

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Částice z chitosanu v kombinaci s SiO<sub>2</sub> mikrovlákny v cíleném doručování  
látek

Bc. Zuzana Heřmánková

Diplomová práce  
2023

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Heřmánková**  
Osobní číslo: **C21471**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Částice z chitosanu v kombinaci s SiO<sub>2</sub> mikrovlákny v cíleném doručování látek**  
Téma práce anglicky: **Preparation of a Composite Nanoparticle Protein Carrier With SiO<sub>2</sub> Fibers**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

Tato práce se zabývá přípravou nanočástic z chitosanu/kyseliny hyaluronové a jejich kombinací s vlákny z oxidu křemičitého. Cílem je připravit a charakterizovat biokompatibilní chitosanový nosič s proteiny. Teoretická část bude obsahovat kapitoly o systémech cíleného doručování proteinů, léčiv aj., o využití SiO<sub>2</sub> materiálů (vláknech, částicích, kompozitech a implantátech), a o jejich kombinaci s biokompatibilními materiály.

### Experimentální část:

1. Optimalizace přípravy částic z chitosanu/kyseliny hyaluronové, charakterizace pomocí DLS a zeta potenciálu. Lyofilizace částic
2. Sorpce/vazba proteinů na nanočástice, na kompozit s SiO<sub>2</sub> vlákny, studium uvolňování proteinů
3. Detekce efektivity vazby proteinů/peptidů (BCA)
4. Vyhodnocení dosažených výsledků, diskuse

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

**Seznam doporučené literatury:**

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Science direct; odborné knihy. Hromádko, L., Macak, J. M. (2017). *ACS Omega*, 2(8), 5052-5059. Další dle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Částice z chitosanu v kombinaci s SiO<sub>2</sub> mikrovlákny v cíleném doručování látek**“ 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.

Dále beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5.5.2023

Zuzana Heřmánková v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi poskytla při zpracování daného tématu diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Dr.-Ing. Janu Macákovi a panu Ing. Lud'ku Hromádkovi z Centra materiálů a nanotechnologií (CEMNAT) za poskytnutí mikrovláken oxidu křemičitého, s kterými jsem pracovala v experimentální části. Poděkování patří také panu doc. Ing. Liboru Červenkoví, Ph.D. za umožnění lyofilizace vzorků.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací biokompatibilního nosiče chitosanových částic v kombinaci s křemičitými mikrovláknny s využitím v oblasti cíleného doručování proteinů a léčiv. Podává teoretický přehled o vybraných polymerech používaných v různých oblastech cíleného doručování látek. Experimentální část je zaměřena na charakterizaci a lyofilizaci připravených nosičových systémů z chitosanu, kyseliny hyaluronové a kompozitu s oxidem křemičitým, na hodnocení účinnosti adsorpce modelového proteinu ovalbuminu na částice a míru uvolnění proteinu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

chitosan, oxid křemičitý, kyselina hyaluronová, ovalbumin, částice, mikrovláknna, cílené doručování

## **TITLE**

Preparation of a composite nanoparticle protein carrier with SiO<sub>2</sub> fibers

## **ANNOTATION**

The diploma thesis deals with the preparation and characterization of a biocompatible carrier made of chitosan particles in combination with silicon microfibers with use in the field of targeted delivery of proteins and drugs. It provides a theoretical overview of polymers used in various areas of targeted drug delivery. It focuses on chitosan and silica biomaterials. The experimental part is focused on the characterization and lyophilization of the prepared carrier systems made of chitosan, hyaluronic acid and a composite with silicon dioxide, on the evaluation of the efficiency of adsorption of the ovalbumin model protein on particles and the rate of protein release.

## **KEYWORDS**

chitosan, silica, hyaluronic acid, ovalbumin, particles, microfibers, drug delivery

## OBSAH

Seznam zkratk a značek .....	12
Úvod.....	13
1 Teoretická část .....	14
1.1 Přehled materiálů pro cílené doručování látek .....	14
1.2 Chitosan.....	19
1.2.1 Struktura a příprava chitosanu v různých formách .....	19
1.2.2 Vlastnosti chitosanu .....	22
1.2.3 Stabilita chitosanu .....	23
1.2.4 Využití chitosanu .....	24
1.3 Oxid křemičitý.....	25
1.3.1 Struktura a příprava vláken/částic oxidu křemičitého.....	25
1.3.2 Vlastnosti materiálů z oxidu křemičitého .....	27
1.3.3 Kompozity s oxidem křemičitým.....	28
1.4 Kompozit chitosanu, kyseliny hyaluronové a oxidu křemičitého .....	31
1.5 Oblasti využití nosičových systémů .....	32
1.5.1 Cílené doručování léčiv.....	32
1.5.2 Hojení a regenerace ran.....	34
1.5.3 Slizniční vakcíny .....	36
1.5.4 Léčba rakoviny .....	38
1.5.5 Zobrazovací činidla .....	39
1.5.6 Tkáňové inženýrství .....	40
1.5.7 Nanotechnologie pro úpravu vody a ovzduší.....	41
1.6 Vybrané metody zpracování a charakterizace materiálů/částic.....	42
1.6.1 Lyofilizace.....	42
1.7 Fyzikálně-chemická charakterizace materiálů .....	44
1.7.1 Měření velikosti částic .....	44

1.7.2	Zeta potenciál částic .....	45
1.7.3	Polydisperzní index .....	45
1.7.4	Velikost pórů .....	46
1.7.5	Míra bobtnání .....	46
2	Cíl práce .....	47
3	Experimentální část .....	48
3.1	Laboratorní přístroje a pomůcky .....	48
3.2	Reagencie a chemikálie .....	49
3.3	Příprava chitosanových částic .....	50
3.4	Příprava chitosanových částic s kyselinou hyaluronovou .....	51
3.5	Příprava kompozitu s chitosanovými částicemi a mikrovlákny oxidu křemičitého .....	51
3.6	Dialýza částic .....	52
3.7	Lyofilizace částic .....	52
3.8	Fyzikálně-chemická charakterizace částic .....	53
3.8.1	Stanovení hydrodynamické velikosti částic .....	53
3.8.2	Stanovení zeta potenciálu částic .....	53
3.8.3	Měření velikosti částic metodou SEM .....	54
3.9	Adsorpce ovalbuminu na připravené částice .....	54
3.10	Stanovení koncentrace ovalbuminu pomocí bicinchoninového testu .....	55
3.11	Vyhodnocení účinnosti adsorpce ovalbuminu na částice a vazebné kapacity částic .....	56
3.12	Kinetika uvolňování ovalbuminu z chitosanových částic .....	57
4	Výsledky a diskuze .....	59
4.1	Příprava a charakterizace chitosanových částic .....	60
4.2	Příprava a charakterizace chitosanových částic s kyselinou hyaluronovou .....	62
4.3	Vliv lyofilizace na fyzikálně-chemické charakteristiky částic .....	63
4.3.1	Hodnocení připravených částic metodou SEM .....	65



