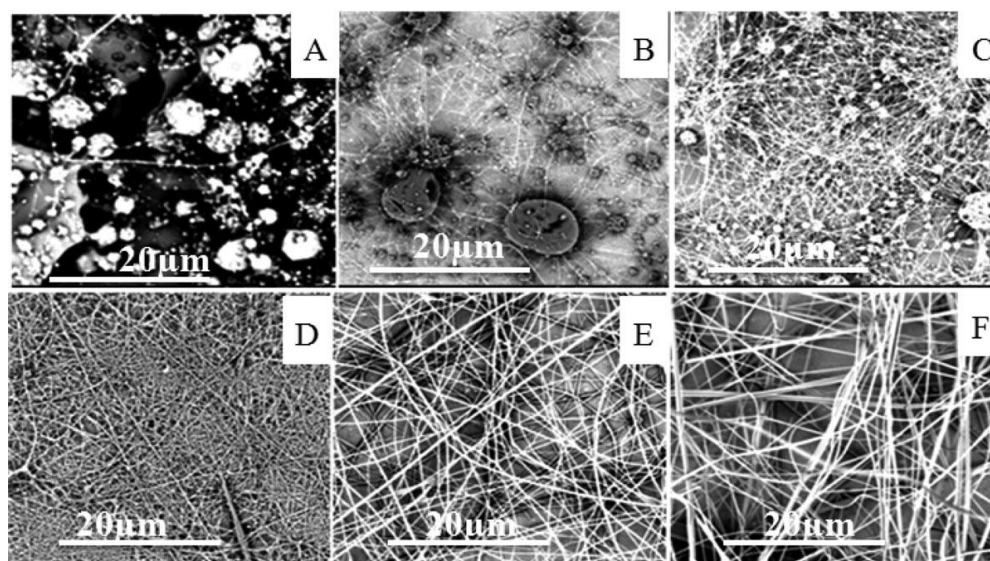
Polymerní nanostruktury lze syntetizovat z výše uvedených polymerů a v závislosti na použití způsobu přípravy nosiče mohou být léčiva zachycena uvnitř nebo připojena k nosné matici polymeru. Výběr materiálu nosiče pro imobilizaci nejrůznějších typů aktivních látek je stěžejním krokem celého procesu. V závislosti na použitém materiálu jsou definovány specifické požadavky. Například materiály používané pro navázání enzymů musí být chemicky, fyzikálně a biologicky stabilní po celý čas imobilizace. Rovněž nesmí být toxický a musí vykazovat mechanickou odolnost. Zároveň velký vliv na volbu materiálu má i cena materiálu. [37] Polymerní nanostruktury jsou nejčastěji připravovány elektrohydrodynamickými (EDH) technikami, které k výrobě vláken a částic využívají elektrostatické síly. Pro výrobu nanovláken a nanočástic se využívá dvou EDH technik, a to electrospinning a electrospraying. [38]

**Electrospinning** (elektrospřádání) je oblíbenou a preferovanou technikou výroby nanovláken, zejména díky jednoduchému provedení, malým nákladům a použitelnosti pro široké spektrum přírodních a syntetických polymerů. Principem vytvoření nanovlákn je vložení silného elektrického potenciálu na polymerní kapalinu (roztok nebo taveninu) v kapiláře. Na povrchu kapičky polymerní kapaliny dochází k nahromadění náboje. Ve chvíli, kdy povrchové napětí kapičky převyšuje odpudivé síly, je vystřelen proud nabitě kapaliny směrem k uzemněné elektrodě. Následně dochází ke stabilizaci, prodloužení, odpaření rozpouštědla a tvorbě vláken. Touto technikou vznikají trojrozměrná nanovlákn s velkým povrchem a otevřenou porézní strukturou podobající se extracelulární matrix. [38; 39]



**Electrospraying** (elektrozprašování) je technika používaná pro výrobu aerosolu nanočástic. Princip vzniku nanočástic je podobný jako u techniky electrospinning. Rozdíl mezi těmito metodami je založen na koncentraci roztoku polymeru. Je-li koncentrace polymeru vysoká, dochází ke stabilizaci a následnému vzniku vlákn. Naopak pokud je koncentrace roztoku nízká, dojde k destabilizaci a vytvoření jemných kapiček nanočástic. [38; 40]

Chitosan pro tvorbu nanovláken a nanočástic těmito technikami je vhodným materiálem, protože jeho slabá bazická povaha a silné intramolekulární vazby mezi hydroxylovou a aminoskupinou ho činí termostabilním a odolným vůči silnému elektrickému potenciálu. Aminová skupina chitosanu je snadno protonovatelná, a tak je chitosan rozpustný ve vodě. Také je rozpustný v organických kyselinách při nízkém pH jako je kyselina mravenčí, vinná, citronová nebo octová. [9] Na obrázku č. 3 jsou snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), které zachycují proces vzniku chitosanových nanočástic a nanovláken v různě koncentrovaných roztocích chitosanu.



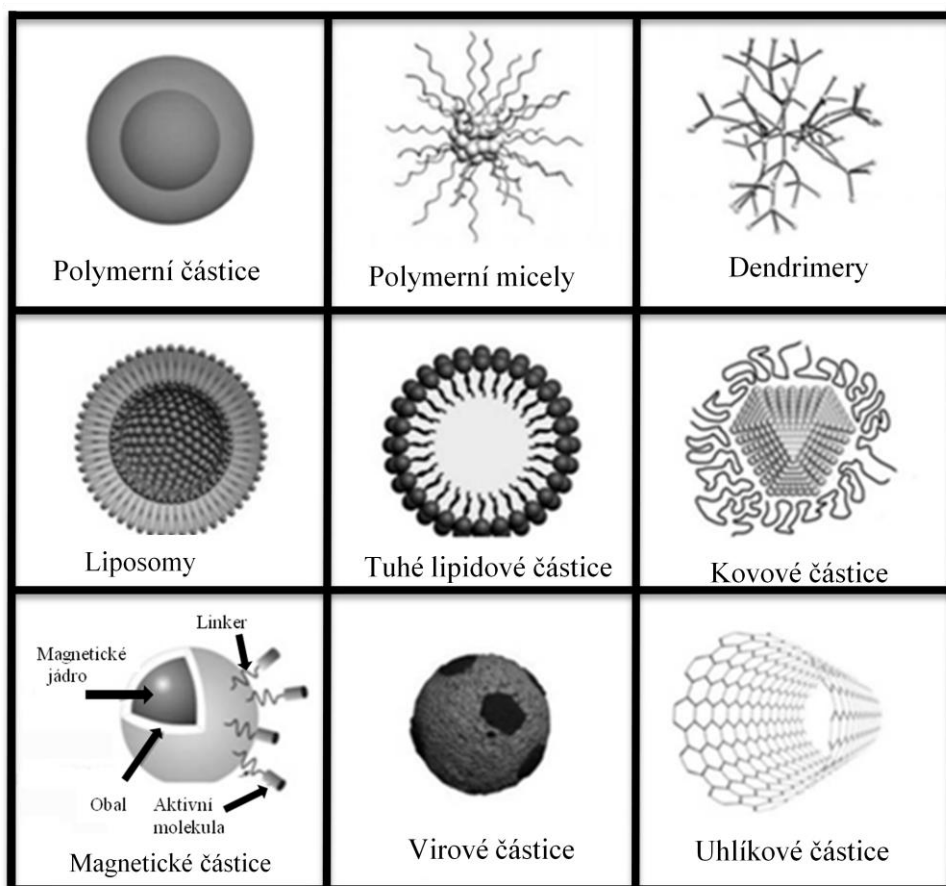
Obr. č. 3: SEM snímky vzniku chitosanových struktur (nanočástic, nanovláken) metodou electrospinning  
Převzato z [41]

Tvar, velikost, morfologii a složení nanostruktur je možné ovlivnit změnou reakčních podmínek výrobního procesu či druhem materiálu.

### 1.2.3.1 Nanočástice

Nanočástice z chitosanu mají podobné, ale optimalizovanější vlastnosti než normální roztok chitosanu, jak bylo potvrzeno ve studii, která srovnávala roztok inzulínu chitosanu a jeho nanočástice, u kterých nanočástice vykazovaly účinnější léčbu při snižování hladiny glukózy v krvi. [9; 42] Nanočástice jsou v poslední době syntetizovány technikou založenou na tvorbě kovalentních nebo iontových vazeb mezi řetězci polymeru pomocí síťového činidla tripolyfostát (TPP). [43] Tento postup přípravy nanočástic nezahrnuje použití organického rozpouštědla nebo vysoké teploty, a proto je vhodný zejména pro tepelně citlivé terapeutické činidla jako jsou proteiny, peptidy, hormony a vakcíny vložené či připevněné do částicových systémů s chitosanem. Tvorba nanočástic může probíhat nejen ze samotného chitosanu, ale i v kombinaci s jeho deriváty. [9]

Nanočástice používané v bioanalytických stanoveních se podle struktury mohou rozdělovat na polymerní micely, dendrimery, liposomy, tuhé lipidové nanočástice, virové nanočástice, fullerény, nanotrubičky, kovové a magnetické nanočástice. Struktury možných polymerních nanočástic je zobrazena na obrázku č. 4.

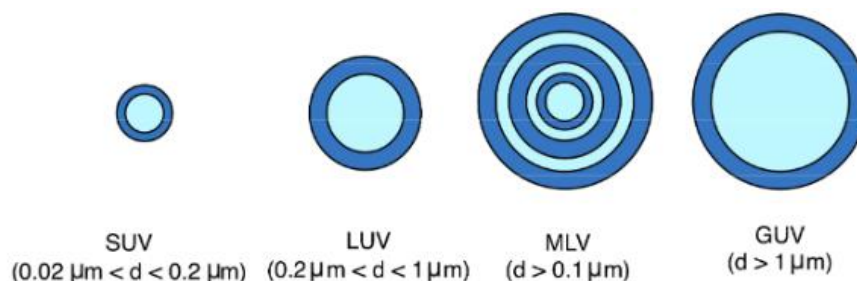


Obr. č. 4: Typy polymerních nanočástic pro drug delivery systémy. Převzato a upraveno podle [44]

Polymerní micely jsou kulovité útvary složené z kopolymerů, které mají hydrofilní a hydrofobní charakter. Podobně jako fosfolipidy tvořící membrány mají polymerní micely schopnost samouspořádání ve vodném roztoku. Hydrofobní část micely slouží jako rezervoár pro léčiva špatně rozpustných ve vodě, zatímco hydrofilní část micely stabilizuje celou molekulu a způsobuje rozpustnost ve vodě. Průměrná velikost micely je 3 - 50 nm. [44]

Dendrimery jsou makromolekuly s pravidelně větvenou strukturou. Dendrimery se skládají z centrálního jádra, ke kterému jsou připojeny opakující se monomerní jednotky vnitřní a vnější vrstvy. Jádro dendrimera určuje tvar a způsob větvení. Uvnitř molekuly dendrimera je poměrně velký prostor, do něhož je možné zapouzdřit aktivní látku a na jeho povrch navázat molekuly nebo receptory pro cílení. Velikost dendrimera se pohybuje do 10 nm. [44]

Liposomy jsou kulovité struktury tvořené fosfolipidovou dvouvrstvou z přírodního nebo syntetického polymeru. Jednotlivé fosfolipidy se ve vodném prostředí samoorganizují, a tak liposom získává důležité fyzikální a chemické vlastnosti (permeabilitu membrány, sterické uspořádání a konstantní rozložení náboje). Průměrná velikost liposomu je 100 nm. [44] Liposomy lze rozdělovat na malé unilamelární vezikuly (0,02 - 0,2  $\mu\text{m}$ ), velké unilamelární vezikuly (0,2 - 1  $\mu\text{m}$ ), obrovské unilamelární vezikuly (> 1  $\mu\text{m}$ ) a multilamelární vezikuly (> 1  $\mu\text{m}$ ). Rozdílné struktury liposomu jsou porovnány na obrázku č. 5. Liposomy jsou slibnými nosiči léčiv, avšak vykazují nízkou stabilitu a transfekční účinnost po intravenózní aplikaci. Zároveň jsou rychle odstraňovány z krevního oběhu prostřednictvím retikuloendoteliárního systému v živých buňkách. Liposomy lze stabilizovat zabudováním hydrofilních skupin do lipidové dvojvrstvy. [3]



Obr. č. 5: Schematické znázornění struktury liposomů v závislosti na jejich velikosti a počtu lamel. Převzato z [3]

Tuhé lipidové nanočástice jsou tvořeny koloidy tuhých triglyceridů. Oproti liposomům jsou stabilnější a vykazují menší toxicitu. Tyto nosiče jsou vhodné zejména pro lipofilní léčiva, která mohou být v povrchové vrstvě, uvnitř jádra nebo rozptýlené v celém objemu nanočástice. [3]. Rozlišujeme tři typy modifikovaných pevných částic: amorfní typ, imperfektní typ a složený typ. Amorfní typ nanočástice obsahuje kombinaci tuhých lipidů a triglyceridů se středně dlouhými řetězci, které udržují lék v amorfním stavu. Imperfektní typ nanočástice obsahuje tuky s různorodým prostorovým uspořádáním, což znesnadňuje uložení léku v amorfních klastrech. Ve složeném typu nanočástice rozpustnost lipofilního léčiva klesá během procesu skladování. Kontinuální snížení rozpustnosti léčiva vede k jeho následnému vyloučení z lipidových nanočástic. Pro zlepšení rozpustnosti léčiva se do složeného typu nanočástic přidává kapalná olejová příměs. [45]

Nanočástice z koloidního zlata jsou komerčně dostupné v mnoha velikostech a jsou dobře detekovatelné i v nízkých koncentracích. Využívají se k zobrazování molekul, transfekci genů a cílené distribuci léčiv. [1]

Magnetické částice jsou tvořeny magnetickým jádrem a ochranným obalem. Polymerní ochranný obal zabraňuje styku se vzorkem a umožňuje úpravu nosiče za účelem cílené separace magnetickým polem. Magnetické částice se aplikují injekčně do krevního oběhu a následně jsou pomocí magnetického pole přivedeny do cílového místa. První klinické studie se uskutečnily již v roce 1996, kdy magnetické částice byly použity k cílení nádorové tkáně. Magnetické částice jsou atraktivními také zejména pro jejich potenciál v zobrazovacích technikách. [3]

Virové nosiče pocházejí z bakterií a rostlin. Viry s velkou účinností infikují a dodávají genetický obsah do hostitelské buňky, a tak jsou potenciálně atraktivní alternativou v oblasti doručování léčiv. [3]

Fullerény a nanotrubičky jsou nosiče tvořené atomy uhlíku. Fullerény jsou obvykle uspořádány do vrstvy pětiúhelníku vzájemně prostorově svinutých nejčastěji do tvaru koule. Nanotrubičky jsou podlouhlé útvary podobné fullerénům. Uhlíkové nosiče se vyznačují ultra lehkou hmotností, vysokou pevností a elektrickou vodivostí. Na základě jejich perfektně organizované struktury jsou vhodnými nosiči v systému dodávání léčiv. [3]

### **1.2.3.2 Nanovlákna**

Nanovlákna mohou být upořádána v plošných nebo v objemových strukturách. Charakteristickým znakem plošných nanovláken je jejich uspořádání. Nanovlákna jsou naskládána přes sebe, téměř nevystupují do okolí a připomínají standardní textilní materiály. V závislosti na orientaci vláken je možné nanovlákněné struktury rozdělit na netkané textilní útvary a tkané textilní útvary. U netkaných textilních nanovláken jsou jednotlivé vlákna nahodile seskupena, naopak u tkaných textilních útvarů je směr vlákna během výrobního procesu usměrněn. Dále mezi plošné struktury lze zařadit lineární vlákna neboli nitě, ale tyto struktury nejsou běžně vyráběny kvůli technologickým obtížím při jejich přípravě. Plošné nanovlákna se využívají jako krycí materiály při hojení ran nebo jako součást separačních přístrojů. Objemové struktury se podobají plošným strukturám s tím rozdílem, že nanovlákna plnohodnotně vystupují i do třetího rozměru. I v tomto případě by bylo možné rozdělit objemové nanovlákna s uspořádanými a neuspořádanými vlákny. Převládá výroba útvarů s náhodným uspořádáním vláken, které připomínají vatu o různé hustotě. Nanovlákna se mohou vyskytovat i v jiných formách, například jako povrchové nánosy nebo roztroušené v matrici keramiky či plastu. [46]

### 1.2.4 Metody fyzikálně-chemické charakterizace biomateriálů

Vzhledem k tomu, že obecně nanomateriály, nosičové systémy a jejich charakterizace je velmi populární tematikou napříč vědními obory, existuje velké množství souhrnných článků na toto téma. Upravený a převzatý přehled instrumentálních technik používaných pro strukturální a fyzikálně chemickou charakterizaci nanomateriálů a nosičových systémů je uveden v tabulce č. 2. V tabulce č. 3 je uveden přehled instrumentálních technik pro charakterizaci komplexu materiál-léčivo.

Tab. č. 2: Přehled metod pro analýzu fyzikálně-chemických vlastností nanovláken, nanočástic a nosičových systémů. Převzato a upraveno z [47; 48; 49]

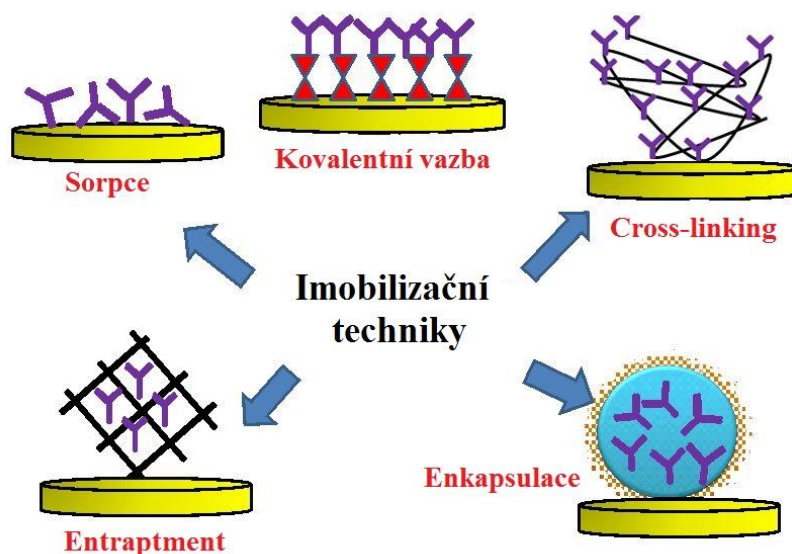
<b>Technika</b>	<b>Analyzovatelné fyzikálně-chemické vlastnosti materiálu</b>
<b>UV-VIS spektroskopie</b>	Velikost materiálu
<b>Dynamický rozptyl světla (DLS)</b>	Hydrodynamické rozložení velikosti materiálu
<b>Zeta potenciál</b>	Stabilita povrchového náboje a struktura materiálu
<b>Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR)</b>	Vlastnosti povrchu materiálu
<b>Spektroskopie nukleární magnetické resonance (NMR)</b>	Velikost (nepřímě), struktura, složení, čistota, konformační změny materiálu
<b>Transmisní elektronová spektrometrie (TEM)</b>	Velikost, tvar, heterogenita, agregace a disperze materiálu
<b>Hmotnostní spektrometrie (MS)</b>	Molekulová hmotnost, složení, struktura a vlastnosti povrchu materiálu (sekundární iont. MS)
<b>Fotoelektronová spektrometrie (XPS)</b>	Elementární a chemické složení povrchu materiálu
<b>Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)</b>	Velikost, tvar, agregace a disperze materiálu
<b>Skenovací tunelová mikroskopie (STM)</b>	Velikost, tvar, struktura, disperze a agregace
<b>Optická skenovací mikroskopie v blízkém poli (NSOM)</b>	Velikost a tvar materiálu
<b>Mikroskopie atomárních sil (AFM)</b>	Velikost, tvar, struktura, sorpce, disperze, agregace a vlastnosti povrchu materiálu
<b>Rengénová krystalografie (RTG)</b>	Velikost, tvar a struktura krystalických materiálů
<b>Elipsometrie</b>	Optické vlastnosti materiálu
<b>BET (N<sub>2</sub> adsorpční izoterma)</b>	Velikost a distribuce pórů materiálu

Tab. č. 3: Přehled metod pro analýzu fyzikálně-chemických vlastností komplexů materiál - léčivo. [47; 48; 49]

<b>Technika</b>	<b>Analyzovatelné fyzikálně-chemické vlastnosti materiál-léčivo</b>
<b>Infračervená spektrometrie (IR)</b>	Analýza funkční skupiny, struktura a konformace materiál-léčivo
<b>Fluorescenční spektroskopie</b>	Stanovení kritické asociační koncentrace komplexu materiál-léčivo, obsah léčiva a <i>in vitro</i> uvolňování léčiva
<b>Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)</b>	Obsah léčiv, <i>in vitro</i> uvolňování léčiva, čistota léčiva
<b>Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)</b>	Fyzikálně-chemický stav a možné interakce materiál- léčivo
<b>Hmotnostní spektrometrie (MS)</b>	Uvolňovací studie komplexu materiál-lečivo

### 1.3 Imobilizační techniky ligandů do nosičových systémů

Nanočástice a nanovláknenné materiály jsou perspektivními systémy pro cílené doručování léčiv zejména díky své rozměrové podobnosti s extracelulární matrix, která při distribuci léčiva hraje velkou roli. [39] Zároveň tyto materiály mají velký povrch vhodný k navázání látek, například: léčiva, sondy, enzymy, proteiny, buňky aj. Molekuly lze na povrch biomateriálů imobilizovat nebo je zabudovat přímo do jejich struktury při výrobním procesu nosiče. [1] Imobilizační techniky lze rozdělit na vratné a nevratné. Mezi vratné imobilizační techniky se řadí adsorpce, afinitní vazba, chelatace a vazba skrze disulfidické můstky. Nevratné imobilizační techniky jsou entrapment, enkapsulace, kovalentní vazba a crosslinking. Na obrázku č. 6 jsou zobrazeny techniky, které se využívají i k imobilizaci enzymů.