4.4	Adsorpce ovalbuminu na částice a vlákna.....	67
4.5	Hodnocení vytvořeného kompozitu s chitosanovými částicemi a mikrovlákny oxidu křemičitého.....	71
4.6	Kinetika uvolňování ovalbuminu z částic .....	73
5	Závěr .....	77
6	Použitá literatura .....	79

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemická struktura chitinu a chitosanu .....	19
Obrázek 2: Katalytické působení chitindeacetyláz .....	20
Obrázek 3: Ukázka různých forem chitosanu .....	20
Obrázek 4: Strukturní vzorec zesíťovaného chitosanu pomocí tripolyfosfátu.....	21
Obrázek 5: TEM snímky mezoporézních nanočástic.....	26
Obrázek 6: FESEM snímek nanovláken CS/PVA/GO .....	41
Obrázek 7: Skenovací elektronové mikrofotografie částic CS:TPP, CS:TPP/HA .....	66
Obrázek 8: Skenovací elektronové mikrofotografie nanočástic chitosanu s mikrovlákny oxidu křemičitého.....	72
Obrázek 9: Skenovací elektronové mikrofotografie samotných mikrovláken oxidu křemičitého.....	72

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnoty kalibrační řady pro metodu BCA.....	56
Tabulka 2: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu CS:TPP částic.....	60
Tabulka 3: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu CS:TPP částic po přípravě a po dialýze .....	61
Tabulka 4: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu CS:TPP/HA částic po přípravě a po dialýze .....	62
Tabulka 5: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu CS:TPP částic před lyofilizací a po lyofilizaci. ....	64
Tabulka 6: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu CS:TPP/HA částic před lyofilizací a po lyofilizaci.....	64
Tabulka 7: Vazebná kapacita nosiče (CS:TPP) .....	69
Tabulka 8: Hodnoty účinnosti adsorpce a vazebné kapacity nosiče částic/vláken .....	70

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Velikost částic CS:TPP a CS:TPP/HA. ....	63
Graf 2: Vliv lyofilizace na CS:TPP a CS:TPP/HA .....	65
Graf 3: Kalibrační křivka ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml pro stanovení koncentrace proteinu .....	68
Graf 4: Účinnost adsorpce OVA na CS:TPP částic .....	68
Graf 5: Účinnost adsorpce OVA (500 µg/ml) u CS:TPP, CS:TPP/HA a SiO <sub>2</sub> .....	70
Graf 6: Účinnost adsorpce OVA 500 µg/ml u CS:TPP a CS:TPP/SiO <sub>2</sub> .....	73
Graf 7: Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z CS:TPP, CS:TPP/HA .....	74
Graf 8: Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z CS:TPP/SiO <sub>2</sub> .....	75

## SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1: Výpočet účinnosti adsorpce v procentech .....	57
Rovnice 2: Výpočet vazebné kapacity nosiče vztažené k hmotnosti částic.....	57
Rovnice 3: Výpočet množství uvolněného ovalbuminu v procentech.....	58

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

BCA metoda	bicinchoninová metoda
CD	diferenciační skupina
CEMNAT	Centrum materiálů a nanotechnologií
CS	chitosan
DDS	drug delivery systém
DLS	dynamický rozptyl světla
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FESEM	stolní elektronový mikroskop s autoemisním zdrojem („Field Emission Scanning Electron Microscope“)
GO	oxid grafenu
HA	kyselina hyaluronová
kDa	kilodalton
OVA	ovalbumin
PCL	polykaprolakton
PDI	polydisperzní index
pI	izoelektrický bod
PEG	polyethylenglykol
PVA	polyvinylalkohol
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SiO <sub>2</sub>	oxid křemičitý
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TGF-beta	transformující růstový faktor beta
TNF-alfa	tumor nekrotizující faktor alfa
TPP	tripolyfosfát sodný

## ÚVOD

Cílené doručování látek nabývá stále většího významu v oblasti biomedicínského výzkumu a lékařství, a to díky stále se rozvíjejícím možnostem, jak efektivněji a bezpečněji doručovat léčivé látky. Jednou z metod, jak zajistit účinné doručení látek do konkrétního místa, je použití nosičových systémů. Tyto systémy umožňují zvýšit efektivitu a účinnost terapie, snížit vedlejší účinky léčiv a zlepšit pacientům kvalitu života. Z tohoto důvodu je důležité vyvíjet a zkoumat nové materiály a technologie pro výrobu těchto nosičů. Současný stav výzkumu ukazuje, že existuje mnoho různých materiálů a technologií pro výrobu nosičů, nicméně stále existuje řada problémů, které brání jejich širšímu využití v praxi.

Mezi nejpoužívanější materiály pro výrobu nosičů patří přírodní a syntetické polymery. Jedním z materiálů, které se v poslední době uplatňují v oblasti nosičových systémů, je chitosan. Jedná se o biopolymer získávaný z chitinu, který lze v přírodě nalézt například v cytoskeletu korýšů. Chitosan má mnoho žádoucích vlastností jako je například biodegradabilita, biokompatibilita a schopnost vytvářet komplexy s řadou látek.

Jiným nosičem léčivých látek je oxid křemičitý. V přírodě se vyskytuje jako amorfni nebo krystalická forma a má mnoho vlastností, které umožňují jeho využití v oblasti nosičových systémů, a to především dobrá mechanická a tepelná odolnost. V kombinaci s chitosanem může mít potenciál v použití pro vytvoření biokompatibilního kompozitu v cíleném doručování látek.

Experimentální práce se zaměřuje na přípravu a charakterizaci nosičů z chitosanových částic. Cílem bylo navrhnout stabilní nosič s vysokou účinností adsorpce a řízeným uvolňováním proteinu. Porovnáním výsledků bude vybrán nejvhodnější nosič, se kterým bude vytvořen kompozit s mikrovláknou oxidu křemičitého. Využití tohoto kompozitu může být zajímavou možností pro vývoj nových nosičů v oblasti léčby a diagnostiky nemocí, hojení a regenerace ran či v tkáňovém inženýrství.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Přehled materiálů pro cílené doručování látek

V současné době se pro nosičové systémy v cíleném doručování látek vyvíjí celá řada inovativních materiálů. Vůbec prvním polymerem, který byl použit v 60. letech 20. století pro cílené doručování léčiv, byl silikonový kaučuk [1]. Jeho vlastnosti jako je biokompatibilita a netoxicity lze využít v systémech pro dodávání léčiv nebo jako implantáty v řadě lékařských oblastí [1].

Materiály pro cílené doručování látek musí splňovat určitá kritéria, především biokompatibilitu, netoxicitu a biodegradovatelnost. Nesplnění těchto podmínek hrozí riziko spuštění imunitní reakce, v horším případě až poškození organismu. Je také potřebné vyvinout různé typy materiálů z důvodu rozdílné cesty dodávání látek do těla. Pro každou z cest podání (perorální, nazální, transdermální, vaginální, intravenózní aj.) existují pozitiva i negativa, a proto je důležité zvolit vhodný materiál pro danou aplikaci [2].

Materiály lze rozdělit na přírodní a syntetické polymery.

### Přírodní polymery

Přírodní polymery jsou jedny z nejpoužívanějších materiálů pro cílené doručování, a to z důvodu jejich přirozené biokompatibility a biodegradability. Mohou být metabolizovány a přirozeně se rozkládat v těle, což minimalizuje riziko vedlejších účinků [3].

Mezi přírodní polymery lze zařadit například:

*Chitosan (CS)* – je polysacharid získávaný deacetylací chitinu, má vynikající biokompatibilitu a biodegradabilitu. Je využíván zejména v systémech doručování látek jako nosič léčiv, proteinů a pro regeneraci tkání [4].

*Kyselina hyaluronová (HA)* – je polysacharid, který se nachází v mnoha tkáních v těle, jako je například synoviální tekutina, která obklopuje klouby. Její předností pro využití v DDS je schopnost vázat vodu a zlepšovat hydrataci tkání. Tento biopolymer hraje významnou roli také při hojení ran, buněčné proliferaci či angiogenezi [5].

*Dextran* – jedná se o polysacharid složený z glukózových jednotek, které jsou spojeny glykosidickými vazbami. Vyrábí se bakteriální fermentací sacharózy pomocí mikroorganismů rodu *Leuconostoc* nebo *Streptococcus*. Dextran má několik vlastností, které ho dělají vhodným pro cílené doručování léčiv. Patří mezi ně biodegradabilita, biokompatibilita, nízká toxicita, schopnost tvořit různé formy hydrogelu, schopnost vázat

se na bílkoviny a selektivně se hromadit v nádorových tkáních. Díky těmto vlastnostem se dextran používá k doručování léčiv do nádorových tkání, kde může být léčivo uvolňováno pomalu a cíleně [6].

*Alginát* – je další přírodní polymer, který se používá pro cílené doručování léčiv, a to konkrétně do gastrointestinálního traktu a do krevního oběhu. Jedná se o polysacharid, který se získává z řas rodu *Laminaria* a *Macrocystis*. Má schopnost tvořit gelové struktury v přítomnosti vápenatých iontů, dokáže vázat kovy a organické sloučeniny, zvyšuje stabilitu léčiv [7]. Alginát ve formě hydrogelu je také vhodným materiálem pro hojení ran. Hydrogely udržují přirozeně vlhké prostředí a snižují riziko bakteriální infekce. Dále se používá jako bioinkoust do 3D tiskáren pro tvorbu tkání [8].

*Kolagen* – je bílkovina, která tvoří většinu tkání v těle a má schopnost udržovat pevnost a pružnost tkání. Též se hojně využívá v cíleném doručování léčiv, a to zejména k regeneraci tkání a kostí v těle. Kolagenové hydrogely se používají jako nosiče pro růstové faktory a cytokiny, které mohou podpořit proces hojení ran [5].

*Škrob* – patří mezi polysacharidy získané ze zelených rostlin. Hlavními výhodami je biologická odbouratelnost, nízká pořizovací cena a celkově dobrá dostupnost, snadná modifikovatelnost. Využívá se v různých oblastech jako je potravinářství, farmacie, papírenský průmysl, textilní průmysl a jako nosič pro léčiva v systémech cíleného doručování látek [6].

*Celulóza* – je polysacharid složený z řetězců glukózových jednotek a tvoří základní strukturní složku buněčných stěn rostlin a některých řas. V oblasti cíleného doručování léčiv je využívána jako nosič pro pomalé a cílené uvolňování léčiva. Tyto nosiče lze použít k terapeutickému účelu při léčbě mnoha různých onemocnění, včetně rakoviny, infekcí a chronických chorob. Konkrétním příkladem léčiva proti rakovině v kombinaci s nanocelulóзовými částicemi je lék doxorubicin [9]. Jedná se o cytostatikum, které se často používá k léčbě různých typů rakoviny, jako je například rakovina prsu, plic, jater, ledvin a další. Celulóza se mimo jiné využívá ve formě hydrogelů. Hydrogely z celulózy jsou vhodné pro nosiče léčiv nebo jako náhrady tkání. Celulóza se používá také k výrobě povlakových vrstev léčiv ve formě tablet, z důvodu odolnosti vůči žaludeční kyselosti a postupnému uvolňování léčiv [10]. Celulóza je tedy velmi důležitým materiálem ve farmacii a má mnoho různých aplikací v léčbě a prevenci onemocnění. Díky své biokompatibilitě a snadné modifikovatelnosti se očekává, že bude v budoucnu stále více využívána při vývoji nových léčiv a terapeutických výrobků.

*Přírodní anorganické polymery* – mezi ně lze řadit oxid křemičitý, křemičitan vápenatý, oxid titaničitý, zlaté, stříbrné, měďnaté, magnetické nano- nebo mikročástice, aj.

*Oxid křemičitý* – je přírodní anorganický polymer složený z křemičitanových tetraedrů, které jsou spojeny kyslíkovými vazbami. Oxid křemičitý má několik vlastností, které ho dělají vhodným pro cílené doručování léčiv. Patří mezi ně biodegradabilita, biokompatibilita, nízká toxicita, schopnost tvorby stabilních koloidních roztoků a schopnost vázat organické sloučeniny. Oxid křemičitý se používá k doručování léčiv orální cestou, kde se využívá jeho schopnosti vázat léčiva a pomalu je uvolňovat v trávicím traktu. Oxid křemičitý ve formě silikagelu má antimikrobiální účinky a vysokou absorpční kapacitu, což se také uplatňuje při výrobě obvazových materiálů [11].

*Křemičitan vápenatý* – tento anorganický polymer se používá k výrobě kostních implantátů, protože má podobné chemické vlastnosti jako kostní tkáň. Mezoporézní nanočástice křemičitanu vápenatého se používají jako nosiče léčiv pro dlouhodobé uvolňování gentamicinu a fibroblastového růstového faktoru-2 [12]. Jiné mezoporézní nanokompozity se skládají z magnetických nanočástic oxidu železa jako jádra a křemičitanu vápenatého jako obalu. Jejich hlavní výhodou je vysoký specifický povrch, velký obsah pórů, vysoká kapacita lékové náplně pro ibuprofen nebo docetaxel [13].

*Oxid titaničitý* – tento anorganický biomateriál má z důvodu dobré mechanické a antikorozi odolnosti a biokompatibility slibné využití v ortopedii a zubních implantátech [14].

*Stříbrné nanočástice* – mají antibakteriální vlastnosti, a to konkrétně proti gramnegativním bakteriím *Escherichia coli*. Stříbrné nanočástice dokážou interagovat s buněčnými stěnami bakterií a narušovat metabolismus a buněčné dýchání tvorbou reaktivních forem kyslíku. Mezi další vlastnosti nanočástic stříbra patří vysoký poměr povrchu k objemu, což zvyšuje jejich reaktivitu k okolí. Další vlastností je snadná syntéza a modifikace částic. Stříbrné nanočástice však mají tendenci se ve vyšších koncentracích shlukovat a mohou tak být pro tělo toxické. Nižší koncentrace stříbrných nanočástic se využívají v oblasti hojení ran. Aplikují se na povrch rány jako desinfekční prostředek v podobě gelů, krémů nebo obvazů a díky svým antimikrobiálním vlastnostem dokáží eliminovat potenciálně infekční bakterie, viry a plísňe [15].