Obr. č. 6: Schéma principů imobilizačních technik. Převzato a upraveno podle [50]

### 1.3.1.1 Adsorpce

Nejjednodušší metodou reverzibilní imobilizace je adsorpce. Imobilizace enzymů je založena na vzniku slabé vazby, na které se podílejí vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly, iontové a hydrofobní síly. Tato metoda je snadná a finančně nenáročná, avšak velice citlivá na změnu pH, teploty a iontové síly. Při změně okolních podmínek dochází k nežádoucímu masivnímu uvolnění či úplné desorpci enzymu. [37; 51; 52]

### 1.3.1.2 Afinitní imobilizace

Technika afinitní imobilizace je založena na interakci antigen-protilátka. Nosná matrice se vyrábí specificky pro daný enzym a obsahuje protilátky proti specifickým epitopům antigenu. Metoda je velmi specifická, avšak díky tomu, že se na imobilizaci podílejí protilátky, není ekonomicky výhodná. [37; 51; 53]

### 1.3.1.3 Chelatace

Další technikou je chelatace, kdy na nosič je možné imobilizovat přechodné kovy. Nosič není schopen obsadit všechna koordinační místa kovu a zbývající volná místa lze obsadit ligandy vázajícími se na kovy (histidin, tryptofan, tyrosin, cystein a fenylalanin) a umožnit tak vazbu enzymu. Chelatace se využívá v chromatografických metodách, zejména kvůli snadné regeneraci a pevnosti vazby. [51; 54]



#### **1.3.1.4 Disulfidické můstky**

Často se chybně mezi varianty kovalentní vazby zařazují i interakce realizované skrze disulfidické můstky. Disulfidické můstky poskytují velmi pevnou vazbu. Výhodou vazby je možnost ovlivnění reaktivity thiolové skupiny změnou pH. I přesto, že vazba je pevná, lze ji snadno rozštěpit za poměrně mírných podmínek. Proto jsou disulfidické můstky řazeny k reverzibilním imobilizačním technikám. [37; 52]

#### **1.3.1.5 Kovalentní vazba**

Nejrozšířenější imobilizační technikou je uchycení enzymu pomocí kovalentní vazby. Kovalentní vazba je pevná, stabilní a nevratná. Podstatou vazby je reakce elektrofilních skupin nosiče a neutrofilních skupin proteinu. [51] Aktivita kovalentně vázaného enzymu závisí na velikosti a tvaru nosného materiálu, povaze metody vazby, složení nosného materiálu a specifických podmínkách během vazebné reakce. [55] Při imobilizaci enzymu na nosič je možné zaznamenat pokles jeho katalytické aktivity zejména kvůli změnám v prostorovém uspořádání enzymu. [51] Důležitým faktorem účinnosti enzymu je jeho lokalizace na nosiči. V ideálním případě se enzym nachází na povrchu nosiče a jeho aktivační centrum je ve stálém kontaktu se substrátem. [37]

Takto kovalentně navázané látky na nosiče se zejména uplatňují při lokální slizniční nebo trans-dermální léčbě. Dále kovalentní vazba by mohla být vhodnou variantou pro DDS systémy využívající parentální a gastrointestinální anatomické cesty. Podmínkou pro tuto aplikaci jsou biodegradabilní vlastnosti nosiče, které po doručení na dané místo zajistí rozpad matrice nosiče a uvolnění léčivé látky do okolí. Tato metoda je zřídka aplikována pro imobilizaci buněk, protože činidla používaná pro vznik kovalentní vazby jsou obvykle cytotoxická. [37]

#### **1.3.1.6 Crosslinking**

Crosslinking (tvorba příčné vazby, zesíťování) je nevratná imobilizační metoda, která na rozdíl od ostatních metod nevyžaduje nosič. Existují dva způsoby zesíťování, a to metoda zesíťovaných enzymových agregátů (CLEA; Cross-Linking Enzyme Aggregates) a metoda zesíťovaných enzymových krystalů (CLEC; Cross-Linking Enzyme Crystals). Obě tyto metody používají jako zesíťovací činidlo glutaraldehyd, který je levný, stabilní a snadno dostupný. Glutaraldehyd je pro zesíťování některých enzymů nevhodný. V takových případech se k zesíťování používají alternativní činidla například diazoniové soli, dextran

nebo BSA. Nevýhoda obou metod je možnost vzniku příliš velkých agregátů či krystalů enzymu. [37; 51; 56]

### **1.3.1.7 Entrapment**

Entrapment (zapouzdření) je nevratná imobilizační technika, kde jsou imobilizované částice nebo buňky zachyceny uvnitř vláken nebo matrice nosiče. Je to snadná, rychlá a levná technika. U této metody je důležitý výběr materiálu, ze kterého je nosič vyroben, a to kvůli množství a velikosti pórů. Nejčastěji se pro zapouzdření biokatalyzátorů využívá alginát, kolagen nebo želatina. Nevýhodou tohoto typu imobilizace jsou náklady na imobilizaci, omezená difúze, možná deaktivace enzymu během imobilizace a omezená kapacita matrice nosiče. [37; 51] Příkladem je zapouzdření membránového proteinu hemaglutininu z viru *Influenzae* do chitosanových nanočástic, které na myších modelech prokázaly snížení morbiditu a ochranu proti viru chřipky. [57] Dalším příkladem je experiment s enkapsulací chemoterapeutické látky Mitomicyn C do chitosanových nanočástic má potenciál v dodávání léků citlivých na pH a pozitivní účinek na léčbu rakoviny močového měchýře. [11]

### **1.3.1.8 Enkapsulace**

Enkapsulace je také jednou z nevratných imobilizačních technik a je podobná metodě zapouzdření (entrapment). Enzym je ve své nativní formě obalen částečně propustnou membránou, která umožňuje prostup okolního prostředí do nitra kapsule a zároveň chrání enzym před nežádoucími vlivy. Enzym může být zapouzdřen jednou vrstvou nebo mezi dvěma odlišnými vrstvami materiálu. [37; 51] Pro jednovrstvou enkapsulaci se používá chitosan, alginát nebo celulóza. [5; 37]. Zapouzdření enzymu mezi dvěma vrstvami nanovláken je také velmi oblíbenou technikou a kombinují se materiály z chitosanu, želatiny, polyvinylacetátu a kyseliny borité. [51] Výhodou enkapsulace je, že tato metoda imobilizace nevyžaduje žádnou chemickou modifikaci nosiče. Stejně jako u metody zapouzdření i zde je důležitým parametrem účinnost matrice tzn. velikost pórů. [37] Enkapsulace je také vhodná pro dopravu vakcín, kde toto zapouzdření slouží jako nosné vehikulum, a tím zvyšuje účinnost vakcíny. Příkladem zvýšení účinku vakcíny je zapouzdření rekombinantní vakcíny proti hepatitidě typu B do chitosanových nanočástic potažených alginátem. Výsledky z tohoto experimentu prokázaly, že tento systém má velký potenciál pro orální očkování. [6]

## 1.4 Cílené doručování léčiv

Distribucí léčiva v organismu se podrobně zabývá vědní obor farmakologie, který popisuje vztah farmakokinetických dějů v souvislosti se zákonitostmi pohybu léčiva v organismu, tj. distribuce, metabolismus a exkrece léčiva. Charakter distribuce léčiva je ovlivněn fyzikálně-chemickými vlastnostmi, rychlostí unášení léčiva krví nebo mechanismy překonávání bariér oddělující kompartmenty organismu a zahrnuje děje jako je filtrace, pinocytóza, aktivní transport nosičem a usnadněná nebo volná difúze. Znalost farmakokinetiky a farmodynamiky léčiva je důležitým parametrem pro optimalizaci dávky, časového rozpětí mezi dávkami, lékové formy a cesty podávání. [3]

U nosičových systémů jsou dále zcela zásadní vlastnosti použitého nosiče léčiva zahrnující formu, chemické složení, stupeň degradace. Možné anatomické cesty pro cílené doručování léčiv jsou znázorněny v tabulce č. 4.

Tab. č. 4: Porovnání metodik poskytování léčiv v závislosti na nástupu terapeutického účinku.

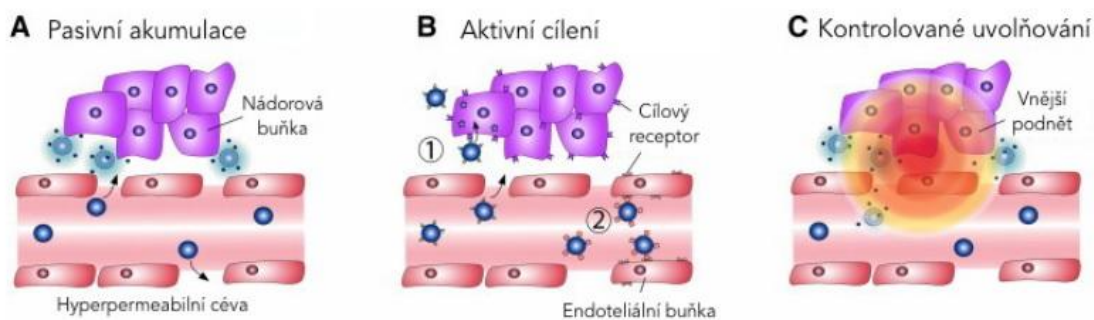
[3]

Anatomické cesty pro cílené doručování léčiv	Nástup terapeutického účinku
<b>Gastrointestinální systém</b>	
Orálně	30-90 min
Rektálně	5-30 min
<b>Parenterální systém</b>	
Subkutánní injekce	15-30 min
Intramuskulární injekce	10-20 min
Intravenózní injekce	30-60 sec
Intra-arteriální injekce	15-60 sec
Trans-mukózní	15-30 min
Trans-nasální	15-30 min
Plicní inhalace	2-3 min
Trans-dermální	minuty až hodiny

Cílené doručování léčiv může probíhat přímým transportem, pasivním cílením nebo aktivním cílením.

### 1.4.1 Strategie cíleného doručování léčiv

Jak bylo uvedeno výše, zaměřením léčiva do určité oblasti se zvýší jeho terapeutická účinnost a zároveň se sníží toxicita léčiva v důsledku možnosti podávání nižších dávek léčivé látky. Aby mohlo být dosaženo těchto podmínek, existují tři strategie cíleného doručování. Nejjednodušší strategií cíleného doručování léčiv je **přímý transport**, kdy léčivo navázané na polymerní nosič je injekčně aplikováno přímo do postiženého místa. Nosič nejen že umožňuje řízené uvolňování léčiva, ale také zajistí jeho setrvání v místě aplikace. [58] Další strategií je **pasivně cílený transport** neboli pasivní akumulace. Pasivní akumulace léčiv využívá fenoménu „zvýšené permeability a retence“ (EPR, *enhanced permeability and retention effect*), který byl poprvé popsán Dr. Maedy na myších nádorech v roce 1986. [58; 59] Pasivní cílení nutně nevyžaduje připojení specifických ligandů, které by komplex léčivo-nosič dopravilo do cílového místa, protože využívá přirozené farmokinetiky a biodistribuce nanoléčiv. Nicméně systémy nanoléčiv fungující pouze na EPR efektu (např. Myocet [7]) jsou neselektivně vstřebávány i zdravými buňkami a nejsou schopny potlačit vedlejší účinky. Proto v případě chemoterapie je vhodné zkombinovat tento fenomén s dalšími možnostmi cíleného transportu. [58; 61] Strategie **aktivního cílení** léčiva je založena na upevnění směrovací části molekuly na nosič. Tím se zvýší afinita a selektivita komplexu léčivo-nosič při vychytávání specifickou tkání, buňkou nebo receptorem. Jako ligandy se zejména používají monoklonální protilátky, které nejen že zvyšují efektivitu doručování léčiva a také mnohdy chrání komplex před enzymatickou degradací. Dalšími ligandy mohou být sacharidy, peptidy, oligonukleotidy a jiné specifické receptory pro rychle množící se tkáň. Mimo tyto ligandy se mohou na nosiče navázat jednotky, jež zajišťují uvolnění léčiva na základě vnitřního nebo vnějšího stimulu. Vnější stimul obvykle představuje fyzikální působení na nanostrukturu ve formě světla, tepla, ultrazvukových nebo magnetický vln. Naopak vnitřní stimuly jsou založeny na fyziologických a patologických změnách v organismu jako jsou např. změny pH, redoxního potenciálu nebo iontové síly v tkáních. [58; 61] Schematické znázornění strategií pro cílený transport léčiv je popsán na obrázku č. 7.



Obr. č. 7: Schéma strategií pro cílený transport léčiv. (A) - Průnik nanočástic v důsledku EPR fenoménu skrze hyperpermeabilní cévu vede k pasivní akumulaci léčiva v nádorové buňce. (B) - Aktivní cílení na rakovinové buňky (1) nebo endotelové buňky (2) ligandem funkcionalizovanou nanostrukturou. (C) - Pomocí vnitřního nebo vnějšího stimulu dochází k aktivaci nanostruktury kontrolovaného uvolňování. Převzato a upraveno podle [61]

Vybrané způsoby doručování nosičových systémů s léčivý jsou probrány v následujících kapitolách.

#### 1.4.1.1 Doručování léčiv orální cestou

Orální podání léčiv je nejvíce preferovaným způsobem doručování léčiv. Při podávání léčiv *per os* je farmokinetika léčiv ovlivněna proměnlivým pH napříč gastrointestinálním traktem, množstvím potravy a střevních tekutin, mikrobiomem, mukozní integritou střevní sliznice a také činností jater. [62] Doručování léčiv orální cestou se potýká s nízkou stabilitou v gastrointestinálním traktu a špatnou prostupností léčiva přes epitel střevní sliznice. Variantou zvýšení odolnosti léčiva proti kyselému prostředí žaludku je obalení léčiva pH-stabilním polymerem či deriváty celulózy nebo alginátovými gely. [63] Tento způsob podání je bezpečnější a méně invazivní. Aktuálně probíhají intenzivní výzkumy, které by například umožnily orální aplikaci inzulínu ekapsulovaného v lecithin/chitosan obalu. [64]

#### 1.4.1.2 Parenterální doručování léčiv

Parenterální způsob podávání léčiv je takový způsob, při kterém léčivo neprochází skrze trávicí trakt a vyhne se tedy kyselému prostředí v žaludku a jaternímu zpracování léčiva. V současnosti existují tři biodegradabilní polymerní systémy k parenterální aplikaci léčiv, které jsou podávány ve formě implantátu nebo injekčně: tuhé implantáty, částicové systémy a implantáty *in situ*. Výroba tuhých materiálů je snadno kontrolovatelný a reprodukovatelný

proces. Nevýhodou tuhých implantátů je jejich aplikace, která vždy zahrnuje chirurgický zákrok. Naopak výroba částicových systémů je často složitý, zdlouhavý, ekonomicky náročný a obtížně kontrolovatelný proces. Částicové systémy jsou aplikovány injekčně a v případě nežádoucí reakce není možné aplikovaný přípravek odstranit z organismu. Implantáty *in situ* se skládají z biodegradabilního polymeru a léčiva, rozpuštěných v biokompatibilním rozpouštědle a do organismu se aplikují taktéž injekčně. Po kontaktu s tělními tekutinami polymer degraduje a dochází k postupnému uvolňování léčiva do okolí. [15]

Trans-mukózní způsob podávání se zejména osvědčilo při vakcinaci. Vzhledem k tomu, že převážná většina patogenů do organismu hostitele proniká skrze sliznice, je (oproti intramuskulární nebo subkutánní aplikaci vakcíny) efektivnější indukovat imunitu trans-mukózně. Dochází tak k podněcení systémové i lokální imunity přímo v první obranné linii organismu. Příkladem mohou být podjazykové vakcíny Grazax a Sublivax Fix Birch k léčbě alergické hypersenzitivity nebo nosní vakcíny, které se např. používají k vytvoření imunity proti virům chřipky. [27; 65] Řada vakcinačních systémů je ve fázi vývoje. [5]

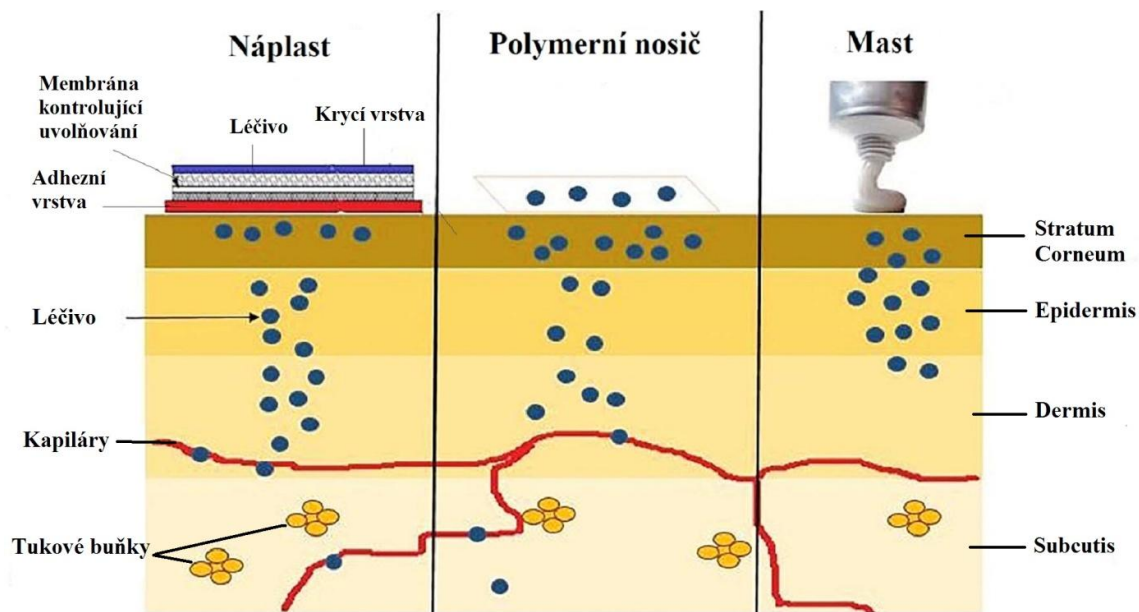
### **1.4.1.3 Trans-dermální doručování léčiv**

Kůže je snadno přístupným orgánem těla a působí jako bariéra proti mikroorganismům a makromolekulám. Bariérou mezi vnějším prostředím a organismem je 10  $\mu\text{m}$  tlustá svrchní část pokožky *Stratum corneum*, která je tvořena z mrtvých a vysoce keratinizovaných buněk. I přesto, že transport léků přes kůži je obtížný, je kůže považována za důležitou cestu podávání léků jak pro lokální tak pro systémové účinky. Účinnost terapie závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva, jakož i na schopnosti systému přilnout k pokožce během terapie, aby se podpořilo pronikání léku přes kožní bariéru. [66] Dermální prostup léčiva je limitován velikostí a lipofilitou. Z fyzikálně-chemického hlediska by léčivo mělo mít velikost do 1000 Da, afinitu k lipofilní a hydrofilní fázi bez extrémních dělicích vlastností, nízký bod tání a krátký poločas rozpadu. [10] Avšak obvyklé formulace farmaceutických přípravků tyto podmínky nespĺňují a mají určitá omezení a to již výše zmíněnou špatnou přilnavost k pokožce, dále špatnou propustnost nebo dráždivost pacientovy pokožky. [10; 66] Ideální vlastnosti léčiva jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Ta. č. 5: Ideální vlastnosti léčiva pro transdermální drug delivery systém. Upraveno a převzato podle [66]

<b>Fyzikální parametry</b>	<b>Vlastnosti</b>
<b>Dávka</b>	< 10mg/den
<b>Poločas rozpadu</b>	10h a méně
<b>Molekulová hmotnost</b>	< 500 Da
<b>Rozdělovací koeficient (oktanol/voda)</b>	1 - 3
<b>Kožní reakce</b>	nedráždivá
<b>Orální biologická dostupnost</b>	nízká

Léčiva mohou být do kůže vpravovány náplastmi, mastmi nebo pomocí polymerních nosičů. Obrázek č. 8 znázorňuje tyto typy transdermálních systémů a rozdíl v absorpci léčiva. Náplasti mají mnoho nevýhod, zejména dráždí kůži, obtížně se aplikují na zakřivené plochy a jejich odstranění doprovází bolest. Tyto nedostatky částečně překonávají masti nebo krémy, avšak nezaručují trvalý kontakt s povrchem pokožky a snadno dojde k jejich otření oděvem. V případě mastí je nutná opakovaná aplikace. [66] Příkladem klinicky používané masti je Iruxol Mono s obsahem enzymu kolagenáza z bakterie *Clostridium histololyticum*, využívající se k enzymatickému čištění otevřených ran nebo dekubitů. [27] Systémy tvořené polymerními nosiči na povrchu pokožky po odpaření rozpouštědla vytváří film. Vytvořený film může být buď pevný polymerní materiál působící jako matrice pro uvolňování léčiva na kůži nebo kapalný, jež se rychle vstřebá do *Stratum corneum*. [66]



Obr. č. 8: Porovnání transdermálního průniku léčiva z náplasti, polymerního nosiče a masti. Převzato a upraveno podle [66]

## 1.5 Metody analytické chemie využívané ke stanovení proteinu

### 1.5.1 Protein nesespecifické metody

**Přímá spektrofotometrie** umožňuje stanovit koncentraci čisté bílkoviny bez použití standardu. Absorbance bílkoviny se měří při dvou vlnových délkách; a to při 280 nm a 260 nm. Při 280 nm absorbují aromatické aminokyseliny (tyrosin, tryptofan, fenylalanin). Výsledky měření může ovlivňovat přítomnost nukleových kyselin ve vzorku, jejichž absorpční maximum je při 260 nm. Proměřením vzorku při obou vlnových délkách lze eliminovat interferenci nukleotidů. Výhodou přímé spektrofotometrie je její nedestruktivní charakter a možnost použití vzorku k dalším analýzám. Výpočet množství sorbovaného proteinu je určena podle vztahu [67]:

$$\frac{A_{280 \text{ nm}}}{\text{extinkční koeficient}} \times 10 \text{ mg/ml} \quad (1)$$

Mezi další spektrofotometrické metody řadíme Biuretovu metodu, Lowryho metodu, Bicinchoninovou metodu (BCA) a metodu dle Bradfordové. Všechny tyto metody mají destruktivní charakter a vzorek nelze dále analyzovat.

**Biuretova metoda** je založena na reakci Biuretova činidla (obsahující  $\text{Cu}^{2+}$  ionty) s proteinem v alkalickém prostředí. Sloučeniny, které obsahují 2 a více peptidových vazeb poskytují s měďnatými kationty fialový komplex. Vzniklý chelátový komplex je proměřen



spektrofotometricky při 545 nm a intenzita zbarvení je téměř lineárně úměrná koncentraci bílkoviny ve vzorku. I přesto, že detekční rozmezí celkové bílkoviny se pohybuje od 5 - 160 mg/ml, je Biuretova reakce často využívanou metodou v klinické praxi. [68] Vylepšením málo citlivé Biuretovy reakce je **Lowryho metoda**. Metoda je založena na reakci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů s peptidickou vazbou v alkalickém prostředí a po přidání Folin-Ciocalteauova činidla, které obsahuje kyselinu fosfowolframovou a fosfomolybdenovou, dochází k redukci aromatických zbytků aminokyselin a roztok se zbarví modře. Vzniklé zbarvení je možné spektrofotometricky vyhodnotit při 200 nm. Citlivost detekce bílkoviny je 5-1500  $\mu\text{g/ml}$ . [69; 70] Další modifikací Biuretovy metody je **Bicinchoninová metoda**. Principem detekce celkové bílkoviny ve vzorku je kombinace redukce iontů  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$  v alkalickém prostředí a následné reakci  $\text{Cu}^+$  iontů s reagensy obsahující bicinchoninovou kyselinu, kdy dvě molekuly BCA reagují s jednou molekulou měďného iontu. Vzniklý komplex vykazuje silnou absorpenci při 562 nm, která je téměř lineární v širokém rozsahu koncentrace proteinu od 20 - 2000  $\mu\text{g/ml}$ . Látky s redukčními vlastnostmi (DDT, kyselina askorbová) a chelátory (EDTA) interferují s kyselinou bicinchoninovou a mohou navyšovat absorpenci. Výhodu BCA testu je rychlost a jednoduchost provedení. [70; 71] **Metoda dle Bradfordové** využívá posunu absorpance barviva Coomassie Brilliant Blue v kyselém prostředí, které se naváže na aromatické aminokyselinové zbytky v bílkovinách. V důsledku změny barvy z hnědé na modrou dojde k posunutí absorpčního maxima barviva z 465 nm na 595 nm. Barevná odezva není lineární a je nutné při každém novém stanovení sestavit standardní kalibrační křivku. Absorbanci mohou falešně navyšovat detergenty (TWEEN, SDS). Rozsah stanovení koncentrace proteinu je 2 - 1500  $\mu\text{g/ml}$ . [70; 72]

**Elektroforéza** v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) je metoda využívaná k separaci bílkovin gelem v elektrickém poli na základě jejich molekulové hmotnosti. Pohyblivost bílkoviny se liší délkou polypeptidického řetězce a molekulární hmotností. Polyakrylamidový gel je vhodný pro separaci bílkovin o molekulární velikosti 5 - 250 kDa. Pro molekuly větší >300 kDa se využívá gel z agarózy. Rozdělené proteiny v gelu se nejčastěji obarví Coomasie Brilliant Blue, koloidním stříbrem nebo fluorescenčními barvivy. Po přenesení do elektronické podoby se následně kvantitativně vyhodnocují denzitometry. V závislosti na použitém barvení se detekční limit proteinu pohybuje od 0,25 ng do 8 ng. [73; 74]

### 1.5.2 Protein specifické metody

Elektroforézu, jako první stupeň metody, lze využít jako součást vícerozměrné analýzy ke kvalitativnímu stanovení bílkovin. **Metodou WesternBlottingu.** Jedná se o protein specifickou metodu, ve které je detekována cílová látka prostřednictvím specifické protilátky. Po elektroforéze je na gel přiložena nitrocelulósová nebo polyvinylidifluoridová membrána, na kterou jsou proteiny přeneseny. Následuje inkubace s primární protilátkou a značenou sekundární protilátkou. V závislosti na typu značení sekundární protilátky se měří enzymatická, bioluminiscenční a fluorescenční aktivita či radioaktivita, která je úměrná množství proteinu nebo peptidu. [73] Množství proteinu může být stanoveno semikvantitativně pomocí denzitometru. V případě kvalitativního stanovení proteinů se využívají specifické protilátky, které se váží pouze na daný antigen.

Z analytických metod se dále využívá metoda **vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**, která zejména slouží k stanovení koncentrace proteinů ve vzorku nebo k izolaci jednotlivých složek směsi s následným spřažením s dalšími identifikačními technikami jako je například hmotnostní spektrometrie (MS). Právě díky možnosti spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem je pro analýzu proteinu upřednostňována tato technika. Principem separace metodou HPLC je rozdílná distribuce analitu mezi stacionární fází, ukotvené uvnitř kolony, a kapalnou mobilní fází protékající celým systémem. K separaci analitu je možné využít tři separační systémy. Nejčastěji se využívá chromatografie na obrácených fázích, kde dělení probíhá na základě celkové polaritě molekuly. Dále je možné využít k separaci vylučovací gelovou chromatografií, která separuje vzorek podle velikosti molekul prostupující gelovou náplní kolony. Posledním separačním systémem je iontově výměnná chromatografie a ta rozděluje bílkoviny podle množství nabitých skupin v molekule. V závislosti na volbě detektoru se citlivost metody pohybuje v rozpětí od pg - µg/ml. [25]

### 1.6 Nosičové systémy v enzymatickém debridementu v procesu hojení rány

Hojení ran je přirozený a složitý proces, zahrnující několik po sobě jdoucích či prolínajících se fází, a to - koagulace, hemostáza, zánět, proliferace a remodelace, které vedou k obnově celistvosti tkáně. V závislosti na typu poranění se liší doba zhojení. Akutní rána se obvykle zhojí do 10 dní. V případě akutní rány není přítomna nekrotická tkáň, která by se musela před začátkem hojení odstranit. [76] Hojení chronické rány probíhá odlišně, zejména v důsledku selhání některé z fází normálního hojení v součinnosti se základním

onemocněním jako je například diabetes. Za chronickou ránu lze označit ránu, jejíž hojení trvá déle než 6-9 týdnů. Často na prodloužení doby hojení rány se podílí přetrvávající infekce, protože fibrinové povlaky, tvořící nekrotickou tkáň, blokují na povrchu rány hojení a zvyšují riziko bakteriální kolonizace. [76; 77; 78; 79]

Proces hojení ran může být urychlen odstraněním nekrotické tkáně, které může probíhat chirurgicky nebo pomocí enzymatického či dalších typů debridementu. Enzymatický debridement k rozkladu neživé tkáně využívá proteolytické enzymy, které jsou aplikovány v podobě masti lokálně a činnost enzymů podporuje migraci buněk během epitelizační fáze hojení. Důležitá role při hojení nekrotické rány je její samotné vyčištění. Využívá se přirozeně vyskytujících se enzymů jako je například trypsin, kombinace streptokinázy-streptodornázy, papain-močovina nebo mikrobiální kolagenáza. Účinky jednotlivých enzymů se liší podle jejich specifity. Proteolytické enzymy jsou schopné odklidit nekrotické ložisko, a proto není nutné ránu chirurgicky čistit. [75; 77; 78]

Obvyklé nosičové systémy pro jednotlivé enzymy jsou masti, náplasti nebo polymerní nosiče, které byly podrobněji vysvětleny v kapitole 1.4.1.3.

## **1.7 In vitro uvolňovací studie nosičových systémů**

Léčiva jsou látky, které svým působením pozitivně ovlivňují procesy probíhající v živém organismu a mohou přispět k léčbě nebo zmírnění příznaků onemocnění. Léčivými látkami nutně nemusí být jen léčiva samy o sobě, ale také hormony, enzymy, proteiny, virové podjednotky, nukleové kyseliny či buňky. [1; 5; 6; 11; 57; 79].

Kinetika uvolňování léčiv poskytuje informace o chování lékové formy a je klíčovým parametrem používaným pro posouzení bezpečnosti a účinnosti přípravku. Testování uvolňování léčiv *in vitro* se běžně používá jako předběžný ukazatel chování *in vivo*. [1] Výběr analytické metody, která bude studovat *in vitro* uvolňování léčiva, závisí na jeho chemické povaze. V případě uvolňovacích studií *in vivo* je stěžejní informací povaha léčebného účinku. Hlavní roli při výběru metody zejména hraje množství a charakter analyzovaného vzorku, ale také požadovaná míra specifčnosti či citlivosti stanovení, přítomnost interferujících látek a finanční nebo časová náročnost stanovení. [3] Nejčastěji se k průkazu množství léčiv (proteinového charakteru) používají UV-VIS spektrofotometrické metody, které využívají schopnosti analyzované látky pohlcovat světlo při určitých vlnových délkách. Léčiva můžeme analyzovat spektrofotometricky nebo dalšími optickými technikami, kde se využívá barevné reakce proteinů s různými činidly. Ke kvalitativnímu průkazu množství látky ve vzorku se

využívají imunoanalytické, elektromigrační a chromatografické metody. Uvolňování léčiv z nanočástic závisí na několika parametrech a to na chemické struktuře polymeru, na metodě uchycení léčiva a na reakčních podmínkách zahrnující hodnoty pH, iontové síly, teplotu a chemické složení uvolňovacího média. [80]

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo modifikovat nanovlákná a nanočástice z chitosanu proteiny a pomocí technik analytické chemie sledovat míru kovalentní vazby nebo fyzikální sorpce proteinů na nanomateriály. Prvním dílčím cílem je kovalentně vázat klostridiální kolagenázu na chitosanová nanovlákná připravená metodou elektrospinningu (Nanovia s.r.o., Litvínov), pomocí nízkomolekulárního enzymového substrátu ověřit enzymovou aktivitu a sledovat efekt enzymatického debridementu modifikovaným nanomateriálem na hojení rány u experimentálního zvířete.

Druhým dílčím cílem je vyvinout a porovnat metody pro sledování účinnosti sorpce modelového proteinu ovalbuminu na chitosanové nanočástice s tripolyfosfátem (CS/TPP) připravené metodou ionotropního gelování a na nanočástice z kopolymeru kyseliny polymléčné a polyakrylové roubovaného na chitosan (CS/PLA/PAA) připravené komplexační technikou do formy nano-submikro (Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně). U obou forem nanomateriálů bude porovnána míra sorpce ovalbuminu na chitosanová nanovlákná. U nanočástic bude po sorpci ovalbuminu studována rychlost uvolňování proteinu ve 0,01 M fosfátovém pufru pH 7,4.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístroje a pomůcky

- spektrofotometr Labsystems Multiskan RC (Labsystems Diagnostics Oy, Helsinki Vantaa, Finsko)
- spektrofotometr Libra S22 Biochrom, software Resolution Life Sciences (Biochrom Ltd, Cambridge, Velká Británie)
- fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS+ System s Image Lab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- aparatura pro diskontinuální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- křemenné kyvety – Semimikrokyveta SM/Q5, optická délka 5 mm (Exacta + Optech, Mnichov, Německo)
- pH metr Orion 420A (Orion Pacific Pty Ltd, Denistone East, Austrálie)
- termostat INCU-Line (VWR International Ltd, Lutterworth, Leicestershire, Velká Británie)
- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Německo)
- analytické váhy Kern ABT 220-5DM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- rotátor Grant-bio (Grant Instruments Ltd, Shepreth, Cambridgeshire, Velká Británie)
- rotátor – mini-rotátor Bio RS-24 Biosan (Biosan Laboratories, Inc., Warren, Spojené státy americké)
- třepačka Mini Rocker MR-1 Biosan (Biosan Laboratories, Inc., Warren, Spojené státy americké)
- magnetické míchadlo MM4 LAVAT (LAVAT a.s., Chotutice, Česká republika)
- běžný laboratorní materiál: laboratorní nádobí (kádinky, odměrné nádoby, odměrné válce), mikropipety Eppendorf a Biohit, mikrozkušavky Eppendorf, mikrotitrační destičky, plastové pinzety, dělené Petriho misky

## 3.2 Materiál

### 3.2.1 Použité reagensy a chemikálie

- kolagenáza NB 4G (ověřené čistoty z *Clostridium histolyticum*) – 70-120 kDa, EC 3.4.24.3, 17465, SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Německo)
- substrát pro kolagenázu (per E. Wunsch – 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg, Pz-peptid) –  $M_r = 776.9$ ,  $C_{38}H_{52}N_{10}O_8$ , 52268, SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Německo)
- N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS) –  $M_r = 217.13$ ,  $C_4H_4NNaO_6S$ , 56485-1G, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) –  $M_r = 191.70$ ,  $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$ , EC 247-361-2, E6383-1G, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- ethylacetát (ethylester kyseliny octové) –  $M_r = 88.11$ ,  $C_4H_8O_2$ , 20028-AT0, Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- methanol –  $M_r = 32.04$ ,  $CH_4O$ , 20038-AT0, Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková -  $M_r = 36.46$ , HCl, Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- akrylamid -  $M_r = 71.08$ ,  $C_3H_5NO$ , Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- N,N'-metylen-bis-akrylamid,  $M_r = 154.17$ , Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- dodecylsulfát sodný (SDS) -  $M_r = 288.37$ ,  $NaC_{12}H_{25}SO_4$ , Lachema (Neratovice, ČR)
- persíran amonný -  $M_r = 228.18$ ,  $(NH_4)_2S_2O_8$ , Lachema (Neratovice, ČR)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) -  $M_r = 116.24$ ,  $C_6H_{16}N_2$ , Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- glycin -  $M_r = 75.07$ ,  $C_2H_5NO_2$ , Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Bio-Safe Coomas sie G-250 Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Albumin from chicken egg whit, A7641, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Mini, cOmplete<sup>TM</sup>, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Micro BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent Kit, 23235, Pierce Biotechnology (Rockfor, IL, USA)

### 3.2.2 Použité roztoky

- 0,03 M Tris-HCl pufr pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 0,025 M CaCl<sub>2</sub>
- 0,01 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,01 M fosfátový pufr pH 7,3 s 1 M NaCl
- zásobní substrátový roztok Pz-peptidu o koncentraci 1 mg/ml 30 mM Tris-HCl pufr pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 0,025 M CaCl<sub>2</sub>
- zásobní roztok kolagenázy o koncentraci 1 mg/ml v 30 mM Tris-HCl pufr pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- zásobní roztok kolagenázy o koncentraci 10 mg/ml v 30 mM Tris-HCl pufr pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 20 mg/ml v 0,01 M fosfátovém pufru pH 7,3
- 22% roztok kyseliny citronové
- roztok EDC – 7,5 mg EDC v 200 µl 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3
- roztok sulfo-NHS – 1,25 mg sulfo-NHS v 200 µl fosfátového pufru pH 7,3
- roztok 6 M HCl

### 3.2.3 Použitá nanovlákná

Materiál: chitosan/kyselina octová/polyethylenglykol

- Dodavatel nanovláken: Nanovia, s.r.o
- Metoda přípravy: technika electrospinning s použitím struny (Nanospider<sup>TM</sup>)
- Vzorek nanovláken č. : 2016 - 1
- Datum přípravy: 2016
- Plošná hmotnost: 10 g/m<sup>2</sup>
- Způsob síťování: teplem při 130 °C po dobu 1 hodiny
- Podkladový materiál: polypropylen
- Rozměry nanovláken: 100 - 400 nm



### 3.2.4 Použité nanočástice

Materiál: chitosan/tripolyfosfát (TPP)

- Metoda přípravy: ionotropního gelovatění
- Vzorek nanočástic č. : 2,5/1
- Datum přípravy: listopad 2017
- Hydrodynamická velikost částic: 182 nm

Materiál: kopolymer polylaktidu a polyakrylové kyseliny roubovaný na chitosanu

- Dodavatel nanočástic: UTB Zlín
- Metoda přípravy: komplexační technika
- Vzorek nanočástic č. : 50
- Datum přípravy: 2016
- Hydrodynamická velikost částic: 150 nm

## 3.3 Příprava a dialýza nanočástic z chitosanu/TPP

Nanočástice z chitosanu byly připraveny metodou ionotropního gelovatění. Principem vzniku nanočástic je spojení opačně nabitých molekul vlivem elektrostatických interakcí, tj. spojení chitosanu jako polykationtu s anionty tripolyfosfátu (TPP). Metoda byla provedena smísením dvou vodných roztoků při laboratorní teplotě podle [43].

### 3.3.1 Příprava dialyzačních střívek

#### *Postup*

Ze zásobního vzorku dialyzačních střívek bylo odebráno 3krát po 1 metru. Střívka byla ponořena do 0,5 l destilované vody na 3 hodiny (s výměnou vody každou hodinu) za účelem odstranění zvlhčovačla glycerolu. Pro odstranění sloučenin síry byla střívka ošetřena pomocí 0,3 % (w/v) roztoku sulfidu sodného ohřátého na teplotu 80 °C 1 minutu a poté byla promyta horkou vodou (60°C) po dobu 2 minut. Po okyselení střívek prostřednictvím 0,2 % roztoku kyseliny sírové byla dialyzační střívka opláchnuta horkou vodou a skladována v redestilované vodě při 4°C.

### **3.3.2 Dialýza nanočástic**

Připravené roztoky nanočástic s poměrem chitosanu I a TPP 2,5:1 byly pipetovány do dialyzačních střívek po 10 ml vzorku (tj. 14,3 mg nanočástic pro roztok v poměru 2,5:1). Vzorky byly poté dialyzovány do prostředí redestilované vody. Dialýza trvala 16 hodin při laboratorní teplotě s mírným třepáním. V průběhu této doby bylo 3krát vyměněno dialyzační prostředí s celkovým objemem odpovídajícím 100 násobku objemu vzorku v dialyzačních střívkách. Všechny tři fáze byly provedeny do dialyzačních prostředí s využitím redestilované vody.

### **3.4 Rehydratace nanočástic**

Částice byly připraveny ve spolupráci s prof. Ing. V. Sedlaříkem, Ph.D. na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Bylo naváženo 45 mg lyofilizovaných nanočástic, složených z kopolymeru polylaktidu a polyakrylové kyseliny roubovaného na chitosan, do 10 ml destilované vody. Nanočástice byly rehydratovány přes noc. Následující den byla suspenze nanočástic okyselena přídatkem 6 M HCl a homogenizována ultrazvukem 20 minut.

### **3.5 Karbodiimidová metoda vazby kolagenázy na chitosanová nanovlákná**

Nanovlákná byla připravena ve spolupráci s Nanovia s.r.o. K imobilizaci kolagenázy na chitosanová nanovlákná byla použita karbodiimidová metoda, jejímž principem je reakce mezi aminovou skupinou enzymu a hydroxylovou skupinou chitosanového nanovlákná. [81] Ke zprostředkování vazby byl použit N-(3dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC) a N-hydrosulfosukciimid (S-NHS). EDC, ve vodě rozpustný karboimid, se během reakce s hydroxylovou skupinou chitosanu přeměňuje na derivát močoviny a jeho toxicita je velmi nízká. [82] Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

#### ***Postup***

Vzorky nanovláken s plošnou hmotností 10 g/m<sup>2</sup> o rozměrech 1,5x 1,5 cm byly zváženy bez polypropylenového podkladu a promyty 1x 1 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3. Vzorky byly připraveny v dubletu. K nanovláknům bylo v rychlém sledu přidáno 200 µl roztoku EDC, 200 µl roztoku sulfo-NHS a 500 µl roztoku kolagenázy. Reakční směs byla doplněna 100 µl 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 a inkubována přes noc při 4°C za mírného otáčení. Po inkubační době byla nanovlákná promyta 3x 1 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3; 1x 1 ml 0,01 M

fosfátového pufru pH 7,3 s 1M NaCl a 2x 1ml 0,03 M Tris-HCl pufrům pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 0,025 M CaCl<sub>2</sub>. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

### **3.6 Sorpce kolagenázy na nanovláknno**

#### ***Postup***

Metoda sorpce byla převzata a upravena podle [6]. Vzorky nanovláken s plošnou hmotností 10 g/m<sup>2</sup> o rozměrech 1,5x 1,5 cm byly zváženy bez polypropylenového podkladu a promyty 1x 1 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3. Vzorky byly připraveny v dubletu. K nanovláknům bylo přidáno 500 µl roztoku kolagenázy a reakční směs byla doplněna 500 µl 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 a inkubována 2 hodiny při 4°C za mírného otáčení. Ke slepému vzorku nanovláken byl přidán 1 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 a inkubován za stejných podmínek. Po inkubační době byla nanovláknna promyta 3x 1 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3; 1x 1 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 s 1M NaCl a 2x 1 ml 0,03 M Tris-HCl pufrům pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 0,025 M CaCl<sub>2</sub>. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

### **3.7 Sorpce ovalbuminu na nanočástice a následné uvolnění**

#### ***Postup***

Metoda sorpce byla převzata a upravena podle [6]. Z roztoků vzorku nanočástic byl odebrán objem s obsahem 4 mg nanočástic. Vzorky byly připraveny v dubletu. Pro promytí a separaci částic z roztoku byla použita centrifugace 5 minut při 5000 otáčkách za minutu. Částice byly před vlastní sorpcí 1 x promyty fosfátovým pufrům pH 7,3. Následně k částicím bylo přidáno 500 µl roztoku ovalbuminu a reakční směs byla doplněna 500 µl 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 a inkubována 2 hodiny při 4°C za mírného otáčení. Po inkubaci byl odebrán 1 ml roztoku po vazbě pro další analýzy.