*Zlaté nanočástice* – jedním z hlavních využití nanočástic zlata v medicíně je cílené doručování léčiv. Díky svému malému rozměru a vysoké povrchové ploše jsou nanočástice zlata schopny snadno proniknout do tkání a buněk a cíleně uvolňovat léčivé látky. Mají katalytické vlastnosti, dobrou vodivost, jsou biokompatibilní. Dalším využitím nanočástic



zlata jsou zobrazovací techniky. Nanočástice zlata jsou schopny absorbovat elektromagnetické záření v různých vlnových délkách, což umožňuje jejich použití jako kontrastní činidla pro zobrazování v různých oblastech, jako je například diagnostika rakoviny. Také se využívají pro čištění odpadních vod [16].

*Měďnaté nanočástice* – měďnaté nanočástice jsou potenciální alternativou k zlatým nanočásticím pro cílené doručování léčiv. Měďnaté nanočástice mají antimikrobiální, protizánětlivé a protirakovinné vlastnosti. V kombinaci s kurkuminem se předpokládá, že by mohly být účinné v léčbě rakoviny prsu. Nedávný výzkum ukázal, že nanočástice mědi s kurkuminem mohou selektivně zabít nádorové buňky prsu a inhibovat růst nádoru [17]. Nicméně je třeba provést další výzkumy, aby byla potvrzena jejich bezpečnost a účinnost.

Použití přírodních biomateriálů pro výrobu nosičů pro cílené doručování látek může být výhodné, protože jsou obecně bezpečnější a šetrnější k tělu než syntetické materiály. Nicméně, i přírodní materiály mohou mít určitá omezení v použití, jako například jejich nízká stabilita nebo náchylnost k degradaci a agregaci v závislosti na podmínkách [3].

### Syntetické polymery

Syntetické polymery mají oproti přírodním polymerům některé výrazné výhody. Jednou z nich je možnost kontroly velikosti a tvaru. Syntetické polymery mohou být přesně vyrobeny v požadované velikosti a tvaru. To umožňuje výrobcům připravit nanočástice s konkrétní velikostí, což je důležité pro zajištění správného transportu a uvolňování léčiv.

Další výhodou je vyšší stabilita. Syntetické polymery jsou obecně stabilnější a mechanicky odolnější než přírodní materiály, což zvyšuje jejich účinnost. Další výhodou je možnost modifikace, díky které lze přizpůsobit vlastnosti polymerů pro konkrétní aplikace. Například lze změnit jejich hydrofilní nebo hydrofobní povahu nebo přidat funkční skupiny, které umožní jejich použití pro specifické účely [2]. Syntetické polymery mají i několik nevýhod oproti přírodním biopolymerům. Mezi tyto nevýhody patří vyšší riziko toxicity. Mnoho syntetických polymerů není biodegradabilních, což znamená, že se v těle hromadí a mohou být pro tělo toxické. Syntetické polymery jsou též často obtížněji zpracovatelné než přírodní polymerové materiály, což může zvyšovat náklady na výrobu a omezení jejich použití. Při výběru nosiče je důležité zvážit jak jeho výhody, tak i nevýhody a volit takový materiál, který bude co nejefektivnější a zároveň bezpečný pro pacienta [2].

Zde jsou uvedeny příklady některých syntetických polymerů v cíleném doručování látek:

*Polyethylenglykol (PEG)* – se řadí do skupiny polyetherů, které obsahují etherovou funkční skupinu v hlavním řetězci. PEG patří mezi hydrofilní polymery, díky čemuž je schopen vázat velké množství vody. Snadno se rozpouští ve vodných roztocích a dokáže interagovat s biologickými materiály, jako jsou proteiny, sacharidy a lipidy. Jednou z vynikajících vlastností PEG je takzvaná PEGylace. Při PEGylaci dochází k chemické modifikaci, při které se na molekuly léčiva, proteinu aj. naváže polyethylenglykol za účelem zlepšení stability a snížení imunogenicity molekul. Molekuly, které jsou pokryty PEG, mohou být v těle déle zachovány, což zvyšuje pravděpodobnost, že cíleně dorazí na místo působení. Naopak nevýhodou tohoto procesu může být zvýšená akumulace PEG v těle po uvolnění léčiva, a to především v játrech. Zatím není zcela objasněný vliv hromadění látek na případnou toxicitu a škodlivost pro lidské zdraví. Dále hraje také roli vyšší cena a celkově obtížnější syntéza PEG [2].

*Polykaprolakton (PCL)* – je dalším zástupcem syntetických polymerů, který se řadí do skupiny alifatických polyesterů. PCL vyniká svou měkkostí a rozpustností při nízkých teplotách, což usnadňuje jeho zpracování do různých forem, jako jsou filmy, vlákna nebo částice. PCL má také vynikající biokompatibilitu a biodegradabilitu. Z důvodu nepřítomnosti enzymů pro hydrolýzu polykaprolaktonu v lidském těle je jeho doba degradace prodloužena na měsíce až roky. Z tohoto důvodu se PCL využívá v oblasti farmacie jako nosič pro cílené doručování léčiv pro dlouhodobé uvolňování nebo jako materiál pro výrobu stálých a stabilních implantátů v tkáňovém inženýrství. PCL se často kombinuje do kompozitu s chitosanem, celulózou nebo kyselinou polymléčnou [2].

*Polyvinylalkohol (PVA)* – je hydrofilní polymer, který se používá jako excipient pro zlepšení stability a rozpustnosti léčiv. V nedávné studii byla použita nanovlákna z PVA v kompozitu s uhlíkovými kvantovými tečkami, nanočásticemi oxidu křemičitého a vlákny fibroinu k hojení ran u potkanů. Byla prokázána lepší reepitelizace a rychlejší růst srsti po použití zmíněných nanovláken [18].