Následně byly nanočástice doplněny 1 ml fosfátového pufru pH 7,3 a rozděleny na dvě části po 500 µl. Jedna část suspenze byla doplněna fosfátovým pufrům pH 7,3 na výsledný objem 1000 µl a promyta 3x 1 ml fosfátového pufru pH 7,3. Druhá část suspenze byla použita pro detekci sorbovaného proteinu na nanočásticích testem microBCA. Všechny promývací frakce a druhá část suspenze byly uschovány pro další experimenty. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

## 3.8 Stanovení aktivity kolagenázy

### 3.8.1 Solubilní kolagenáza

#### *Postup ve 2 ml*

Ve zkumavce bylo smíseno 1780  $\mu\text{l}$  0,03 M Tris-HCl pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 0,025 M  $\text{CaCl}_2$  pufru, 200  $\mu\text{l}$  substrátového roztoku a 20  $\mu\text{l}$  roztoku kolagenázy. Vzorky byly připraveny v dubletu. Slepý vzorek byl připraven z 200  $\mu\text{l}$  substrátového roztoku a 1800  $\mu\text{l}$  pufru 0,03 M Tris-HCl pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 0,025 M  $\text{CaCl}_2$ . Po inkubaci 25 min při 37°C v rotátoru byl celý reakční objem vzorků přenesen do 5 ml zkumavek. Reakce byla zastavena přidávkem 250  $\mu\text{l}$  22% kyseliny citrónové a vzniklý produkt byl extrahován 20s intenzivním třepáním s 2 ml ethyl acetátu. Absorbance organické vrstvy byla proměřena při 320 nm v křemenné kyvetě na spektrofotometru Libra S22 Biochrom proti slepému vzorku. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

#### *Kalibrace enzymové aktivity*

Pro kalibraci byl připraven zásobní roztok kolagenázy rozpuštěním 1 mg v 1 ml pufru, ze kterého byly připraveny kalibrační body o koncentracích 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15  $\mu\text{g}$ . Do zkumavky bylo smíseno 20  $\mu\text{l}$  roztoku kolagenázy, 200  $\mu\text{l}$  substrátového roztoku a směs byla doplněna 0,03 M Tris-HCl pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 0,025 M  $\text{CaCl}_2$  puftrem na výsledný objem 2 ml. Každý vzorek byl připraven v dubletu. Slepý vzorek byl připraven z 200  $\mu\text{l}$  substrátového roztoku a 1800  $\mu\text{l}$  pufru 0,03 M Tris-HCl pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 0,025 M  $\text{CaCl}_2$ . Následovala inkubace 25 minut při 37°C v rotátoru. Reakce byla zastavena přidávkem 250  $\mu\text{l}$  22% kyseliny citrónové a vzniklý produkt byl extrahován 20s intenzivním třepáním s 2 ml ethyl acetátu. Absorbance organické vrstvy byla proměřena při 320 nm v křemenné kyvetě na spektrofotometru Libra S22 Biochrom proti slepému vzorku. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

### **3.8.2 Imobilizovaná a sorbovaná kolagenáza**

#### ***Postup ve 2 ml***

Ke vzorkům nanovláken s imobilizovaným nebo sorbovaným enzymem bylo přidáno 1800  $\mu\text{l}$  0,03 M Tris-HCl pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 0,025 M  $\text{CaCl}_2$  pufru a 200  $\mu\text{l}$  substrátového roztoku. Vzorky byly připraveny v dubletu. Slepý vzorek byl připraven stejným způsobem s použitím vzorku nanovláken. Po inkubaci 25 min při 37°C v rotátoru byl celý reakční objem vzorků a supernatant z nanovláčenného vzorku přenesen do 5 ml zkumavek. Reakce byla zastavena přidávkem 250  $\mu\text{l}$  22% kyseliny citrónové a vzniklý produkt byl extrahován 20s intenzivním třepáním s 2 ml ethyl acetátu. Absorbance organické vrstvy byla proměřena při 320 nm v křemenné kyvetě na spektrofotometru Libra S22 Biochrom proti slepému vzorku. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

### **3.9 Stanovení koncentrace proteinů metodou mikroBCA**

#### **3.9.1 Kalibrace**

Byla připravena kalibrační řada o koncentraci proteinu 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20, 40 a 200  $\mu\text{g/ml}$ . Následně byl připraven pracovní roztok BCA, který se skládal z roztoků A, B a C smíšených v poměru 25: 24 : 1, jehož množství bylo připraveno podle počtu vzorků. Vzorky byly připraveny v triplicátu. Do destičky s plochým dnem bylo pipetováno 150  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu a 150  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku BCA. Slepý vzorek byl tvořen 150  $\mu\text{l}$  ředícího pufru a 150  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku BCA. Vzorky byly inkubovány 2 hodiny při 37°C a pak byla proměřena absorbance při 570 nm na spektrofotometru Multiscan. Od naměřených absorbancí jednotlivých vzorků byla odečtena absorbance slepého vzorku a následně sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci proteinu. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

#### **3.9.2 Postup s nanovláčky**

Byl připraven pracovní roztok BCA, který se skládal z roztoků A, B a C smíšených v poměru 25: 24 : 1, jehož množství bylo připraveno podle počtu vzorků. Vzorky byly připraveny v duplikátu. Do mikrozkušavek s nanovláčky bylo napipetováno 150  $\mu\text{l}$  0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 a 150  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku BCA. Slepý vzorek byl tvořen nanovláčkou

s 150 µl ředícího pufru a 150 µl pracovního roztoku BCA. Vzorky byly inkubovány 2 hodiny při 37°C. Po inkubaci byl obsah mikrozkušavek přepipetován do destičky s plochým dnem a byla proměřena absorbance při 570 nm na spektrofotometru Multiscan. Od naměřených absorbancí jednotlivých vzorků byla odečtena absorbance slepého vzorku a následně bylo vyhodnoceno množství proteinu metodou kalibrační přímky. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

### 3.9.3 Postup s nanočásticemi

Byl připraven pracovní roztok BCA, který se skládal z roztoků A, B a C smíšených v poměru 25: 24 : 1, jehož množství bylo připraveno podle počtu vzorků. Vzorky byly připraveny v duplikátu. Do mikrozkušavek s nanočásticemi bylo napipetováno 150 µl 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 a 150 µl pracovního roztoku BCA. Slepý vzorek byl tvořen 150 µl ředícího pufru a 150 µl pracovního roztoku BCA. Vzorky byly inkubovány 2 hodiny při 37°C. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 5 min při 5000 otáčkách za minutu a následně byl obsah mikrozkušavek přepipetován do destičky s plochým dnem. Byla proměřena absorbance při 570 nm na spektrofotometru Multiscan. Od naměřených absorbancí jednotlivých vzorků byla odečtena absorbance slepého vzorku a následně bylo vyhodnoceno množství proteinu metodou kalibrační přímky. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

## 3.10 Spektrofotometrické stanovení množství proteinů

### *Postup*

U vzorků byla proměřena na spektrofotometru Libra S22 Biochrom absorbance v 1 cm křemenné kyvetě při 260 a 280 nm proti slepému vzorku, který byl tvořen ředícím pufrům. Koncentrace čistého proteinu byla vypočtena dle rovnice:

$$\frac{A_{280 \text{ nm}}}{\text{extinkční koeficient}} \times 10 \text{ mg/ml} \quad (2)$$

Čistota proteinu byla ověřena podílem absorbancí při 260 nm a 280nm. Při hodnotách poměru vyšších než 0,6 se jednalo o vzorek kontaminovaného proteinu.

### 3.11 SDS-PAGE s Coomasie Brilliant Blue barvením

#### *Postup*

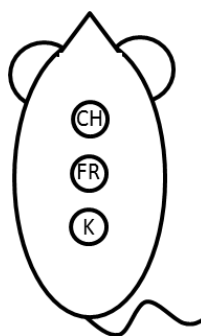
Před vlastní prací byla důkladně vyleštěna skla etanolem a upevněna do stojánku. Podle následující tabulky (tab. č. 6) do jednorázové plastové zkumavky byl připraven 10% dělicí gel. Dělicí gel byl ihned napipetován mezi skla po horní okraj svorek rámečku a převrstven destilovanou vodou. Během 20 - 30 minut tento gel zpolymeroval a vytvořil ostré rozhraní mezi gelem a vrstvou vody, která byla odsáta filtračním papírem. Následně byl připraven 5% zaostřovací gel podle následující tabulky a napipetován až po okraj skel. Mezi skla byla vložena šablona s 10 jamkami. Směs během 15 minut zpolymerovala. Skla s připravenými zpolymerovanými gely byla opatrně vyjmuta ze stojánku a přemístěna do elektroforetické aparatury tak, aby kratší skla mířila dovnitř aparatury proti sobě. Následně byly odstraněny šablony a jamky byly promyty 3x elektrodovým pufrem. K 10 µl vzorku bílkoviny o známé koncentraci bylo napipetováno 10 µl roztoku G a směs byla po promíchání 2 minuty povařena ve vodní lázni. Do každé jamky bylo Hamiltonovou pipetou aplikováno 15 µl připravených vzorků. V případě bílkovinného standardu bylo pipetováno 5 µl. Do elektroforetické nádoby a vnitřního prostoru mezi dvěma gely bylo nalito ekvivalentní množství elektrodového pufru k počtu gelů. Vlastní elektroforetické dělení probíhalo 35 minut při konstantním napětí 180 V a 0,03 A na jeden gel. Následně byl gel přenesen do Petriho misky a propláchnut 3x destilovanou vodou a obarven Coomasie Brilliant Blue.

Tab. č. 6: Postup přípravy 10% dělicího a 5% zaostřovacího gelu.

<b>Roztoky</b>	<b>10 % dělicí gel (ml)</b>	<b>5 % zaostřovací gel (ml)</b>
<b>Destilovaná voda</b>	2	1,4
<b>Roztok A</b>	1,65	0,330
<b>Roztok B</b>	1,25	-
<b>Roztok C</b>	-	0,250
<b>Roztok D</b>	0,05	0,02
<b>TEMED</b>	0,002	0,002
<b>Roztok E</b>	0,05	0,02

### 3.12 Aplikace nanovláknenného krytu na excizní ránu laboratorního zvířete

Zucker Diabetic Fatty Rat (ZDF) (Charles River Laboratories International, Inc. USA, zakoupeno v Anlab ČR) je jeden ze stěžejních modelů zvířat široce využívaných pro výzkum a léčbu DM2 a je možné je použít pro sledování hojení rány. Anestetizovaným a analgetikovaným potkanům ZDF byla kůže na hřbetě oholena, dezinfikována a na zádech 6 cm od uší byla kleštěmi vytvořena kruhová řezná rána s průměrem 20 mm (obr. č. 9). Po vytvoření zranění byla zvířata umístěna odděleně a byla jim podávána analgetika (hydrochlorid buprenorfinu 0,05 mg / kg s. c., IVAX, Opava-Komarov, Česká republika). Nanovláknna s kolagenázou (cca 1 cm<sup>2</sup>) byla před aplikací navlhčena fyziologickým roztokem. Kontrolní vzorek byl ze samotného chitosanu o rozměrech 3,5 x 3,5 cm aplikován suchý na polypropylenovém podkladu, který se následně navlhčil fyziologickým roztokem. Poslední rána byla překryta jen gázovým čtvercem navlhčeným fyziologickým roztokem. Následně všechny rány byly společně překryty gázovým čtvercem, ten byl zafixován náplastí a tělo potkana bylo obvázáno obvazem a ten následně zafixován elastickým obinadlem.



Obr. č. 9: Schéma ošetření. CH - rána překrytá chitosanovým nanovláknem, FR - rána překryta pouze gázou navlhčenou fyziologickým roztokem, K - rána překrytá chitosanovým nanovláknem s navázanou kolagenázou.

Rány byly převazovány každé 4 dny až do zahojení. Rány byly fotografovány (EOS D350, Canon, Tokyo, Japonsko), a měřeny milimetrovým měřítkem. Měřená plocha byla hodnocena programem ImageJ kalibrovaném na standardní délku s použitím milimetrového měřítka. Byla hodnocena velikost rány, která byla vyjádřena podle vzorce:

$$\text{velikost rány (mm)} = \frac{\% \text{ zraněné plochy v den } n}{\text{zraněná plocha v den } 0} \quad (1)$$

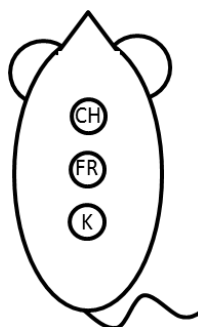
Zároveň byla sledována i míra epitelizace, tj. hojení rány podle vzorce:

$$\text{míra epitelizace} = \frac{\% \text{ epitelizací jizvy}}{\text{zraněná plocha v den } 0} \quad (2)$$



### 3.13 Aplikace nanovláknenného krytu na nekrotickou tkáň laboratorního zvířete

Zucker Diabetic Fatty Rat (ZDF) (Charles River Laboratories International, Inc. USA, zakoupeno v Anlab ČR) je jeden ze stěžejních modelů zvířat široce využívaných pro výzkum a léčbu DM2 a je možné je použít pro sledování hojení rány. Anestetizovaným a analgetikovaným podkanům byla kůže na hřbetě oholena, dezinfikována a na zádech byly vytvořeny tři rány o průměru 1 cm cca 2 cm od sebe (obr. č. 10). Nekrotická rána byla vytvořena na hřbetě hliníkovým pečetidlem, které bylo zahřáto ve vodní lázni na 100°C a na 10 s přiloženo na kůži. Chitosanová nanovláknna s kolagenázou byla před aplikací navlhčena fyziologickým roztokem. Kontrolní vzorek samotného chitosanového nanovláknna o rozměrech 1 cm<sup>2</sup> aplikován suchý na polypropylenovém podkladu, který se následně navlhčil fyziologickým roztokem. Poslední rána byla překryta jen gázovým čtvercem navlhčeným fyziologickým roztokem. Následně všechny rány byly společně překryty gázovým čtvercem, ten byl zafixován náplastí a tělo potkana bylo obvázáno obvazem a ten následně zafixován elastickým obinadlem.



Obr. č. 10: Schéma ošetření. CH - rána překrytá chitosanovým nanovláknem, FR - rána překryta pouze gázou navlhčenou fyziologickým roztokem, K - rána překrytá chitosanovým nanovláknem s navázanou kolagenázou.

Rány byly převazovány každé 4 dny až do zahojení. Rány byly fotografovány (EOS D350, Canon, Tokyo, Japonsko), a měřeny milimetrovým měřítkem. Měřená plocha byla hodnocena programem ImageJ kalibrovaném na standardní délku s použitím milimetrového měřítka. Byla hodnocena velikost rány, která byla vyjádřena podle vzorce:

$$\text{velikost rány (mm)} = \frac{\% \text{ zraněné plochy v den } n}{\text{zraněná plocha v den } 0} \quad (3)$$

Zároveň byla sledována i míra epitelizace, tj. hojení rány podle vzorce:

$$\text{míra epitelizace} = \frac{\% \text{ epitelizací jizvy}}{\text{zraněná plocha v den } 0} \quad (4)$$

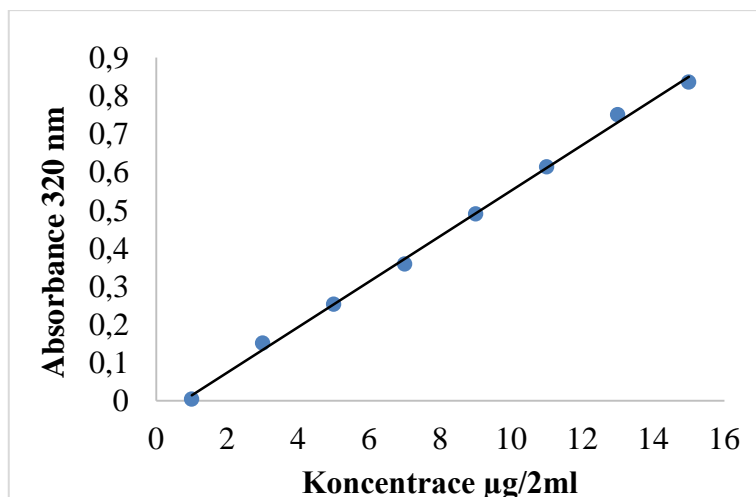
## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Příprava chitosanového nanovlákná s kolagenázou

Příprava nanovláknenného nosiče s kolagenázou navázala na diplomovou práci Mgr. Veroniky Kratochvilové. Cílem této práce bylo připravit nanovláknenný nosič z chitosanu s imobilizovanou kolagenázou a ve spolupráci prof. MUDr. Martinou Řezáčovou, Ph.D. a Mgr. Renatou Köhlerovou, Ph.D na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové ověřit jeho efekt na hojení excizní a nekrotické rány u experimentálního zvířete. Klostridiální kolagenáza je v současné době používána v enzymatickém debridementu v přípravku Iruzol®, ve které výrobce deklaruje obsah 0,48 - 3,00 mg enzymu v 1 g masti. [24]

Nanovláknenné formy chitosanu (CS) jsou propustné pro molekuly kyslíku a vody, díky čemuž podporují regeneraci pokožky, buněčné dýchání, zadržování vlhkosti, odstraňování výměšků a hemostázu. Díky těmto předpokladům bylo navrženo spojení nanovláknenného chitosanu s proteolytickým enzymem. Spojení těchto dvou komponent již dříve prokázal netoxicitu. [81] Kolagenáza z bakterie *Clostridium histolyticum* se využívá pro odstranění nekrotické tkáně v podobě enzymatického debridementu. Klostridiální kolagenáza je ve vodě rozpustný proteolytický enzym a jako jediný je schopný degradovat nativní kolagen, který svými vlákny ukotvuje nekrotickou tkáň k povrchu rány. [83]

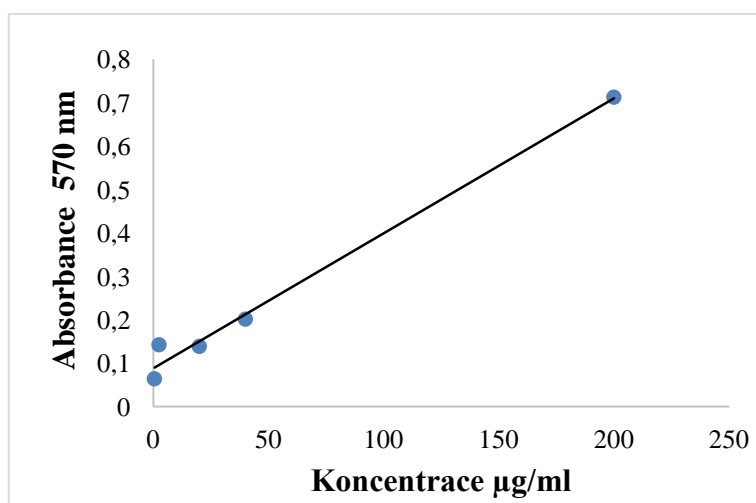
Kovalentní vazba, aplikována v této práci, se používá k účinnému zamezení jak denaturace, tak uvolnění molekul enzymu. [84] Obzvláště imobilizace proteáz kovalentní vazbou dále snižuje autokatalýzu a kontroluje proteolýzu. [84; 85; 86] K navázání kolagenázy k nosiči byla použita karbodiimidová metoda s použitím aktivačního činidla EDC a S-NHS. Cílem řady experimentů bylo sledovat míru vazby proteinu na standardní množství nosiče (nanovlákná, nanočástice) s měnícím se množstvím vloženého enzymu. Ke sledování míry vazby kolagenázy byly použity analytické detekční techniky – mikroBCA a sledování enzymové aktivity. Pro stanovení enzymové aktivity kolagenázy byla sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci kolagenázy v objemu 2 ml podle metody 3.8. Výsledky jsou graficky znázorněny na obr. č. 11.



Obr. č. 11: Spektrofotometrické stanovení aktivity kolagenázy ve 2 ml.

Kalibrační rovnice  $y = 0,0597x - 0,0458$  byla použita u dalších experimentů pro vyhodnocení koncentrace aktivní kolagenázy.

Pro vyjádření koncentrace imobilizované kolagenázy na nanovláčkách byla použita metoda microBCA. Podle pokynů výrobce byla připravena kalibrační řada v objemu 1 ml podle metody 3.93.9 (obr. č. 12)

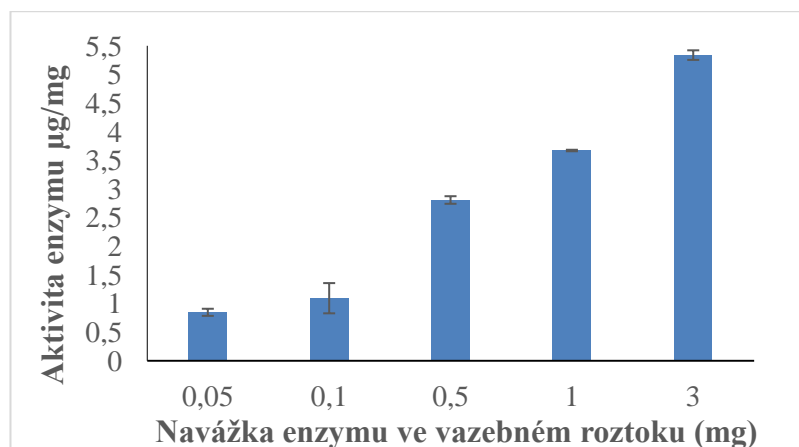


Obr. č. 12: Stanovení koncentrace kolagenázy metodou microBCA..

Kalibrační rovnice  $y = 0,0031x - 0,0887$  byla použita u dalších experimentů pro vyhodnocení množství kolagenázy navázané na nanovláčkách a v roztocích.

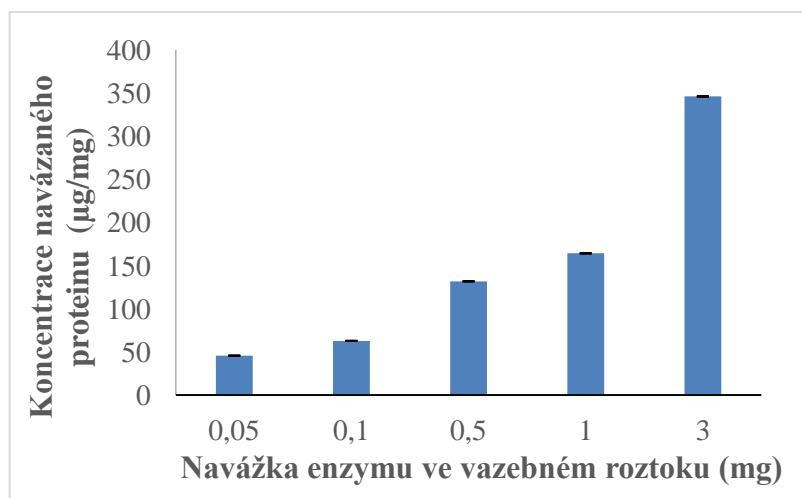
Pro ověření potřebného množství kolagenázy pro vazbu na nanovláčko byla provedena optimalizace její počáteční koncentrace. V tomto experimentu bylo na nanovláčka vázáno 0,05; 0,1; 0,5; 1 a 3 mg kolagenázy. Každá navážka byla provedena v dubletu. Po inkubaci nanovláček byl odebrán roztok po vazbě a 1. promývací frakce. Na nanovláčkách a v těchto

roztocích byla stanovena aktivita kovalentně vázané kolagenázy dle postupu z kapitoly 3.8. Výsledky jsou znázorněny graficky na obrázku č. 13.



Obr. č. 13: Spektrofotometrické stanovení aktivity kolagenázy navázané na mg nanovlákná.

Specifická aktivita navázané kolagenázy byla 0,85; 1,10; 2,81; 3,67 a 5,34 µg/mg nanovlákná v závislosti na vloženém množství enzymu. Koncentrace navázaného proteinu bylo ověřeno metodou microBCA dle postupu z kapitoly 3.9 a výsledky jsou na obr. č. 14.



Obr. č. 14: Stanovení koncentrace kolagenázy navázané na mg nanovlákná metodou microBCA.

Rozdíly mezi katalytickou aktivitou kolagenázy a koncentrací kolagenázy lze vysvětlit faktem, že vazba molekul v oblastech aktivních míst nebo v jejich blízkosti může vést ke snížení nebo úplné ztrátě aktivity. Tento pokles katalytické aktivity vs. vložené množství enzymu byl již pozorován i při použití trypsinu v publikacích [ 81; 87].

Pro další experimenty bylo na chitosanové nanovlákná navázáno nejvyšší použité množství kolagenázy.

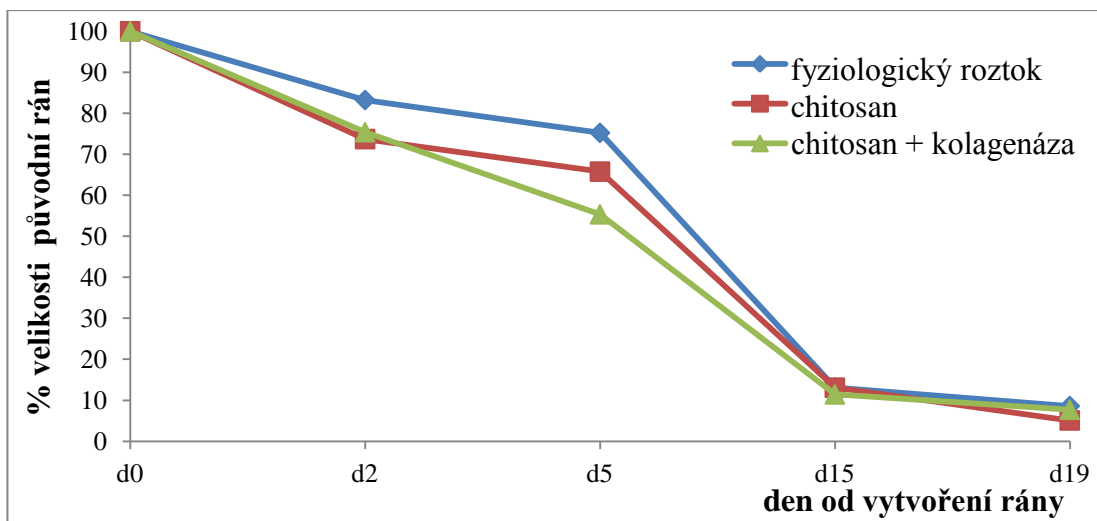
## **4.2 Hodnocení vlivu chitosanového nanovlákná s kolagenázou na hojení rány u laboratorního zvířete**

V následujících experimentech jsme hodnotili rychlost a kvalitu hojení rány u laboratorního zvířete při použití imobilizované klostridiální kolagenázy. Kolagenáza samotná má schopnost štěpit všechny tři domény kolagenu na fragmenty a způsobuje tak buněčnou migraci. Důležitou roli při hojení rány tedy je její samotné vyčištění, více informací viz kapitola č. 1.61.6<sup>OBJ</sup>. Imobilizací kolagenázy na nanovláknenný nosič jsme schopni kontrolovat její účinek snížením její autokatalýzy. [77; 78] Experimenty byly srovnány s efektem samotného chitosanového nanovlákná a fyziologického roztoku na hojení rány.

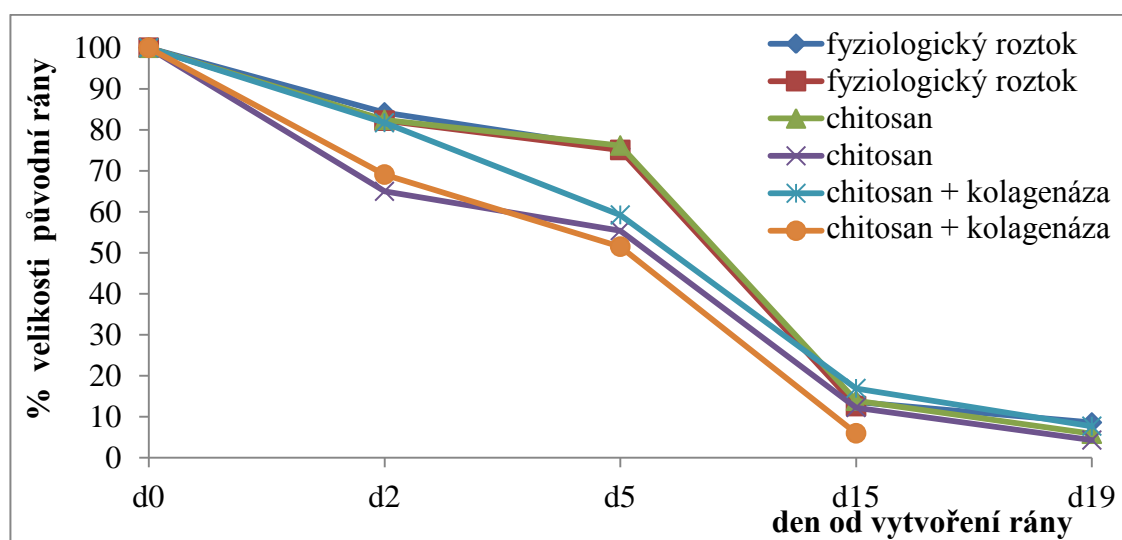
V experimentech byl sledován vliv chitosanová nanovlákná s kolagenázou na hojení excizní (řezné) a nekrotické rány laboratorního potkana. Vzorke chitosanových nanovlákn s navázanou kolagenázou z *Clostridium histolyticum* měly specifickou aktivitu 2,205 - 2,35 µg enzymu / 9,29 mg chitosanového nanovlákná. Experimenty se zvířaty byly provedeny v laboratořích Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### **4.2.1 Hojení excizní rány**

U laboratorních zvířat byla vytvořena kruhová řezná rána s průměrem 20 mm. chitosanová nanovlákná s kolagenázou (plocha po vysušení 1-2 cm<sup>2</sup>) byly aplikovány na ránu podle postupu z kapitoly 3.133.12. Hojení rány bylo sledováno 19 dní. Byl aplikován vzorkový materiál – kolagenáza s chitosanovým nanovláknem, a kontrolní materiály - chitosanové nanovláknó a fyziologický roztok. Rány byly fotografovány a měřeny milimetrovým měřítkem. Byla hodnocena velikost rány a zároveň byla sledována míra epitelizace, tj. hojení rány. Hodnocení velikosti rány podle typu materiálu je shrnuto na obrázku č. 15. Na obrázku č. 16 je hodnocení jednotlivých zvířat.



Obr. č. 15: Průměrné procentuální hodnoty hojení rány jednotlivých skupin krys v závislosti na dni od vytvoření rány.



Obr. č. 16: Hojení rány jednotlivých zvířat v závislosti na dni od vytvoření rány.

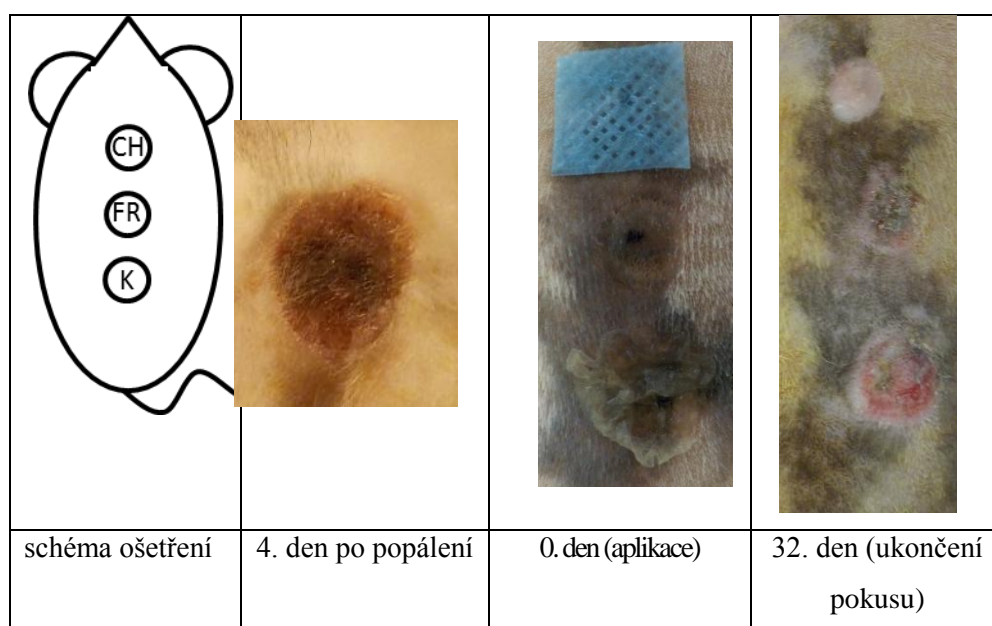
Všechny rány se zahojily velmi rychle 15. až 19. den od vytvoření rány. V zahojení nebyly žádné velké rozdíly. Rány překryté navlhčenou gázou fyziologickým roztokem měly zvířata často k sobě přilepeny, zatímco v případě chitosanového nanovlákná a chitosanového nanovlákná s kolagenázou zůstal na ráně přilepený jen sledovaný materiál a vytvořil strupovitý útvar. Závěrem lze říci, že kolagenáza neurychluje hojení excizní rány.

## 4.2.2 Hojení nekrotické rány

V literatuře se uvádí vhodnost použití kolagenázy pro hojení nekrotické rány [86], tato varianta byla dále experimentálně provedena s kolagenázou imobilizovanou na chitosanovém nanovlákně.

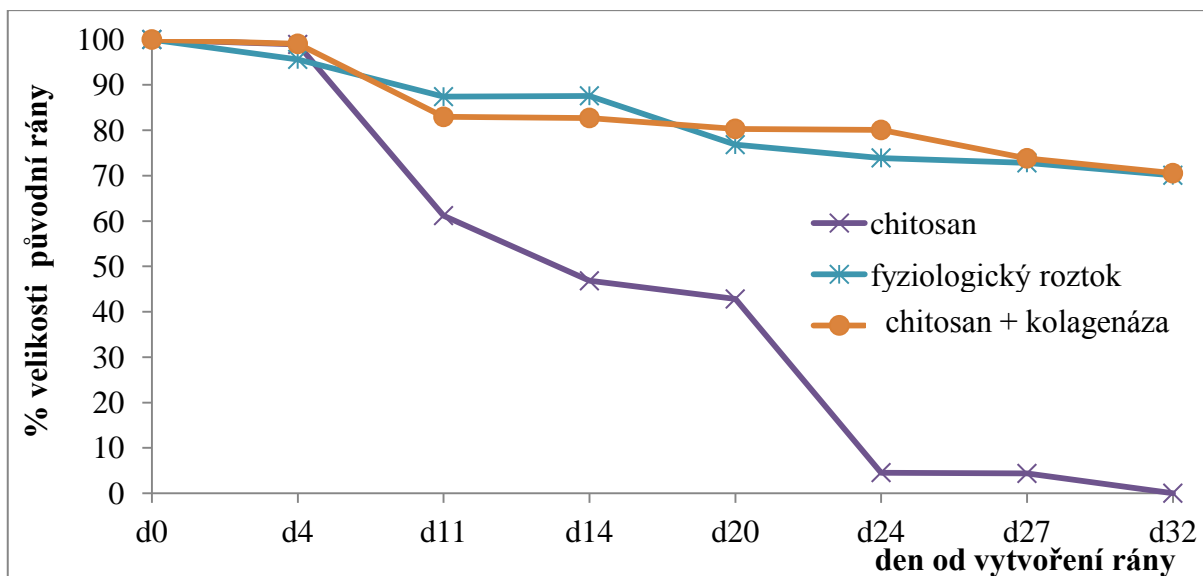
Na hřbetě laboratorních zvířat byly vytvořeny tři nekrotické rány o průměru 1 cm cca 2 cm od sebe (obr. č. 17) zahřátým hliníkovým pečetidlem. chitosanové nanovlákná s kolagenázou byly aplikovány podle postupu z kapitoly 3.13. Hojení rány bylo sledováno 32 dní.

Byl aplikován vzorek – kolagenáza s chitosanovým nanovláknem, a kontrolní materiály - chitosanové nanovlákně a fyziologický roztok. Hodnocení hojení nekrotické rány bylo prováděno stejným postupem jako u hojení excizní rány. Na obr. č. 17 je vyobrazeno vzhled rány v den aplikace, 4. den po popálení a v den ukončení pokusu.



Obr. č. 17: Schéma ošetření a fotografie hojící se nekrotické rány. CH - rána překrytá chitosanovým nanovláknem, FR - rána překrytá pouze gázou navlhčenou fyziologickým roztokem, K - rána překrytá chitosanovým nanovláknem s imobilizovanou kolagenázou.

Prvních pár dní od vytvoření nekrotické rány se vzhled rány neměnil. Následně po týdnu od popálení rána ztmavla a změnila se ve strupovitý útvar. Na obrázku č. 18 jsou shrnuty výsledky hodnocení velikostí rány.



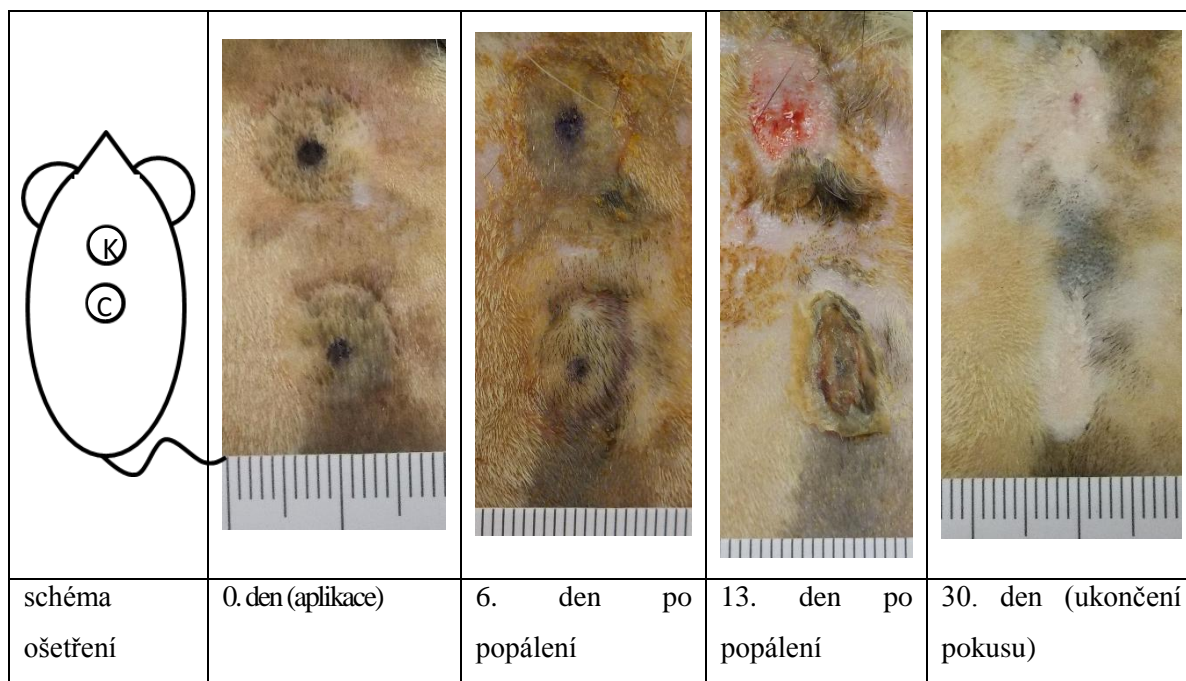
Obr. č. 18. : Velikost nekrotické rány v závislosti na dni od vytvoření rány.

Při pozorování neošetřované rány byly výsledky hojení obdobné jako u ošetřované rány. Po týdnu místo ztmavlo a kůže měla strupovitý charakter, který se 17. den začal odchlípnout a po jeho odstranění byl vidět nový, ale menší strup. Neošetřovaná rána byla 35. den zahojena jen se třemi drobnými strupy. Nejrychleji se hojila rána krytá chitosanem. Hojení rány chitosanem s kolagenázou bylo podobné jako při použití fyziologického roztoku a na hojení nekrotické tkáně neměla žádný výrazný efekt. Na rozdíl od řezné rány se tato rána hojila hlavně epitelizací. Závěrem lze říci, že chitosanové nanovláknko urychluje hojení nekrotické rány.

Navazující experiment byl rozšířen na početnější skupinu laboratorních zvířat. Bylo použito 6 samců starých 24,7 týdnů s průměrnou hmotností 377 g. Na hřbetě laboratorních zvířat byly vytvořeny dvě nekrotické rány o průměru 1 cm cca 2 cm od sebe (obr. č. 19) zahřátým hliníkovým pečtidlem. Byl aplikován vzorkový materiál – kolagenáza s chitosanovým nanovláknkem, a kontrolní materiál - chitosanové nanovláknko podle postupu z kapitoly 3.13. Hojení rány bylo sledováno 30 dní. Vyhodnocení hojení nekrotické rány bylo analogické jako u předchozích dvou experimentů.

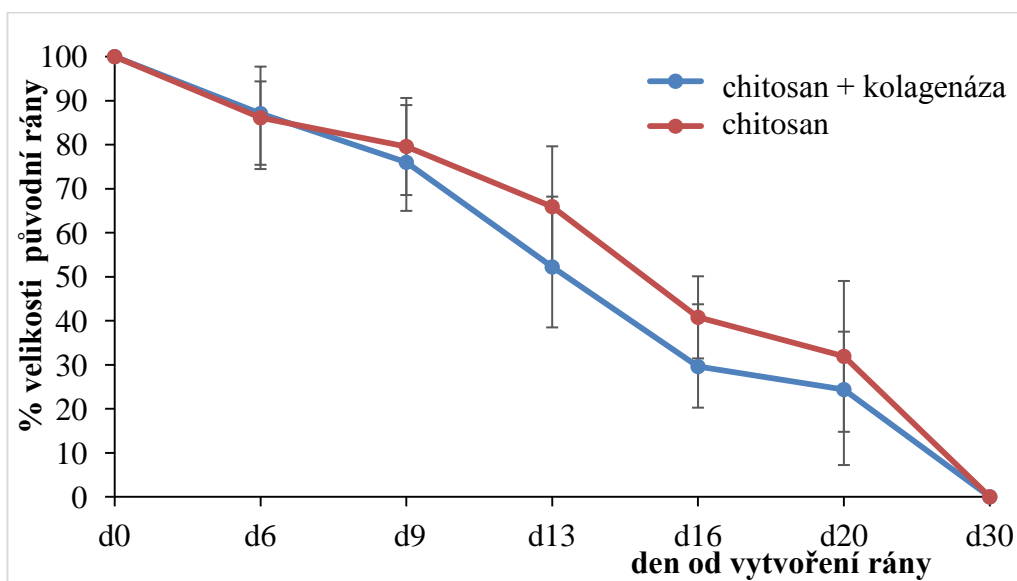
Na obr. č. 19 je vzhled rány v den aplikace, 6. den a 13. den po popálení a v den ukončení pokusu.