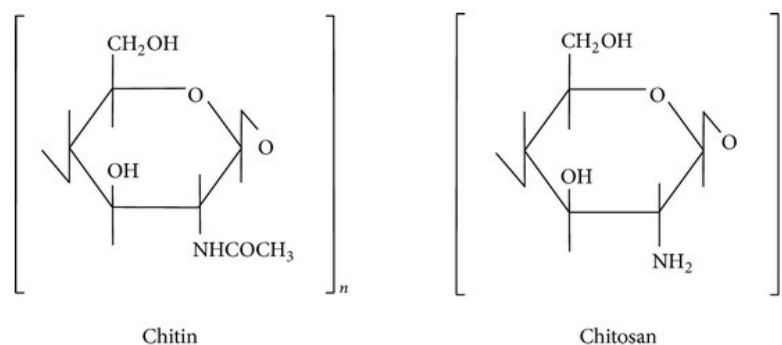
*Polypyrol* – jedná se o konjugovaný polymer, který vzniká polymerací pyrolu. Polypyrol má schopnost vést elektrický proud, což umožňuje jeho využití v elektrochemických aplikacích. Polypyrol má několik vlastností, které ho dělají vhodným také pro cílené doručování léčiv. Patří mezi ně biokompatibilita, nízká toxicita, schopnost vázat a uvolňovat léčiva, schopnost reagovat na změny pH a schopnost vázat se na biomolekuly jako jsou proteiny a DNA. Polypyrol se používá k doručování léčiv do nádorových tkání, kde může být léčivo uvolňováno pomalu a cíleně [2].

## 1.2 Chitosan

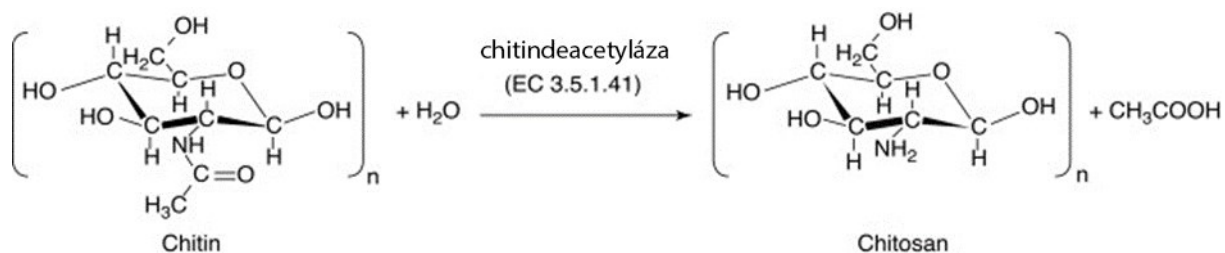
### 1.2.1 Struktura a příprava chitosanu v různých formách

Chitosan neboli (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan, je kladně nabitý polysacharid, který vzniká deacetylací chitinu v alkalickém prostředí [19, 20]. Jeho kationtový charakter je připisován protonaci aminoskupin, kde se hodnota pKa pohybuje okolo 6,3 až 6,5 [21]. Skládá se z glukosaminových a N-acetylglukosaminových jednotek a má poměrně nízkou molekulovou hmotnost pohybující se v rozmezí od 100 do 500 kDa. Výrazný rozptyl v molekulové hmotnosti je dán stupněm deacetylace chitosanu [19, 20]. Na rozdíl od chitinu je chitosan více odolný a lépe rozpustný v kyselých roztocích, a to především v kyselině chlorovodíkové, kyselině fosforečné a kyselině mléčné [22]. Ve vodných roztocích je nerozpustný [21].

Chitin patří do skupiny přírodních biopolymerů, a lze ho v přírodě nalézt ve formě cytoskeletu měkkýšů, vodních korýšů, v buněčných stěnách hub a kvasinek, v zelených řasách a kutikulách hmyzu a pavoukocvů [21]. Strukturou je chitin podobný celulóze, rozdíl je zřetelný pouze na uhlíku C<sub>2</sub>, kde je u chitinu místo hydroxylové skupiny vázána acetamidová skupina, jak je patrné na Obr.1. Komerčně vyráběný chitosan má největší distribuci z Japonska, kde se ročně vyrobí více než 100 miliard tun chitosanu [22]. Mezi nejpoužívanější typ výroby chitosanu patří tzv. tvrdý termochemický postup. Nevýhodou tohoto procesu je jeho ekologický dopad na životní prostředí, protože při něm vznikají neodbouratelné vedlejší produkty. Chitosan lze připravit také chemickou cestou, a to deacetylací chitinu za použití alkalického roztoku, např. hydroxidu sodného. Reakci lze řídit tak, aby se dosáhlo specifického stupně deacetylace, který určuje vlastnosti konečného produktu chitosanu. Jiným typem přípravy chitosanu je enzymatická deacetylace pomocí enzymu chitindeacetyláza (Obr. 2) [22]. Stupeň deacetylace a obsah glukosaminových a acetylglukosaminových skupin určuje fyzikálně-chemické vlastnosti chitosanu [23].

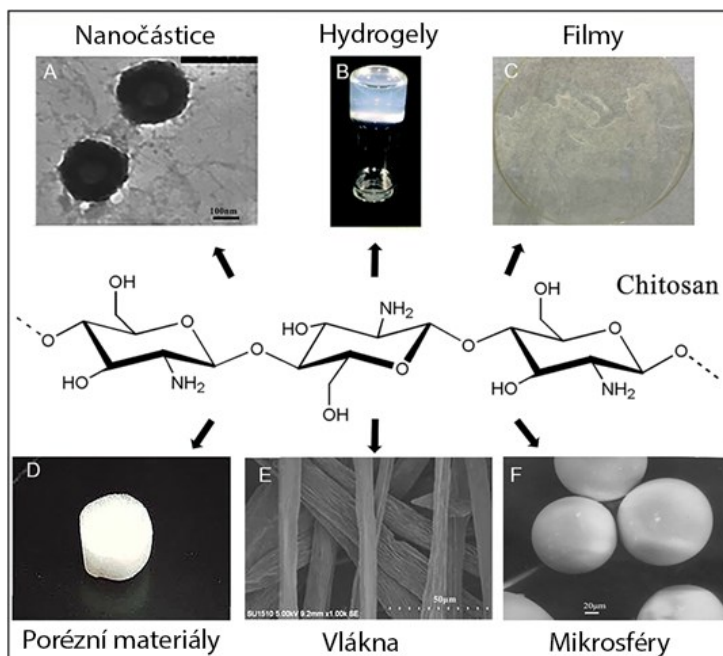


**Obrázek 1:** Chemická struktura chitinu a chitosanu [20].



**Obrázek 2:** Katalytické působení chitin deacetyláz; chitin je deacetylován enzymem chitin deacetyláza za vzniku chitosanu a acetátu [22].

Komerčně lze chitosan připravovat v různých formách, a to jako chitosanová vlákna, částice, hydrogely, filmy a porézní materiály (Obr. 3).

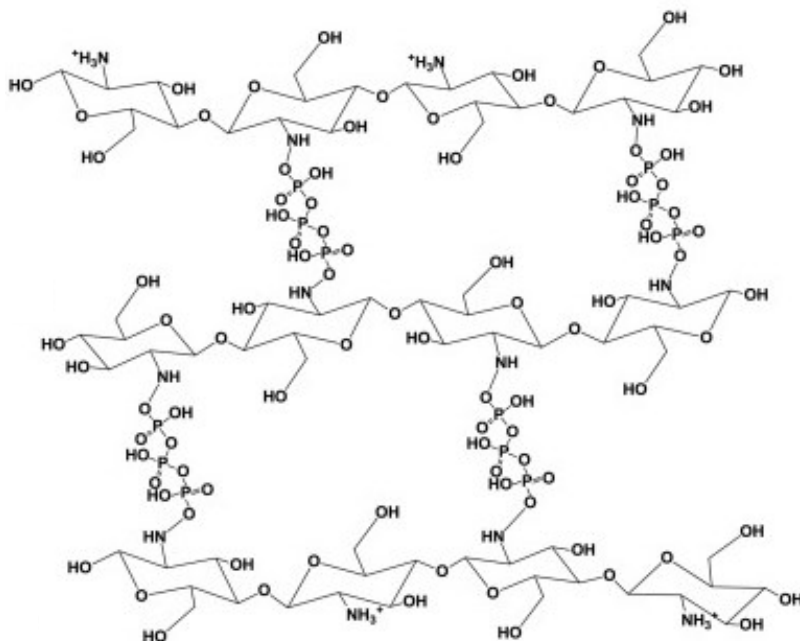


**Obrázek 3:** Ukázka různých forem chitosanu [24].

### Chitosanové částice

Nanočástice se nejčastěji připravují iontovou interakcí s tripolyfosfátem (TPP) nebo síranem sodným jako zesítujícím činidlem [25]. Kladně nabitě aminoskupiny chitosanu se zesítují se záporně nabitými fosfátovými skupinami TPP za vzniku chitosanových částic (Obr. 4). Výhodou nanočástic je jejich velký povrch a zároveň malá velikost partikulí. Takovéto částice lze využít v systémech pro dodávání léčiv nebo pro čištění odpadních vod od těžkých kovů. Další výhodou je jejich antibakteriální aktivita především vůči gram pozitivním bakteriím. Aktivitu lze zvýšit také navázáním iontů kovu (měď, železo,

stříbro) na částice. Velkým potenciálem je vazba stříbrných iontů, kde částice vykazovaly silné inhibiční a baktericidní účinky [26].



**Obrázek 4:** Strukturální vzorec zesíťovaného chitosanu pomocí tripolyfosfátu [27].

### Chitosanová vlákna

Pro přípravu vláken se nejčastěji používá metoda zvláknování v roztoku kyseliny octové. Ke zvýšení pružnosti a odolnosti vláken lze použít metodu se zvláknovací látkou glycin chloridem [28]. Vlákna lze využít pro své bakteriostatické účinky do obvazových materiálů, pro úpravu znečištěných vod k redukci azobarviv či patogenních bakterií (např. *Escherichia coli*).

### Hydrogely

Hydrogely z chitosanu jsou tvořeny trojrozměrnou sítí hydrofilních polymerů, které jsou schopny bobtnat ve vodě. Hydrogely se díky zesíťované struktuře nerozpadají při bobtnání a udrží si svou strukturu. Hydrofilita je dána přítomností hydrofilních skupin  $-NH_2$  a  $-OH$ . Polymerní řetězce jsou společně propojené reverzibilními iontovými nebo vodíkovými vazbami nebo ireverzibilními kovalentními vazbami. Zesíťování chitosanu se provádí pomocí roztoku s benzaldehydem, použitým jako hydrofobní zesíťující činidlo. Nevýhodou tohoto procesu je toxicita činidla, která při nedostatečném promytí může negativně působit na lidské zdraví [29]. Díky velkému obsahu vody a schopnosti bobtnání ve vodě, mají hydrogely velmi podobné vlastnosti jako lidské tkáně a je zde umožněna

například snadná difúze živin. Hydrogely se také používají pro výrobu tzv. „scaffoldů“, které slouží jako matrice pro podporu růstu nových buněk a tkání [23].

Materiály na bázi hydrogelu jsou vhodné pro systémy dodávání léčiv, v tkáňovém inženýrství nebo jako obvazový materiál díky svým antibakteriálním vlastnostem [22, 29].

### Filmy

Čisté chitosanové filmy lze získat rozpuštěním chitosanu ve vhodném rozpouštědle s použitím změkčovadla, které slouží k lepší mechanické odolnosti. Jako rozpouštědlo se nejčastěji využívá mírně okyselená voda, případně kyselina mravenčí, mléčná, octová nebo propionová, která s chitosanem vytvoří roztok, který se rozlije na rovný povrch a rozpouštědlo se postupně odpaří za vzniku filmové matrice [22, 31].

Chitosanové filmy jsou využitelné ve zdravotnictví díky svým vlastnostem vytvářet ochranný film na pokožce pro ošetření popálenin nebo jiných kožních poranění. Oproti jiným materiálům mají lepší elasticitu, jsou biodegradabilní a antimikrobiální vůči některým bakteriím a plísním [24]. Potenciál pro využití těchto filmů je také v potravinářství, kde se film použije jako obal pro potraviny [31, 32]. Takto vytvořené chitosanové filmy mohou být citlivější na kontakt s vodou či se mohou ve vodných roztocích rozpouštět, proto je nutné je zesíťovat s činidly jako je glutaraldehyd, formaldehyd či genipin. Tím se zabrání možnému rozpuštění obalového materiálu z chitosanového filmu [32].

### Porézní materiály

Největší předností porézních materiálů z chitosanu jsou otevřené póry s vysokou propustností, které mohou nasávat velké množství tekutin prospěšných pro proliferaci a buněčný růst v tkáňovém inženýrství. Mají také vysoké bobtnající schopnosti a dobrou antibakteriální aktivitu. Výroba porézních materiálů spočívá v procesu lyofilizace s použitím pěnnotvorných činidel. Roztok se zmrazí a dojde k odpaření rozpouštědla za sníženého tlaku a tím k tvorbě chitosanu s póry. Pro zvýšení antibakteriální schopnosti se k chitosanu mohou přidat nanočástice stříbra. Tento kompozit má slibné vlastnosti pro použití v obvazovém materiálu [23].

## **1.2.2 Vlastnosti chitosanu**

Chitosan je vynikající koagulační činidlo díky vysoké hustotě aminoskupin na polymerním řetězci [34]. Mezi další žádoucí vlastnosti patří biologická odbouratelnost, biokompatibilita, snadná modifikace, vysoká adsorpční kapacita a vysoká úroveň poréznosti

[33]. Dále má antioxidační, antifungicidní a antibakteriální účinky proti širokému spektru mikroorganismů [19, 34]. Žádoucí vlastnosti chitosanu jsou velice rozsáhlé a svůj podíl na tom má především volná aminová skupina na  $\beta$ -uhlíku [20, 33].

Chitosan lze formulovat do mikročástic až po nanočástice, případně mikrovlákna až nanovlákna. Čím menší je průměr částic, tím větší je aktivní povrch. Vysoká míra adsorpce na částice je dána velikostí částic [24]. Pro lepší účinnost adsorpce lze využít kombinace chitosanu s kovy, jako je stříbro, křemík, zinek, oxid zinečnatý či oxid titaničitý [21]. Mezi limitující faktory lze zařadit především špatnou rozpustnost ve vodě (pouze nabobtná) a ve většině organických rozpouštědel. Pro zlepšení rozpustnosti lze chitosan chemicky modifikovat na lépe rozpustné deriváty, a to především zavedením sacharidových jednotek. K derivatizaci se využívá procesu zesítnění pomocí speciálních síťovacích činidel. Nejpoužívanějším činidlem jsou tripolyfosfáty [23].