Obr. č. 19: Schéma ošetření a fotografie hojící se nekrotické rány. K – rána překrytá chitosanovým nanovláknem s navázanou kolagenázou, C – rána překrytá chitosanovým nanovláknem

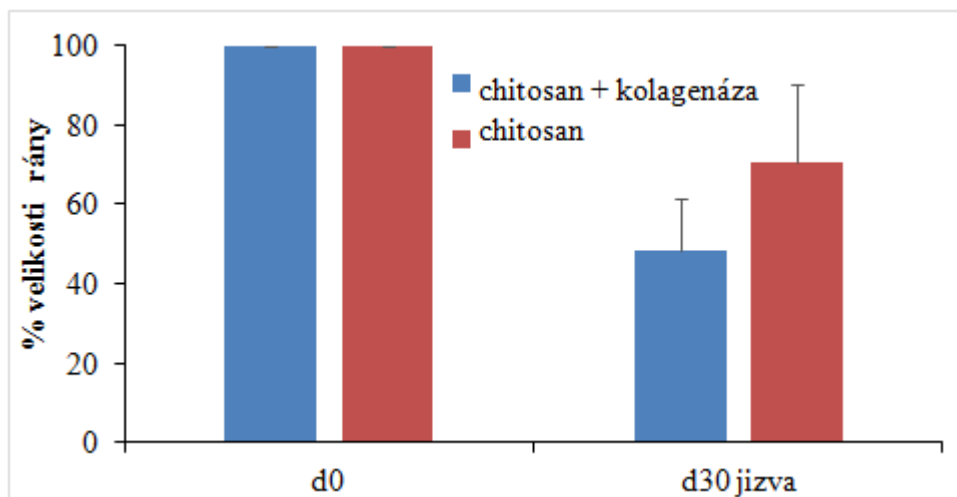
Stejně jako v předchozím experimentu s nekrotickou ránou se prvních pár dní rána se vzorkovým a kontrolním materiálem neměnila, následně ztmavla a vytvořila strupovitý útvar. Při stržení strupu bylo zjištěno, že část rány je zepitelizovaná a na další části se vytváří nový strupovitý útvar. Na obrázku č. 20 jsou shrnuty výsledky hodnocení velikostí rány.



Obr. č. 20 Hojení nekrotické rány v čase. Průměrné hodnoty z 5 zvířat.

Průběh hojení rány ošetřované kolagenasou i chitosanem byl stejný do 9. dne od poranění. Potom se rána s kolagenasou hojila rychleji, a ke konečnému zahojení rány došlo v obou sledovaných skupinách stejně, tj. 30. den.

V experimentu byla dále hodnocena velikost jizvy ve srovnání s velikostí rány podle použitého materiálu na začátku a na konci ošetřování (obr. č. 21)



Obr. č. 21: Porovnání velikosti jizvy s velikostí rány.

Během formování jizvy je správná remodelace kolagenních vláken závislá na rovnováze mezi jejich syntézou a odbouráváním. Fyziologicky degradaci kolagenních vláken zajišťují metaloproteinázy, které jsou produkovány neutrofily, makrofágy a fibroblasty. [28] Velikost jizvy při hojení rány s nanovlákněným nosičem z chitosanu s imobilizovanou kolagenázou byla o 20% menší oproti hojení nekrotické rány pouze s chitosanovým nosičem.

### 4.3 Sledování účinnosti sorpce proteinů na chitosanové nanomateriály

Cílem řady sorpčních experimentů bylo pomocí metod analytické chemie sledovat míru sorpce modelových proteinů kolagenázy a ovalbuminu na nanomateriálové nosiče tvořené chitosanem (nanočástice, nanovlákná). Velmi studované jsou možné aplikace biomateriálů v rychle se vyvíjejícím oboru drug delivery systéms, tedy transportních a aplikačních soustavách, např. v oblastech trans - dermálního nebo trans - mukózního doručování léčiv při hojení ran anebo vývoji slizničních vakcín

Chitosan jako snadno dostupný polysacharid disponuje výhodami biodegradability a biokompatibility pro živé organismy. Chitosanová nanovlákná použitá v této části práce jako srovnávací materiál jsou nanovlákná s průměrem tloušťky 100 - 400 nm. Nanovlákná jsou dobře snášena, ovšem v případě chitosanových nanočástic může být rizikem jejich velikost. Nanočástice menší než 100 nm mohou vstupovat do buněk endocytózou a působit na organismus toxicky. [1; 89] Velikost nanočástic byla 150 a 182 nm a splňuje tak netoxicitu pro potenciální *in vivo* aplikace.

Nosiči modelových proteinů byla chitosanová nanovlákná připravená elektrospiningem ve spolupráci s Ing. M. Munzarovou, Nanovia s.r.o., nanočástice z chitosanu/TPP připravené metodou ionotropního gelovatění podle [43] a kopolymerní nanočástice z chitosanu/PLA/PAA, které byly darem prof. Ing. V. Sedlařika, Ph.D. z Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

Nejjednodušším způsobem provedení sorpce molekul k povrchu nanovláken/nanočástic, je inkubace nanomateriálu v roztocích obsahující proteiny. Na sorpci se podílejí Van der Waalsovy síly, elektrostatické síly, hydrofobní interakce nebo vodíkové vazby. Pro zajištění stability proteinu na materiálu jsou nosiče připraveny vždy tak, aby byly ihned po přípravě použity ke svému účelu, v tomto případě testování obsahu proteinu analytickými metodami.

U jednotlivých nosičů byly použity různé poměry protein/nosič s cílem nejvyšší účinnosti sorpce. Ke sledování míry sorpce proteinů na nanomateriál byl použit test microBCA. Účinnost sorpce a sorpční kapacita nosiče byly hodnoceny také nepřímou kvantifikací zůstatkového proteinu v roztocích testem mikroBCA.

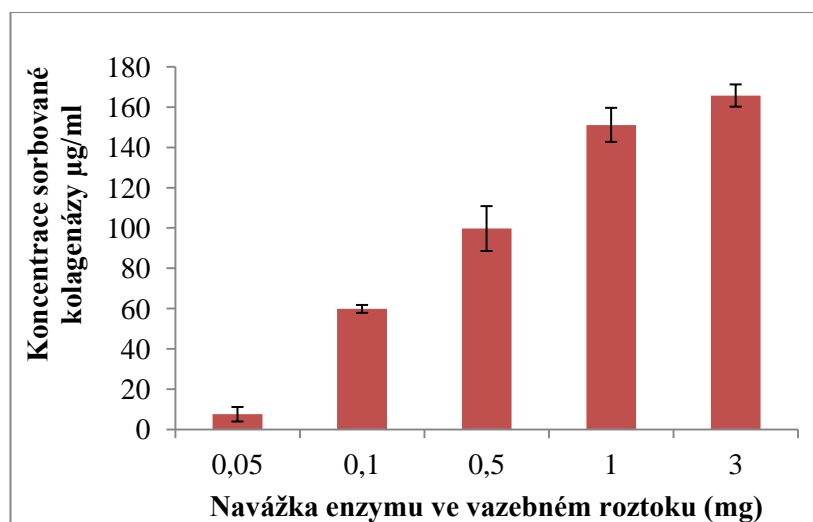
Tyto parametry byly vypočítány podle vztahů (3) a (4), uvedených v [90] Účinnost sorpce je definována jako procento hmotnosti proteinu sorbovaného v polymerním nosiči vzhledem k počátečnímu množství naloženého léčiva. [80; 91]

$$\text{Účinnost sorpce (\%)} = \frac{\text{celkový vložený protein} - \text{nenávázaný protein po vazbě}}{\text{celkový vložený protein}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Sorpční kapacita nosiče} = \frac{\mu\text{g vloženého proteinu} - \mu\text{g nenávázaného proteinu}}{\text{mg CS nanovláken/nanočástic v suchém stavu}} \quad (4)$$

### 4.3.1 Sorpce kolagenázy na chitosanová nanovlákná

Na chitosanová nanovlákná s plošnou hmotností 10 g/m<sup>2</sup> o rozměrech 1,5 x 1,5 cm, byla sorpcí navázána klostridiální kolagenáza v koncentracích 0,05; 0,1; 0,5; 1 a 3 mg/ml zásobního roztoku. Sorpce probíhala po dobu 2 h podle metody z kapitoly 3.6. Hodnocení účinnosti sorpce kolagenázy bylo měřeno přímým měřením na nanovláčkách testem microBCA (obr. č. 22)



Obr. č. 22: Stanovení koncentrace kolagenázy sorbované na nanovláčkách metodou microBCA.

Stoupající trend ve výsledcích sorpce kolagenázy ukazuje na dostatečnou kapacitu nosiče. Ke snížení kapacity dochází s vložením 3 mg proteinu na mg nanovláken.

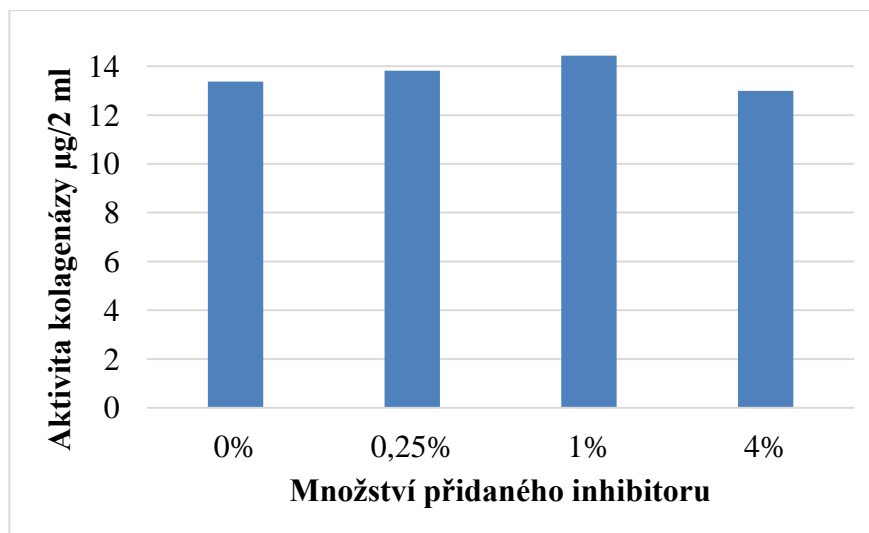
Nepřímé hodnocení, vypočítané z naměřených hodnot koncentrace proteinu v roztocích před sorpcí a po sorpci, tj. účinnost sorpce a sorpční kapacita nosiče je znázorněno v tabulce. č. 7.

Tab. č. 7 : Stanovení koncentrace enzymu navázaného na nanovlákně a nepřímé stanovení účinnosti sorpce a sorpční kapacity metodou microBCA.

navážka enzymu (mg)	Protein/nanovlákně (µg/mg)	účinnost sorpce (%)	sorpční kapacita nosiče (µg/mg)
<b>0,05</b>	7,5 (± 3,6)	39	18
<b>0,1</b>	60 (±1,9)	20	14
<b>0,5</b>	100 (± 11,1)	0	0
<b>1</b>	151 (± 8,5)	0	0
<b>3</b>	166 (± 78,5)	0	0

Z nepřímého hodnocení je vidět, že účinnost sorpce (u navážek 0,05 mg a 0,1 mg) se zvyšujícím množstvím enzymu se netypicky snižuje. Také sorpční kapacita nosiče se se zvyšující koncentrací enzymu snižuje. Tyto trendy jsou nejpravděpodobněji způsobeny autolytickou aktivitou kolagenázy v roztoku.

Proto byla ověřena možnost použití proteázových inhibitorů při sorpčním protokolu. Vhodným typem inhibitoru pro účely dočasného zablokování vazebného místa enzymu při vazbě k nosiči jsou kompetitivní inhibitory [92]. Kompetitivní inhibitor se váže do aktivního centra enzymu a při zvýšení koncentrace substrátu je inhibitor vytěsněn. Při použití nekompetitivního inhibitoru dochází k znemožnění vazby substrátu v důsledku ovlivnění konformace aktivního místa. Pro inhibici kolagenázové aktivity byl použit EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Mini, cOmplete™. V přítomnosti inhibitoru byla stanovena aktivita kolagenázy s cílem zamezit autokatalýze během sorpce podle postupu z kapitoly 3.83.8 (obr. č. 23)

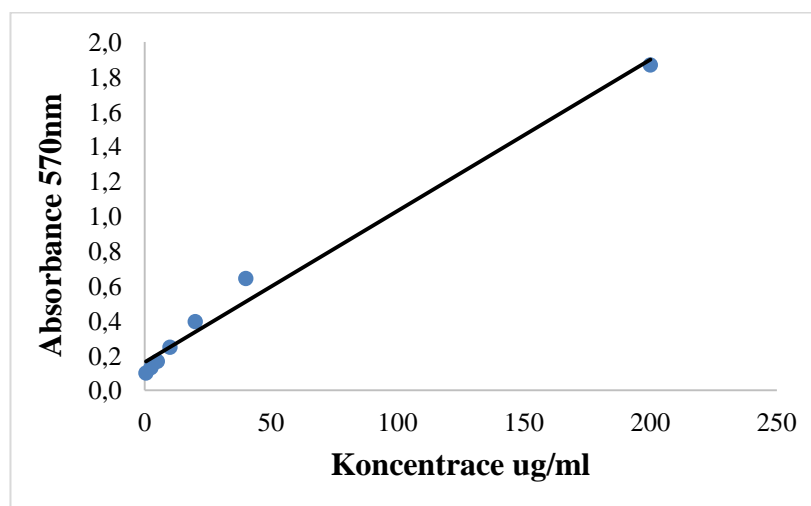


Obr. č. 23: Stanovení kolagenázy v přítomnosti směsi proteázových inhibitorů.

Použití proteázového inhibitoru pro kolagenázu na obr. č. 23 neukázal na efektivní inhibici danou směsí inhibitorů. Kolagenáza použitá v této práci je podle dodavatele směsí enzymů obsahující kolagenázu I., kolagenázu II., clostripain, trypsin a neutrální proteázu. Z výsledků lze předpokládat, že kolagenáza v roztoku velmi rychle ztrácí svoji enzymovou aktivitu, a pro sorpční experimenty není vhodným proteinem. Proto byla do dalších sorpčních experimentů nahrazena modelovým proteinem ovalbuminem.

### 4.3.2 Sorpce ovalbuminu na chitosanová nanovlákná

Ovalbumin je protein o velikosti 44 290 Da a extinkčním koeficientem 6,9 - 7,6. Pro vyjádření koncentrace sorbovaného ovalbuminu byla použita metoda microBCA. Podle pokynů výrobce byla připravena kalibrační řada v objemu 1 ml podle metody 3.9.1 (obr. č. 24)

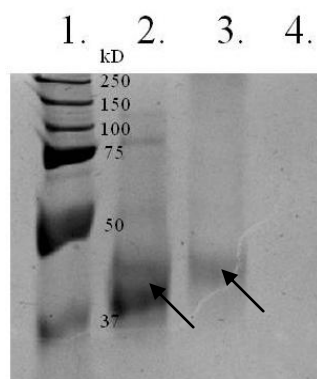


Obr. č. 24: Kalibrace pro stanovení koncentrace ovalbuminu metodou microBCA.

Kalibrační rovnice  $y = 0,0087x + 0,162$  byla použita pro vyhodnocení koncentrace proteinu sorbovaného na nanovláčkách, nanočásticích a v roztocích.

V sadě následujících experimentů byly zkoumány různé poměry ovalbuminu k chitosanovým nanovláčkám. Pro sorpci byly zvoleny chitosanová nanovlákná o rozměru 1,5 x 1,5 cm s plošnou hmotností 10 g/m<sup>2</sup>. Ovalbumin byl sorbován po dobu 2 hodin v koncentracích 0,1; 0,5; 1 a 3 mg podle metody z kapitoly **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.7**.

Základní hodnocení úspěšnosti sorpčních experimentů bylo ověřeno pomocí metody SDS-PAGE podle kapitoly 3.11 (ukázka na obr. č. 25, další elektroforeogramy neuvedeny) a spektrofotometrickým měřením roztoku proteinu před vazbou a po vazbě podle vztahu (2) metodou z kapitoly 3.10 (tab. č. 8 ).



Obr. č. 25 : SDS-PAGE elektroforéza ovalbuminu ( $c= 100 \mu\text{g/ml}$ ) sorbovaného na chitosanové nanovlákně. Pozice: 1 - marker, 2 - vazebný roztok, 3 - roztok po vazbě, 4 - 1. promývací frakce. 10% dělicí gel. Barveno Coomasie Brilliant Blue.

Tab. č. 8 : Stanovení koncentrace ovalbuminu spektrofotometrickou metodou.

Navážka enzymu (mg) *	protein/ vazebný roztok ( $\mu\text{g/ml}$ )	protein v roztoku po vazbě ( $\mu\text{g/ml}$ )	protein v promývacím roztoku ( $\mu\text{g/ml}$ )
0,5	636	241	0
1	637	557	0
3	4045	1579	0

\* Výsledky pro navážky 0,05 a 0,1 mg neuvedeny, pod limitem detekce přístroje.

Z výsledků z SDS-PAGE na obr. č. 25 a výsledků ze spektrofotometrického měření koncentrace proteinu před a po vazbě (tab. č. 8) lze pozorovat snížení koncentrace proteinu před a po sorpci na nanovlákně. Proto je možné předpokládat úspěšnou sorpci ovalbuminu.

Hodnoty koncentrace pro nepřímé hodnocení účinnosti sorpce a sorpční kapacity nosiče byly stanoveny metodou microBCA z kapitoly 3.92 a jsou uvedeny v tabulce č. 9.



Tab. č. 9 : Stanovení koncentrace ovalbuminu navázaného na nanovlákně, účinnosti sorpce a sorpční kapacity metodou microBCA.

Navážka enzymu (mg)	Protein/nanovláknno ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Účinnost sorpce (%)	Sorpční kapacita nosiče ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
<b>0,1</b>	49 ( $\pm 2,2$ ) (49 %)	54	32 (32 %)
<b>0,5</b>	235 ( $\pm 28,1$ ) (47 %)	78	193 (39 %)
<b>1</b>	489 ( $\pm 65,0$ ) (49 %)	75	600 (60 %)
<b>3</b>	888 ( $\pm 6,7$ ) (30 %)	68	1331 (44 %)

Z přímého měření koncentrace ovalbuminu na mg nanovláken vyplývá, že se zvyšujícím se množstvím vloženého ovalbuminu na chitosanová nanovláknna byla detekována zvyšující se koncentrace sorbovaného proteinu. V procentuálním vyhodnocení navážka 3 mg ovalbuminu /mg nanovláken ukazuje jen na 30% výtěžek sorpce na mg nosiče. Tento výsledek může být pravděpodobně ovlivněn sorpcí ovalbuminu do vnitřní struktury nanovláken s nedostupností pro microBCA reagencie.

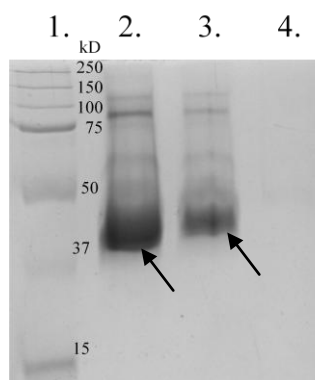
Při vložení 0,1 mg ovalbuminu se na mg nanovláken navázalo 49 % proteinu. Nepřímou metodou byla účinnost sorpce spočítána na 54 %. Další vypočtené hodnoty účinnosti sorpce ovalbuminu ukazují stoupající trend s použitím 0,5 a 1 mg proteinu (78 a 75%). Trend sorpční kapacity nosiče se zvyšujícím se množstvím vloženého ovalbuminu na mg nanovláken stoupá opět do 1 mg vloženého proteinu (60%), při použití 3 mg ovalbuminu jeho míra sorpce klesá (44%). Tento výsledek je také v souladu s výsledky detekovaného ovalbuminu na miligram nanovláknna přímou metodou a také s vypočtenou účinností sorpce.

### 4.3.3 Sorpce ovalbuminu na CS/TPP nanočástice

Pro vazbu ovalbuminu jednoduchou sorpcí byly dále zvoleny chitosanové nanočástice. Nanočástice byly připravené metodou ionotropního gelování chitosanu s anionty tripolyfosfátu (TPP) v poměru 2,5 : 1 v prostředí 0,1 M octanovém pufru s pH 3,3. Principem vzniku nanočástic je spojení opačně nabitých molekul vlivem elektrostatických interakcí, tj. spojení chitosanu jako polykationtu s anionty TPP podle [43]

Ovalbumin byl po dobu 2 hodin sorbován v koncentracích 0,05; 0,1; 0,5; 1 a 3 mg na 2 mg nosiče podle metody z kapitoly 3.7.

Úspěšnost sorpčních experimentů byla ověřena stejným způsobem jako u předchozích experimentů, a to pomocí SDS-PAGE podle metody z kapitoly 3.11 (ukázka na obr. č. 26, další elektroforeogramy neuvedeny) a spektrofotometrickým měřením roztoku proteinu před vazbou a po vazbě podle metody z kapitoly 3.10 (tab. č. 10).



Obr. č. 26: SDS-PAGE elektroforéza ovalbuminu ( $c = 500 \mu\text{g/ml}$ ) sorbovaného na nanočástice CS/TPP. Pozice: 1 - marker, 2 - vazebný roztok, 3 - roztok po vazbě, 4 - 1. promývací frakce. 10% dělicí gel. Barveno Coomassie Brilliant Blue.

Tab. č. 10: Stanovení koncentrace ovalbuminu spektrofotometrickou metodou.

Navážka enzymu (mg)*	protein/vazebný roztok ( $\mu\text{g/ml}$ )	protein v roztoku po vazbě ( $\mu\text{g/ml}$ )	protein v promývacím roztoku ( $\mu\text{g/ml}$ )
0,5	428	198	15
1	872	356	12
3	2060	1087	56

\* Výsledky pro navážky 0,05 a 0,1 mg neuvedeny, pod limitem detekce přístroje.

Z výsledků z SDS-PAGE na obr. č. 26 a výsledků ze spektrofotometrického měření (tab. 10) lze pozorovat nižší koncentrace proteinu před a po sorpci ovalbuminu. A tak předpokládáme úspěšnou sorpci proteinu na nanočástice.

Hodnoty koncentrace pro nepřímé hodnocení účinnosti sorpce a sorpční kapacity nosiče byly stanoveny metodou microBCA z kapitoly 3.9 a jsou uvedeny v tabulce č. 11.