### 1.2.3 Stabilita chitosanu

Chitosan je velmi citlivý na podmínky skladování, proto se ho doporučuje uchovávat v uzavřených nádobách při nízkých teplotách mezi 2 až 8 °C. Špatná stabilita a následná degradace omezuje jeho širší využití ve farmacii. Stabilitu ovlivňují jak vnitřní, tak vnější faktory. Jedním z vnitřních faktorů je stupeň čistoty. Získávání chitosanu z různých zdrojů vede k velkým rozdílům v kvalitě a čistotě. Chitosan může obsahovat některé nečistoty, jako jsou proteiny, těžké kovy, endotoxiny nebo mikroorganismy. Tyto nečistoty chitosanu mohou způsobovat problémy při přípravě systémů pro cílené doručování léčiv. Kontaminace mikroorganismy zase může uspíšit degradaci chitosanu enzymatickou hydrolýzou [36].

Další faktor, který ovlivňuje stabilitu chitosanu je molekulová hmotnost. Rozdílná molekulová hmotnost je způsobena rozdíly ve způsobu získání chitosanu a jeho přípravě. Molekulová hmotnost komerčně dodávaného chitosanu se pohybuje v širokém rozmezí 10-100 000 kDa. Chitosan s vyšší molekulovou hmotností je považován za stabilnější [36].

Stupeň deacetylace udává poměr glukosaminových skupin k N-acetylglukosaminovým skupinám. Hodnoty stupně deacetylace se pohybují mezi 70 % až 95 %. Z výzkumu vyplývá, že chitosan s vyšším stupněm deacetylace vykazuje vyšší čistotu a pomalejší degradaci. Zároveň také pomalejší rychlost kyselé hydrolýzy během skladování. Důvodem je pravděpodobně méně porézní struktura a nižší schopnost vázat vodu, což omezuje rychlost degradačního procesu v kyselém prostředí [36].

K vnějším faktorům se řadí především stupeň vlhkosti vzduchu a teplota okolí. Dlouhodobé skladování při vysoké relativní vlhkosti může urychlovat hydrolýzu nebo změnit fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti chitosanu [36].

#### 1.2.4 Využití chitosanu

Chitosan má velký potenciál k využití v širokém rozsahu napříč odvětvími díky svým jedinečným vlastnostem jako je biodegradabilita, biokompatibilita, antimikrobiální účinky a schopnost podporovat růst buněk. K těmto odvětvím patří zdravotnictví, buněčné a tkáňové inženýrství, potravinářství, zemědělství, textilní a papírenský průmysl [26].

Největším potenciálem chitosanu je jeho použití v systémech cíleného doručování léčiv na konkrétní místo v těle. Základním rozdílem mezi standardním podáváním léků a tzv. „drug delivery“ systémem (DDS) je to, že DDS umožňuje cílené doručování léku na konkrétní místo a kontrolované uvolňování léku, čímž může zlepšit jeho účinnost a snížit vedlejší účinky [26]. Nejčastější formy chitosanu k využití v DDS jsou mikročástice, nanovlákná nebo hydrogely [23].

Chitosan je užitečný pro přípravu zdravotnických pomůcek, a to k použití v obvazech a obinadlech jako antibakteriální činidlo, které snižuje riziko vzniku infekcí [21]. Při hojení ran se chitosan používá nejčastěji ve formě hydrogelu. Byly studovány potenciální účinky při léčbě popálenin. Obvaz ve formě hydrogelu podporuje proces hojení tím, že poskytuje vlhké prostředí v oblasti rány a napomáhá tak proliferaci buněk a následnému hojení. Bylo prokázáno, že obvazový materiál má pozitivní vliv na angiogenezi, tedy obnovu poškozených krevních cév a tím se zlepšuje průtok krve do místa popálení [24]. Použití chitosanu při hojení popálenin vykazuje slibné výsledky, avšak k lepšímu pochopení konkrétních principů je zapotřebí další výzkum v této oblasti.

V nedávných studiích byly testovány oční kapky s obsahem chitosan-N-acetylcysteinu pro pacienty trpící syndromem suchého oka. Z výzkumu vyplynulo, že použití těchto kapek u pacientů se syndromem, výrazně zvýšilo tvorbu slzného filmu a tím byl limitován oční diskomfort či zarudnutí spojivek nebo poškození rohovky [37].

Dalším slibným odvětvím je využití chitosanu ve formě částic ve vakcínách. Lze ho použít buď jako adjuvans za účelem posílení imunitní reakce organismu nebo jako transportní systém, který pomáhá zacílit vakcínu na příslušné buňky v těle. Například nanočástice chitosanu mohou být použity k zapouzdření vakcinačních antigenů a tím i k jejich ochraně před degradací [38]. Výhodou použití chitosanových nano- a



mikročásteč jako nosičů léčiva je jejich snadná degradovatelnost lysozymem na netoxickou látku a pomalé uvolňování léčiva. Nevýhodou chitosanu je jeho omezená rozpustnost. Chitosan se rozpouští při hodnotách pH pod 6,5. Modifikací chitosanu lze docílit zvětšení rozsahu rozpustnosti [39].

V tkáňovém inženýrství se chitosan používá k výrobě „scaffoldů“, tedy nosných materiálů pro podporu růstu buněk a nových tkání. Nejčastěji se používají filmy, vlákna a především hydrogely. V nedávné studii se testoval účinek nanokompozitů s chitosanem na obnovu poškozených tkání, chrupavek či kostí. Slibným nanokompozitem pro kostní inženýrství může být směs chitosanu, alginátu a oxidu křemičitého. Nanočástice oxidu křemičitého zvyšují životaschopnost buněk, a to o více než polovinu. Alginát snižuje riziko bakteriální infekce. Jako další nanokompozity lze použít chitosan s nanočásticemi oxidu zirkoničitého, hydroxyapatit s oxidem křemičitým, nanočástice mědi, stříbra a další [23].

Potenciálním předpokladem pro využití částic z chitosanu je ropný a automobilový průmysl, kde je potřeba vyvinout lepší ochranu oceli proti korozi. V dnešní době se k inhibici koroze používají toxické dusičnany nebo dichromany. Proto se hledají vhodnější materiály, které nebudou toxické a budou levnější variantou. Jednou z variant je možnost převedení chitosanu na aniontový polymerní surfaktant se zvýšenou rozpustností, aby se lépe využily jeho vlastnosti. Chitosanový surfaktant byl použit ve spojení s nanočásticemi stříbra pro lepší stabilitu [40].