Tab. č. 11: Stanovení koncentrace ovalbuminu na nanočásticích CS/TPP, účinnosti sorpce a sorpční kapacity nosiče metodou microBCA.

Navážka enzymu (mg)	Protein/nanočástice ( $\mu\text{g}/2\text{mg}$ )	Účinnost sorpce (%)	Sorpční kapacita nosiče ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
<b>0,05</b>	0	8	3 (6 %)
<b>0,1</b>	0	3	2 (2 %)
<b>0,5</b>	14 ( $\pm 0,9$ ) (3%)	13	40 (8 %)
<b>1</b>	39 ( $\pm 2,2$ ) (4%)	21	135 (14 %)
<b>3</b>	176 ( $\pm 32,7$ ) (6%)	51	761 (25 %)

Z přímého měření koncentrace ovalbuminu na 2 mg nanočástic CS/TPP bylo zjištěno, že se zvyšujícím se množstvím vloženého ovalbuminu opět stoupá míra sorpce proteinu. U navážek 0,05 mg a 0,1 mg ovalbuminu nebyl metodou microBCA detekován sorbovaný protein na nanočásticích, a při hodnocení účinnosti sorpce nepřímou metodou byla spočítána účinnost sorpce 8 % a 3 %. U navážek 0,5 mg; 1 mg a 3 mg ovalbuminu vložených na vzorek nanočástic byla přímou metodou detekována velmi nízká koncentrace ovalbuminu 3 %, 4% a 6 %, pravděpodobně ukazující na molekuly ovalbuminu ve vnitřní struktuře materiálu nedostupné pro stanovení mikroBCA reagensy. Nepřímá metoda ukazuje na zvyšující se

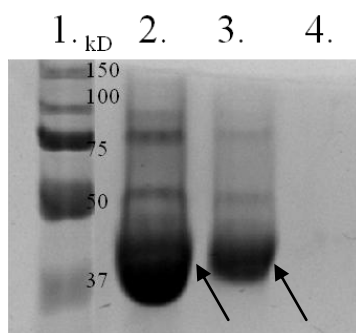
účinnost sorpce 13 %, 21 % a 51 %. Tyto procentuální výsledky pouze ukazují na stoupající, ale nízký trend míry sorpce ovalbuminu na CS/TPP nanočástice. Také sorpční kapacita nosiče ukazuje na stoupající trend s maximem 25% (761  $\mu\text{g}$  ovalbuminu/mg nanočástic).

Velké rozdíly mezi přímým měřením koncentrace proteinu na nanočásticích a nepřímým hodnocením mohou být dále způsobeny ztrátami nanočástic při manipulaci s nimi.

#### 4.3.4 Sorpce ovalbuminu na kopolymerní nanočástice CS/PLA/PAA

Pro vazbu ovalbuminu jednoduchou sorpcí byly dále použity kopolymerní nanočástice CS/PLA/PAA připravené komplexační technikou do formy nano-submikro částic na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Lyofilizované částice byly rehydratovány dle postupu z kapitoly 3.4. Ovalbumin byl po dobu 2 hodin sorbován v koncentracích 0,1; 0,5; 1 a 3 mg na 2 mg nosiče podle metody z kapitoly 3.77.

Úspěšnost sorpce byla vyhodnocena stejným postupem jako u předchozích experimentů pomocí SDS-PAGE podle metody z kapitoly 3.11 (ukázka na obr. 27, další elektroforeogramy neuvedeny) a spektrofotometrickým měřením roztoku proteinu před vazbou a po vazbě podle metody z kapitoly 3.10 (tab. č. 12 ).



Obr. č. 27: SDS-PAGE elektroforéza ovalbuminu ( $c= 500 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) sorbovaného na kopolymerní nanočástice CS/PLA/PAA. Pozice: 1 - marker, 2 - vazebný roztok, 3 - roztok po vazbě, 4. 1. promývací frakce. 10% dělicí gel. Barveno Coomasie Brilliant Blue.

Tab. č. 12 : Stanovení koncentrace ovalbuminu spektrofotometrickou metodou.

Navážka enzymu (mg)*	protein/ vazebný roztok (µg/ml)	protein v roztoku po vazbě (µg/ml)	protein v promývacím roztoku (µg/ml)
0,5	375	139	15
1	765	314	24
3	1753	970	140

\*Výsledky pro navážku 0,1 mg neuvede, pod limitem detekce přístroje.

Z výsledků z SDS-PAGE na obr. č. 27 a výsledků ze spektrofotometrického měření koncentrace proteinu před a po vazbě (tab. č. 12) lze pozorovat nižší množství proteinu po vazbě a předpokládáme tak úspěšnou sorpci proteinu na nanočástice.

Hodnoty koncentrace pro nepřímé hodnocení účinnosti sorpce (tabulka č. 13) a sorpční kapacity nosiče byly stanoveny metodou microBCA.

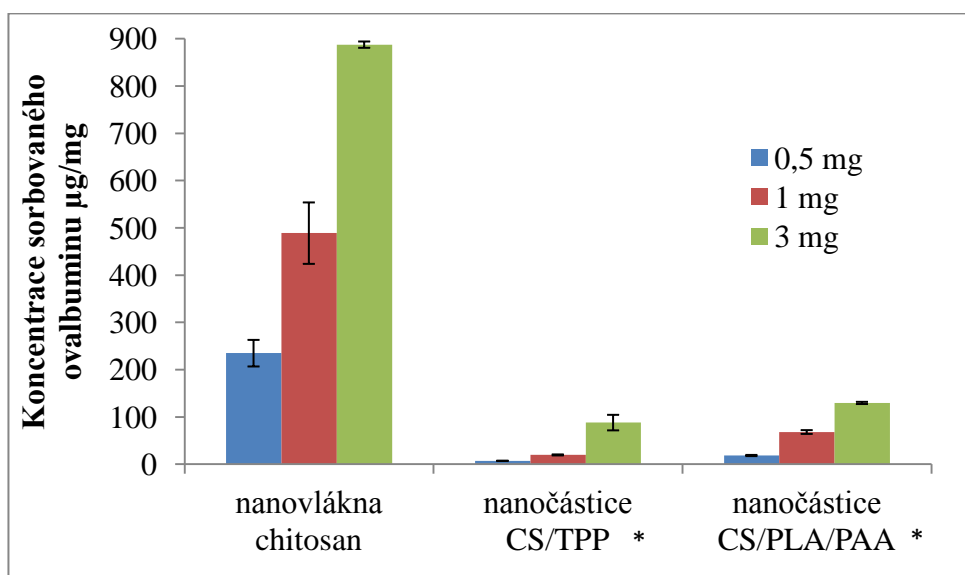
Tab. č. 13: Stanovení koncentrace proteinu na kopolymerních nanočásticích CS/PLA/PAA, účinnosti sorpce a sorpční kapacity nosiče metodou microBCA.

navážka enzymu (mg)	protein/ nanočástice (µg/ 2 mg)	účinnost sorpce (%)	sorpční kapacita nosiče (µg/mg)
0,1	81 (± 1,3) (81 %)	31	22 (22 %)
0,5	37 (± 2,5) (7 %)	58	167 (33 %)
1	136 (± 7,9) (14 %)	67	540 (54 %)
3	259 (± 4,6) (9 %)	46	695 (23 %)

Z přímého měření koncentrace ovalbuminu na 2 mg kopolymerních nanočástic CS/PLA/PAA vyplývá, že se zvyšujícím se množstvím vloženého ovalbuminu se zvyšuje koncentrace sorbovaného proteinu. Procentuální hodnocení přímou metodou 81%; 7 %; 14% a 9 % ukazuje velký pokles míry sorpce a na molekuly ovalbuminu ve vnitřní struktuře materiálu, které jsou nedostupné pro reagentie microBCA testu. Účinnost sorpce hodnocená nepřímou metodou ukazuje na nejvyšší účinnost sorpce při vložení 1 mg proteinu na nanočástice (67%). Stejný trend ukazuje sorpční kapacita nosiče s maximem 54 % při 1 mg vloženého proteinu (540 µg ovalbuminu/mg nanočástic). Velké rozdíly mezi přímým měřením koncentrace proteinu na nanočásticích a nepřímým hodnocením také mohou být způsobeny ztrátami nanočástic při manipulaci s nimi.

#### 4.3.5 Porovnání účinnosti sorpce z přímého a nepřímého měření proteinu na nanomateriálu

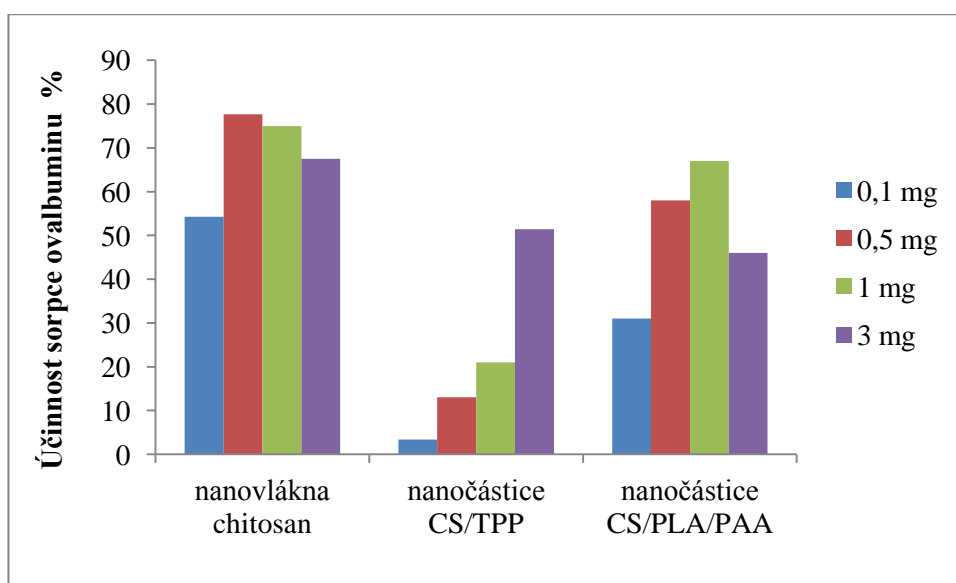
Z předchozích výsledků bylo provedeno srovnání účinnosti sorpce ovalbuminu (obr. č. 28) z přímého měření proteinu metodou microBCA všech zkoumaných nanomateriálu, a to: chitosanových nanovláken, chitosanových nanočástic (CS/TPP) a nanočástic z kopolymeru chitosanu (CS/PLA/PAA) z navážek vloženého enzymu 0,5 mg, 1mg a 3mg. Nižší vložené navážky nebyly zahrnuty do vyhodnocování výsledků.



Obr. č. 28: Stanovení sorpce ovalbuminu na biomateriály přímou kvantifikací. (\* vztaženo na vzorek 2 mg nanočástic)

Z výsledků lze říci, že u všech pozorovaných nanomateriálů došlo se zvyšujícím se množstvím vloženého ovalbuminu ke vzrůstu množství sorbovaného proteinu. Největší výtěžky sorbovaného ovalbuminu prokázala chitosanová nanovláknna, což je možné vysvětlit jejich vláknitou strukturou a ztrátami nanočástic při manipulaci s nimi. Nanočástice s kopolymeru chitosanu CS/PLA/PAA poskytovaly vyšší výtěžky sorbovaného proteinu než chitosanové nanočástice CS/TPP.

Na dalším grafu bylo provedeno srovnání účinnosti sorpce ovalbuminu (obr. č. 29) nepřímou kvantifikací zůstatkového proteinu v roztoku metodou mikroBCA.



Obr. č. 29: Srovnání účinnosti sorpce z nepřímého měření proteinu na chitosanových nanovláknnech, chitosanových nanočásticích CS/TPP a nanočásticích z kopolymeru chitosanu (CS/PLA/PAA).

Účinnost sorpce vyhodnocená nepřímým měřením vykazovala stoupající trend pouze u nanočástic z chitosanu, kde s narůstajícím množstvím vloženého enzymu narůstalo množství sorbovaného proteinu. U chitosanových nanovláken je nejvyšší účinnost sorpce pozorována u navážky 0,5 ug proteinu. U nanočástic z kopolymeru chitosanu CS/PLA/PAA je největší účinnost sorpce u navážky 1 mg vloženého ovalbuminu.

#### 4.4 Sledování kinetiky uvolnění ovalbuminu z nanočástic

U nanočástic použitých v této práci byla sledována míra a kinetika desorpce, tedy uvolnění proteinu, při laboratorní teplotě do 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 podle metody z kapitoly 3.7. Uvolňování proteinu z nanočástic závisí na vlastnostech nanomateriálu, tzn. na chemické struktuře polymeru, na proteinu samotném, i metodě uchycení proteinu a na reakčních podmínkách experimentu jako např. pH, teplotě, iontové síle a chemickém složení prostředí. [93]

Na nanočástice CS/PLA/PAA a CS/TPP bylo sorbováno 1 a 3 mg ovalbuminu na 2 mg částic. Vzorek byl v objemu 1 ml fosfátového pufru pH 7,3 a celý objem supernatantu byl několikrát celý vyměněn. Koncentrace proteinu uvolněného do supernatantů byla změřena pomocí microBCA testu podle metody z kapitoly 3.9.3 (viz tabulka č. 14). Zároveň byla měřena koncentrace ovalbuminu v samostatném alikvotu částic, který sloužil jako 100% hodnota pro vynesení kumulativních křivek.

Tab. č. 14: Uvolňování ovalbuminu z nanočástic CS/TPP a CS/PLA/PAA sledované v promývacích frakci metodou microBCA.

Navážka enzymu (mg)	Protein/nanočástice (µg/2mg)	Protein/ 1. promývací frakce (µg /ml)	Protein/ 2. promývací frakce (µg /ml)	Protein/ 3. promývací frakce (µg /ml)
<b>Nanočástice CS/PLA/PAA</b>				
<b>1</b>	136 (± 7,9)	72 (± 5,9)	6 (± 1,0)	1 (± 0,9)
<b>3</b>	259 (± 4,6)	204 (± 10,6)	32 (± 2,6)	1(± 1,2)
<b>Nanočástice CS/TPP</b>				
<b>1</b>	39 (± 2,2)	9 (± 2,2)	0	0
<b>3</b>	176 (± 32,8)	84 (± 19,3)	0	0

U obou pozorovaných nanočásticích došlo se zvyšujícím se množství vloženého proteinu ke zvýšení množství nasorbovaného ovalbuminu na nanočásticích.

Z výsledků sledování uvolňování ovalbuminu z nanočástic CS/PLA/PAA lze říci, že největší koncentrace proteinu se uvolní již při prvním promytí. U navážky 3 mg vloženého proteinu se při prvním promytí uvolnilo 79 % sorbovaného ovalbuminu a u navážky 1mg vloženého



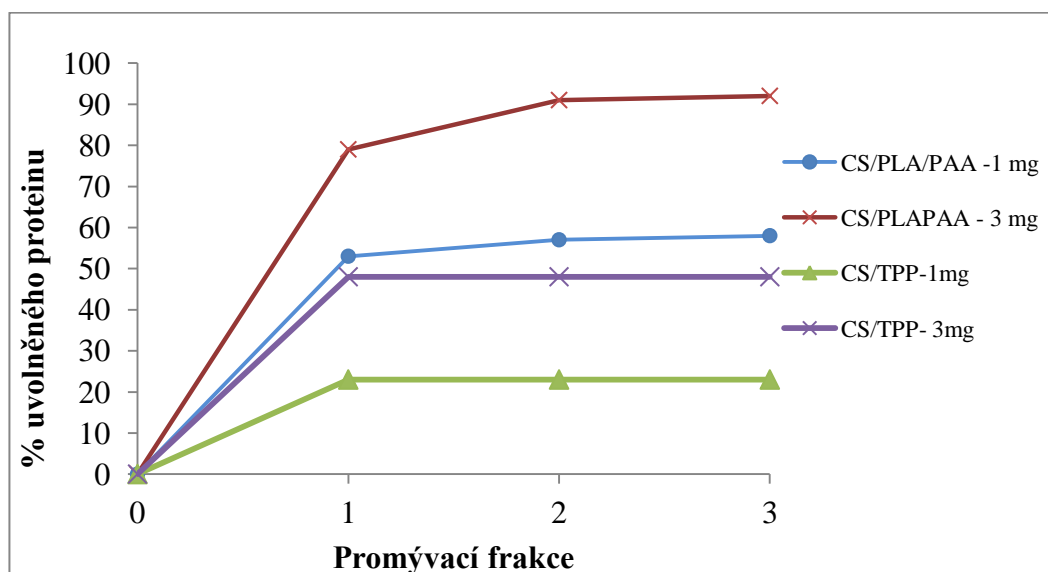
proteinu 53% sorbovaného ovalbuminu. V druhé a třetí frakci frakci se kinetika uvolňování ovalbuminu zpomalila.

Při sledování uvolňování ovalbuminu z nanočástic CS/TPP bylo zjištěno, že se veškerý nasorbovaný protein uvolnil při prvním promytí. U navážky 3 mg vloženého proteinu se při prvním promytí uvolnilo 48 % sorbovaného ovalbuminu a u navážky 1mg vloženého proteinu 23 % sorbovaného ovalbuminu. Část proteinu pravděpodobně zůstala pevněji sorbovaná k funkčním skupinám chitosanu anebo ve struktuře nanočástic a mohla by se uvolnit s degradací jejich materiálu.

Pro vyhodnocení kinetiky uvolnění ovalbuminu byla použita metoda kumulativní křivky uvedená v [11; 36; 43; 80; 90]. Kumulativní křivky vyjadřují koncentraci uvolněného ovalbuminu do promývacích frakcí. Výpočet byl proveden podle rovnice (5) a vyjadřuje procento uvolněného proteinu z proteinu detekovaného na nanočásticích [80] :

$$\text{uvolněný protein (\%)} = \frac{\text{koncentrace proteinu v promývací frakci}}{\text{koncentrace proteinu na nanočásticích}} \times 100 \quad (5)$$

Kumulativní křivky uvolňování ovalbuminu z nanočástic CS/PLA/PAA a CS/TPP jsou graficky vyjádřeny na obrázku č. 30.



Obr. č.:30: Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z nanočástic CS/PLA/PAA a CS/TPP v promývacích frakcích

U nanočástic CS/PLA/PAA pozorujeme, u obou navážek 1 a 3 mg ovalbuminu, pozvolnější uvolňování ovalbuminu, což je pravděpodobně ovlivněno funkcionalizací povrchu nanočástice skupinami COOH kyseliny polymléčné a polyakrylamidové, které potlačují efekt uvolňování proteinu. Pozvolnější uvolňování pravděpodobně způsobují elektrostatické interakce mezi karboxylovou skupinou a pozitivně nabitě molekuly proteinu. U nanočástic CS/TPP dochází k okamžitému uvolnění veškerého sorbovaného proteinu již při prvním promytí. Fenomén pozvolného uvolňování proteinu do uvolňovacího média je žádoucím efektem pro kontrolované uvolňování léčiva [82].

## 5 ZÁVĚR

Kolagenáza z *Clostridium histolyticum* byla imobilizována na chitosanová nanovlákná připravená metodou elektrospiningu. K imobilizaci byla použita karbodiimidová metoda s aktivačními činidly EDC a S-NHS. Cílem přípravy nosiče s imobilizovanou kolagenázou bylo ověření předchozích výsledků, výběr nejvhodnější navážky kolagenázy na vzorek nanovláken a následná aplikace na excizní a nekrotické rány. Neaktivnější proteolytický nosič byl připraven s navážkou 3 mg kolagenázy, vykazující aktivitu 5,34  $\mu\text{g}/\text{mg}$  nanovlákná.

Efekt imobilizované kolagenázy na hojení rány experimentálních zvířat byl testován ve spolupráci s dr. R. Köhlerovou z pracoviště Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Jednou z možností enzymového debridementu k podpoře hojení ran je v současnosti použití masti s obsahem mikrobiální kolagenázy (Iruxol<sup>TM</sup>). Při hodnocení účinku chitosanového nanovlákná s imobilizovanou kolagenázou na excizní (řeznou) ránu nebylo pozorováno urychlení hojení ani změna ve velikosti jizvy. Naopak při aplikaci stejného nosiče na nekrotickou ránu byl prokázán účinek na urychlení hojení rány i velikost výsledné jizvy. Rychlost hojení u nanovlákná s imobilizovanou kolagenázou probíhala v rámci sledovaného období rychleji, ale v konečném výsledku při srovnání s chitosanovým nanovláknem k zahojení rány došlo ve stejný den, tj. 30. den od vytvoření rány. Zajímavým zjištěním bylo, že velikost jizvy při hojení rány s nanovlákným nosičem z chitosanu s imobilizovanou kolagenázou byla o 20 % menší oproti hojení nekrotické rány pouze s chitosanovým nosičem

V druhé části práce byly sledovány 3 různé nanomateriály s obsahem chitosanu, na které byl sorbován modelový protein. Při sorpci kolagenázy znemožnilo její autolytické štěpení hodnocení míry sorpce a bylo od jejího použití ustoupeno. Modelovým proteinem byl pro další experimenty zvolen ovalbumin. Struktura nanočástic CS/TPP a kopolymerních nanočástic CS/PLA/PAA byla modifikována prostou sorpcí. Srovnávacím materiálem byly chitosanová nanovlákná. Sorpční vlastnosti byly hodnoceny přímou a nepřímou metodou.

U chitosanových nanovláken bylo zjištěno, že hranice sorbovaného proteinu se zvyšující se koncentrací vloženého ovalbuminu je 1 mg/ml. Vyšší navážka (3 mg) ovalbuminu ukázala jen na 30% výtěžek sorpce. Při nepřímém vyhodnocení trend sorpční kapacity nosiče stoupal až na 1331  $\mu\text{g}$  ovalbuminu/mg nanovlákná. Procentuálně nejvyšší sorpční kapacita nosiče byla dosažena při vložení 1 mg ovalbuminu (60 %).

Nanočástice CS/TPP prokázaly poměrně dobré sorpční vlastnosti, které s rostoucím množstvím vloženého ovalbuminu stoupaly, nejlepší výsledek sorpce byl dosažen s 3 mg vloženého ovalbuminu na 2 mg nanočástic. Při porovnání výsledků z přímého měření účinnosti sorpce ovalbuminu na nanočásticích byly zaznamenány velké rozdíly, které pravděpodobně ukazují na nedostupnost ovalbuminu ve vnitřní struktuře materiálu reagencím microBCA testu a také na ztráty nanočástic během manipulace s nimi.

Stejně rozdíly mezi přímým a nepřímým vyhodnocením sorpce ovalbuminu byly zaznamenány u nanočástic CS/PLA/PAA. Z přímého hodnocení nanočástic CS/PLA/PAA bylo zjištěno, že účinnost sorpce se zvyšující se navázkou vloženého proteinu snižuje. Naopak hodnocení nepřímou metodou ukázalo, že nejvyšší účinnost sorpce je při vložení 1 mg proteinu na nanočástice (67%). Maximum sorpční kapacity nosiče byla 540  $\mu$ g ovalbuminu/mg nanočástic při 1 mg vloženého proteinu

U modelových systémů nanočástic CS/TPP a CS/PLA/PAA byla sledována kinetika uvolňování ovalbuminu do 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 pomocí microBCA stanovení proteinu ve frakcích a přípravou kumulativních kinetických křivek. Nanočástice CS/TPP při vloženém množství ovalbuminu 1 mg a 3 mg uvolnily největší koncentraci sorbovaného proteinu do první promývací frakce (48 %; 23 %). Nanočástice CS/PLA/PAA uvolňovaly ovalbumin pozvolně, při vložení 1 a 3 mg se do první frakce se uvolnilo 79 % a 53 % ovalbuminu, do druhé 4 % a 12 % ovalbuminu a do třetí 0,7 % a 0,4 %. Závěrem lze říci, že nosiče s kombinací kyseliny polymléčné (PLA) a polyakrylové (PAA) jsou vhodnějším materiálem pro aplikace nosičů *in vivo*, kde je žádoucí pomalé uvolňování látky z matrice nosiče.

## Použitá literatura

- [1] Vaculíková, E.; Plachá, D.; Jampílek, J., 2015. *Toxikologie nanoforem nosičů léčiv*. Chemické listy, 109, s. 346-352.
- [2] Rani, K.;Paliwal, S., A., 2014. *Review on Targeted Drug Delivery: its Entire Focus on Advanced Therapeutics and Diagnostics*. Scholars Journal of Applied Medical Sciences, 2 (1C), s. 328-331.
- [3] Fonseca, A. C.; Ferreira, P.; Cordeiro, R., A.; Mendonça, P., V.; Góis, J., R.; Gil, M., H.;Coelho, J., F., J., 2013. *Drug delivery systems for predictive medicine: Polymers as tools for advanced applications*. New Strategies to Advance Pre/Diabetes Care: Integrative Approach by PPPM, 3, s. 399-455.
- [4] Bennet, D.; Kim, S., 2014. *Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery*. InTech, s. 258 - 284. ISBN: 978-953-51-1628-8
- [5] Jesus, S.; Fragal, E., H.; Rubira, A., F.; Muniz, E., C.; Valente, A., J. M.; Borges, V., 2017. *The Inclusion of Chitosan in Poly-ε-caprolactone Nanoparticles: Impact on the Delivery System Characteristics and on the Adsorbed Ovalbumin Secondary Structure*. AAPS PharmSciTech, 19 (1), s. 101 - 113.
- [6] Borges, O.; Borchard, G.; de Sousa, A.; Junginger, H., E.; Cordeiro-da-Silva, A., 2007. *Evaluation of the immune response following a short oral accination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 27 (4-5), s. 278 - 290.
- [7] Sezer, A., D., 2014. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech, s. 522. ISBN: 978-953-51-1628-8
- [8] Ranade, V., V.; Cannon, J., B., 2011. *Drug delivery Systems, Third Edition*. CRC Press, s. 79-82. ISBN 9781439806180
- [9] Mansour, H., M.; Sohn, M.; Al-Ghananeem, A.; DeLuca, P., P., 2010. *Materials for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects*. International Journal of Molecular Sciences, 11 (9), s. 3298-3322.
- [10] Uchechi,O.; Ogbonna,J. D. N.; Attama, A., A. *Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery*. InTech, 2014, s. 194 -223. ISBN: 978-953-51-1628-8
- [11] Kavaz, D.; Kirac, F.; Kirac, M.; Vaseashta, A., 2017. *Low releasing mitomycin c molecule encapsulated with chitosan nanoparticles for intravesical installation*. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 8 (04), s. 203 - 219.
- [12] Bajpai, A., K.; Bajpai, J.; Kumar, R., S.; Agrawal, P.; Tiwari, A., 2016. *Smart biomaterials devices: Polymers in Biomedical Sciences*. CRC PRESS, s. 65-133. ISBN 978-1-4987-0698-8.
- [13] Wang, O., 2017*Smart Materials for Tissue Engineering:Applications*. Royal Society of Chemistry, s. 194-219. ISBN-13: 978-1782624844
- [14] Heness, G.; Ben-Nissan B, 2004. *Innovative bioceramics*. Materials forum, 27(2004), s. 104-114.

- [15] Šnejdrová, E.; Dittrich, M., 2011. *Poly ( $\alpha$ - hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv*. Chemické listy, 105(1), s. 27-33.
- [16] Bailey, A., J.; Paul, R., G., 1998. *Collagen is not so simple protein*. J Soc Leather Technol Chem, 82 (3), s. 104-108.
- [17] Santoro, M.; Tataro, A., M.; Mikos, A., G., 2014. *Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering*. Journal of Controlled Release, 190, s. 210-218.
- [18] Jeong, L.; Park, H., W., 2014. *Preparation and Characterization of Gelatin Nanofibers Containing Silver Nanoparticles*. Int. J. Mol, 15 (4), s. 6857-6879.
- [19] Susheel, K., 2015. *Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*. Springer, 2015, s. 189-201. ISBN 978-3-319-25322-0
- [20] Kasaai, M., R.; Arul, J.; Charlet, G., 2013. *Fragmentation of Chitosan by Acids*. The Scientific World Journal. 2013, s. 1-12
- [21] Nowacki, M.; Nowacka, K.; Kloskowski, T.; Pokrywczyńska, M.; Tyloch, D.; Rasmus, M.; Warda, K.; Drewa, T., 2017. *Are agricultural and natural sources of bio-products important for modern regenerative medicine? A review*. Ann Agric Environ Med, 24 (2), s. 207–212.
- [22] Lee, K., J.; Mooney, D., J., 2012. *Alginate: properties and biomedical applications*. Prog Polym Sci., 37(1), s. 106-126.
- [23] -Zhang, Ch.; Yang, F. *Preparation and characterization of hydrophilic modification of polypropylene non-woven fabric by dip-coating PVA (polyvinyl alcohol)*. Separation and Purification Technology. 61(3), s. 276-286.
- [24] Jeličová, M. *Funkcionalizace materiálů pro přípravu scaffoldů v regenerativní medicíně*. Pardubice, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Mgr. Marcela Slováková, Ph. D.
- [25] Petráš, D.; Kimmer, D.; Soukup, K.; Klusoň, P., 2009. *Bezpečná nanovlákná*. Chemické listy, 103, s. 1003-1016.
- [26] Bidarra, S., J.; Barrias, C., C.; Granja, P., L., 2014. *Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering*. Acta Biomater, 10 (4), s. 1646–1662.
- [27] Státní ústav pro kontrolu léčiv - SÚKL. [online] Praha, 2017. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0004269> [9.5.2018]
- [28] Mallefet, P.; Dweck, A., C., 2008. *Mechanisms involved in wound healing*. The Biomedical Scientist, roč./č. July, s. 609-615.
- [29] Meyer, K.; Palmer, J., W., 1934. *The polysaccharide of the vitreous humor*. The Journal of the Biological Chemistry, 107, s. 629 - 634.
- [30] Collins, M., N.; Birkinshaw, C., 2013. *Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review*. Carbohydrate Polymers, 92 (2), s. 1262 -1279.

- [31] Aezeden, M.; Xing, M., 2012. *Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering*. Int. J. Burns Trauma, 2 (1), s. 29-41.
- [32] Sha, L.; Chen, Z., Chen, Zh.; Zhang, A.; Yang, Z., 2016. *Poly(lactic Acid) Based Nanocomposites: Safe and Biodegradable Materials in Biomedical Field*. International Journal of Polymer Science, 10, s. 1-11.
- [33] Cao, H.; Kuboyama, N., 2010. *A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ $\beta$ -TCP for bone tissue engineering*. Bone, 46 (2), s. 386-395.
- [34] Choo, K.; Ching, Y., C.; Chuah, C., H.; Julai, S.; Liou, N., S., 2016. *Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol)-chitosan composite films reinforced with cellulose nanofiber*. Materials (Basel), 9 (8), s. 644.
- [35] Yang, M., Lai, S., K.; Yu, T.; Wang, Y.-Y.; Happe, C.; Zhong, W.; Hanes, J., 2014. *Nanoparticle penetration of human cervicovaginal mucus: The effect of poly(vinyl alcohol)*. Official Journal of the Controlled Release Society, 192, s. 202–208. 045 [6.9.2017]
- [36] Peng, H.; Dong, R.; Wand, S.; Zhang, Z.; Luo, M.; Bai, Ch.; Zhao, Q.; Li, J.; Chen, L.; Yiong, H., 2013. *A pH-responsive nano-carrier with mesoporous silica nanoparticles cores and poly(acrylic acid) shell-layers: Fabrication, characterization and properties for controlled release of salidroside*. International Journal of Pharmaceutics, 446 (1-2), s. 153-159.
- [37] Górecka, E.; Jastrzębska, M., 2011. *Immobilization Techniques And Biopolymer Carriers – A Review*. Biotechnology and Food Science, 75(1-2), s. 27-34.
- [38] Zamani, M.; Prabhakaran, M., P.; Ramakrishna, S., 2013. *Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials*. Int J. Nanomedicine, 8, s. 2997-3017.
- [39] Sill, T., J.; von Recum, H., A., 2008. *Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering*. Biomaterials, 29 (13), s. 1989-2006.
- [40] Bock, N.; Dargaville, T., R.; Woodruff, M., A., 2012. *Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art*. Progress in Polymer Science, 37 (11), s. 1510-1551.
- [41] Nawalakhe, R.; Shi, Q.; Vitchuli, N.; Noar, J.; Caldwell, J., M.; Breidt, F.; Bourham, M., A.; Zhang, X.; McCord, M., G., 2013. *Novel atmospheric plasma enhanced chitosan nanofiber/gauze composite wound dressings*. Journal of applied Polymer Science, 129 (2), s. 916-923.
- [42] Dyer, M.; Hinchcliffe, M.; Watts, P.; Castile, J.; Jabbal-Gill, I.; Nankervis, R.; Smith, A.; Illum, L., 2002. *Nasal Delivery of Insulin Using Novel Chitosan Based Formulations: A Comparative Study in Two Animal Models between Simple Chitosan Formulations and Chitosan Nanoparticles*. Pharmaceutical Research, 19 (7), s. 998-1008.
- [43] Biswas, S.; Chattopadhyay, M.; Sen, K., K.; Saha, M., K., 2015. *Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice*. Carbohydrate Polymers, 121, s. 403-410.
- [44] Khodabandehloo, H.; Zahednasab, H.; Ashrafi, H., A., 2016. *Nanocarriers Usage for Drug Delivery in Cancer Therapy*. Int J Cancer Manag, 9 (2), s. 3966.

- [45] Üner, M.; Yener, G., 2007. *Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives*. Int J Nanomedicine, 2 (3), s. 289-300.
- [46] Douša, M.; Nováková, L., 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. UPOL, s. 15 - 244. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [47] Cruchoa, C., I., C.; Barros, M., T., 2017. *Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. Review*. Materials Science and Engineering: C, 80, s. 771-784.
- [48] Lin, P-G.; Lin, S.; Wand, P., C.; Sridhar, R., 2014. *Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. Review*. Biotechnology Advances, 32, (4), s. 711-726.
- [49] Mitič, Ž.; Stolič, A.; Stojanovič, S.; Najman, S.; Ignjatovič, N.; Trajanovič, M., 2017. *Instrumental methods and techniques for structural and physicochemical characterization of biomaterials and bone tissue: A review*. Materials Science and Engineering: C, 79, s. 930-949.
- [50] Rodriguez B. A. G.; Trindade E. K. G.; Cabral, D. G. A.; , Soares E. C.L.; Menezes C. E. L. Ferreira; D. C. M.; Mendes, R. K.; Dutra R. F. *Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor*. Intech, 2015. ISBN: 978-953-51-2173-2
- [51] Krishnamoorthi S, Banerjee A, Roychoudhury A., 2015. *Immobilized Enzyme Technology: Potentiality and Prospects*. J Enzymol Metabol, 1(1), s. 104 - 114.
- [52] Guisan J. M., 2006. *Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press Inc, s. 377. ISBN 978-1-59745-053-9
- [53] Homaei A.A.; Sarri R.; Vianello F.; Stevanato R., 2013. *Enzyme immobilization: an update*. J Chem Biol, 6(4), s. 185- 205.
- [54] S.; Iqbal J., 2001. *Immobilization and stabilization of papain on chelating sepharose: a metal chelate regenerable carrier*. J Biotech, 4 (3), s. 120-124.
- [55] Mohamad, N., R.; Marzuki, N., H., C; Buang, N., A.; Huyop, F.; Wahab, R., A., 2015. *An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes*. Biotechnol Biotechnol Equip, 29 (2), s. 205-220.
- [56] Gupta, M., N.; Raghava, S., 2011. *Enzyme stabilization via cross-linked enzyme aggregates*. Methods Mol Biol., 679, s. 133-145.
- [57] Sawaengsak, C.; Mori, Y.; Yamanishi, K.; Mitrevej, A.; Sinchaipanid, N., 2014. *Chitosan nanoparticle encapsulated hemagglutinin-split influenza virus mucosal vaccine*. AAPS PharmSciTech, 15 (2), s. 317 - 325.
- [58] Heger, Z.; Eckschlager, T.; Stiborová, M.; Adam, V.; Zítka, O.; Kizek, R., 2015. *Modern Nanomedicine in Treatment of Lung Carcinomas*. Klin Onkol, 28 (4), s. 245-250.
- [59] Maeda, H.; Matsumura, Y., 1986. *A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs*. Cancer Research, 46 (12), s. 6387-6392.
- [60] Batist, G.; Barton, J.; Chaikin, P.; Swenson, C.; Welles, L., 2002. *Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy*. Expert Opin Pharmacother, 3 (12), s. 1739-1751.



- [61] Wickia, A.;Witzigmann, D.;Balasubramanianc, V.;Huwylerb, J., 2015. *Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications*. Journal of Controlled Release, 200, s. 138-157.
- [62] Hua, S.; Marks, E.; Schneider, J., J.; Keely, S., 2015. *Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. A review*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 11 (5), s. 1117-1132.
- [63] Banerjee, A.; Qi, J.; Gogoi, R.; Wong, J.; Mitragotr, S., 2016. *Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery*. Journal of Controlled Release, 238, s. 176-185.
- [64] Liu, L.; Zhou, C.; Xia, X.; Liu, Y., 2016. *Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: preparation and functional evaluation*. International Journal of Nanomedicine, 11, s. 761-769.
- [65] Kraan, H.; Vrieling, H.; Czerkinsky, C.; Jiskoot, W.; Kersten, G.;Amorij, J-P., 2014. *Buccal and sublingual vaccine delivery*. Journal of Controlled Release, 190, s. 580-592.
- [66] Kathe, K.; Kathpalia, H., 2017. *Film forming systems for topical and transdermal drug delivery*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 12 (6), s. 487-497.
- [67] Klouda, P.; 2003. *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, s. 132. ISBN 808636907-2.
- [68] Gornall, A., G.; Bardawill, C., J.; David, M., M., 1949. *Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction*. CO O Journal of Biological Chemistry, 177 (2), s. 751–766.
- [69] Lowry, O., H.; Rosebrough, N., J.; Farr, A., L.; Randall, R. J., 1951. *Protein measurement with folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, 193 (1), s. 265-75.
- [70] ThermoFisher Scientific. [online] Pittsburgh, 2016. Dostupné: [www.thermofisher.com/proteinassays](http://www.thermofisher.com/proteinassays) [24. 1. 2018]
- [71] Smith, P., K.; Krohn, R., I.; Hermanson, G., T.; Mallia, A., K.; Gartner, F., H.; Provenzano, M., D.; Fujimoto, E., K.; Goeke, N., M.; Olson, B., J.; Klenk, D., C., 1985. *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 163 (1), s. 76-85.
- [72] Bradford, M., M., 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976, 72, s. 248-254.
- [73] Hames,B., 1998. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach, 3rd ed*. Oxford University Press, s. 13 - 78. ISBN 0199636419.
- [74] Fornaguera, C.; Solans, C., 2017. *Methods for the In Vitro Characterization of Nanomedicines—Biological Component Interaction*. Journal of personalized medicine, 7 (2), s. 1-16.
- [75] Charensriwilaiwat, N.; Opanasopit, P.; Rojanarata, T.; Ngawhirunpat, T., 2012. *Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing*. International Journal of Pharmaceutics, 427(2), s. 379-384.

- [76] Berce, Ch.; Muresan, M.-S.; Soritau, O.; Petrushec, B.; Tefas, L.; Rigo, I.; Ungureanu, G.; Catoi, C.; Irimie, A.; Timuleasa, C., 2017. *Cutaneous wound healing using polymeric surgical dressings based on chitosan, sodium hyaluronate and resveratrol. A preclinical experimental study*. 163. s. 155-166.
- [77] Serrano, C.; García-fernández, L.; Fernández-Blázquez, J., P.; Barbeck, M.; Ghanaati, S.; Unger, R.; Kirkpatrick, J.; Arzt, A.; Funk, L.; Turón, P.; Del Campo, A., 2015. *Nanostructured medical sutures with antibacterial properties*. *Biomaterials*, 52, s. 291 - 300.
- [78] Tallis, A.; Motley, T. A.; Wunderlich, R., P.; Dickerson, J., E., Jr; Waycaster, C.; Slade, H., B., 2013. *Clinical and Economic Assessment of Diabetic Foot Ulcer Debridement with Collagenase: Results of a Randomized Controlled Study*. *Clinical Therapeutics*, 35 (11), s. 1805 – 1820.
- [79] Demidova-Rice, T. N.; Hamblin, M. R.; Herman, I. M, 2012. *Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: Normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care*. *Adv Skin Wound Care.*, 25(7), s. 304–314.
- [80] Di Martino, A.; Sedlarik, V., 2014. *Amphiphilic chitosan-grafted-functionalized polylactic acid based nanoparticles as a delivery system for doxorubicin and temozolomide co-therapy*. *International Journal of Pharmaceutics*, 474 (1-2), s. 134 - 145.
- [81] Srbová, J.; Slováková, M.; Křípalová, Z.; Žárská, M.; Špačková, M.; Stránská, D.; Bílková Z., 2016. *Covalent biofunctionalization of chitosan nanofibers with trypsin for high enzyme stability*. *Reactive and Functional Polymers*, 104, s. 38-44.
- [82] Hermanson, G., T., 2010. *Bioconjugate techniques*. Academic Press, s. 1323. ISBN 9780123705013.
- [83] Rao, M., B.; Tanksale, A., M.; Ghatge, M., S.; Deshpande, V., V., 1998. *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62 (3), s. 597-635.
- [84] Mozhaev V.V., Melik-Nubarov N.S., Sergeeva M.V., Īknis V., Martinek K., 1990. *Strategy for stabilizing enzymes part one: Increasing stability of enzymes via their multi-point interaction with a support*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 3(3), s. 179–187.
- [85] Mukhopadhyay A., Chakrabarti K., 2015. *Enhancement of thermal and pH stability of an alkaline metalloprotease by nano-hydroxyapatite and its potential applications*. *RSC Advances* 5, 190, s. 89346-89362.
- [86] Li D.; Teoh, W.Y.; Gooding J.J.; Selomulya C.; Amal R.: 2010. *Functionalization strategies for protease immobilization on magnetic nanoparticles*. *Advanced Functional Materials*, 20 (11), s.1767-1777.
- [87] Hinterwirth, H.; Lindner, W.; Lämmerhofer, M., 2012. *Bioconjugation of trypsin onto gold nanoparticles: effect of surface chemistry on bioactivity*. *Anal. Chim. Acta*, 733, s. 90-97.
- [88] Miller, J., D.; Carter, E.; Hatch Jr., D., C.; Zhubrak, M.; Giovinco, N. A.; Armstrong, G., D., 2015. *Use of collagenase ointment in conjunction with negative pressure wound therapy in the care of diabetic wounds: a case series of six patients*. *Diabetic Foot Ankle*, 6 (1), s. 24999.

- [89] Keck, C. M.; Müller, R. H.; 2013 *Nanotoxicological classification system (NCS) - a guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems*. Eur J. Pharm Biopharm, 84 (3), s. 445 - 448.
- [90] Borges, O.; Cordeiro-da-Silva, A.; Romeijn, S., G.; Amidic, M.; De Sousa, A.; Borchard, G.; Jungingerce, H., E., 2006. *Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination*. Journal of Controlled Release, 114 (3), s. 348 - 358.
- [91] Yeo, Y.; Park, K. *Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems*. Arch. Pharm. Res, 2004, 27 (1), s. 1-12.
- [92] Markwardt, F.; Landmann, H., Walsman, P, 1968. *Comparative Studies on the Inhibition of Trypsin, Plasmin, and Thrombin by Derivatives of Benzylamine and Benzamidine*. European J. Biochem, 6 (4), s. 502 - 506.
- [93] Costa P.; Sousa, J.M., 2001 *Modeling and comparison of dissolution profiles*. European J. Biochem, 13(2), s. 123 -133.