## **1.3 Oxid křemičitý**

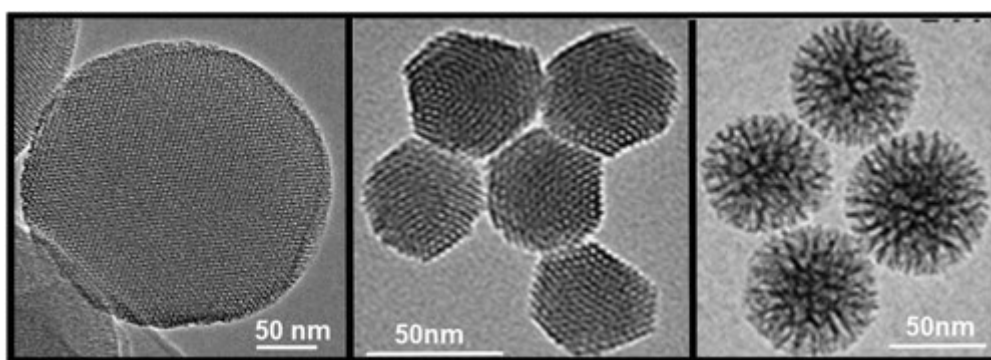
### **1.3.1 Struktura a příprava vláken/částic oxidu křemičitého**

Oxid křemičitý je jednou z nejrozšířenějších anorganických složek na Zemi.  $\text{SiO}_2$  se vyskytuje ve 22 různých formách a modifikacích, které se od sebe liší svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Jednotlivé fáze se od sebe odlišují prostorovým uspořádáním tzv. tetraedrů  $\text{SiO}_4$  s proměnlivými úhly vazby Si–O–Si a vzdáleností vazeb Si–O. Tyto tetraedry jsou spojeny pomocí kyslíkových atomů, což vytváří síťovou strukturu oxidu křemičitého. Tato struktura dává oxidu křemičitému jeho jedinečné vlastnosti, jako je vysoká tepelná stabilita a mechanická pevnost [41].

Jednou z forem je krystalický oxid křemičitý, známý též jako křemen. Je nejběžnější a nejstabilnější modifikací  $\text{SiO}_2$ . Je bezbarvý s vysokou tvrdostí a pevností. Krystalický  $\text{SiO}_2$  se vyskytuje v přírodě jako křemen, křišťál, ametyst nebo opál [41].

Amorfní  $\text{SiO}_2$  nemá krystalickou strukturu a je tvořen náhodným uspořádáním atomů křemíku a kyslíku. Jeho vlastnosti se liší v závislosti na způsobu přípravy [42].

Mezoporézní  $\text{SiO}_2$  částice, které lze vidět na Obr. 5, mají vnitřní porézní strukturu s průměrnou velikostí pórů v rozmezí 2-50 nm [43]. Tento materiál se vyrábí pomocí speciálních sol-gel syntetických metod a je vhodný především pro aplikace v oblasti biomedicíny, a to jako nosič pro různá terapeutická činidla. Sol-gel metoda využívá organosilanové prekurzory (například tetraethoxysilan), které pomocí hydrolýzy a kondenzačních reakcí vedou ke vzniku nové fáze (sol). Tato směs se poté nechá reagovat, dokud nedojde k vytvoření gelovité struktury (gel). Výhodou této metody je práce při nízkých teplotách (0–40 °C), která je vhodná např. pro proteiny [42].



**Obrázek 5:** TEM snímky mezoporézních nanočástic s různým průměrem (150, 50, 50 nm) a porozitou [43].

Nanovlákná oxidu křemičitého mají velkou povrchovou plochu a vysokou poréznost. Syntetizují se nejčastěji pomocí metody elektrospinningu. Tato technika umožňuje přeměnit roztok nebo taveninu polymeru na vlákna s průměrem v řádu nanometrů. Pro přípravu nanovláken  $\text{SiO}_2$  se nejprve připraví roztok obsahující silikátový polymer, například polyethylsilikát, a organické rozpouštědlo (aceton nebo ethanol). Do roztoku se poté přidají další látky, které mohou ovlivnit vlastnosti vláken, jako jsou například tenzidy nebo rozpouštědla. Následně se vytvoří elektrostatické pole mezi dvěma elektrodami. Toto pole způsobí vznik potenciálového rozdílu mezi elektrodami a roztok je vytlačen z injekční stříkačky v podobě kapky. Z té je vysokou rychlostí vytahováno vlákno, které následně tuhne. V průběhu tohoto procesu dochází k vypařování rozpouštědla [44]. Výsledná nanovlákná  $\text{SiO}_2$  mají vynikající mechanické a chemické vlastnosti, což z nich dělá vhodný materiál pro mnoho aplikací, včetně biomedicíny, filtrace a výroby kompozitů [45].

### 1.3.2 Vlastnosti materiálů z oxidu křemičitého

Struktura oxidu křemičitého je velmi stabilní a vykazuje vysokou tepelnou a chemickou odolnost. Tato odolnost je důležitá pro jeho využití v mnoha aplikacích, jako je keramika, sklo, elektronika [41].  $\text{SiO}_2$  má nízkou elektrickou a tepelnou vodivost, což z něj dělá dobrý izolant. Vzhledem k tomu, že  $\text{SiO}_2$  je biokompatibilní, chemicky inertní a netoxický, je využitelný pro účely tkáňového inženýrství (především pro implantáty), pro biosenzory, materiály k hojení ran a aplikace pro podávání léčiv [45]. Další nezbytnou vlastností je jeho vysoká tvrdost a odolnost proti opotřebení.  $\text{SiO}_2$  materiály mají široké možnosti v zavedení funkčních skupin, velkou specifickou plochu, která obsahuje vysokou koncentraci aktivních míst. To umožňuje snadnou interakci s molekulami a ionty [46].

Vlákna vytvořena elektrospinningem mají propojenou trojrozměrnou strukturu s jemnými póry na povrchu vláken a vyšší poměr povrchu k objemu [45]. V jedné z prací se autoři zaměřili na výrobu a testování membrán z nanovláken oxidu křemičitého pro detekci proteinu hovězího sérového albuminu. Membrány byly vyrobeny pomocí elektrospinningu a dále modifikovány funkčními skupinami pro navázání specifických protilátek. Výsledky ukázaly velmi dobrou citlivost a selektivitu při detekci hovězího sérového albuminu. Tato metoda byla schopna detekovat cílový protein v koncentracích až do 0,19 ng/ml. Nanovláknenné membrány mají potenciál pro využití v citlivé a selektivní detekci proteinů, což může být užitečné v různých oblastech, jako je například medicína nebo potravinářský průmysl [47].

Mezoporézní částice oxidu křemičitého jsou slibným nosným systémem pro dodávání léčiv z důvodu snadné modifikace velikosti a tvaru částic, velkému objemu pórů a povrchové ploše, která umožňuje vazbu vyšších dávek léčiva [48]. Konkrétní adsorpční místa se nachází na povrchu  $\text{SiO}_2$ , a to jako silanolové funkční skupiny ( $\equiv \text{Si}-\text{OH}$ ). Povrch oxidu křemičitého při pH 2-3, čistě bez vazeb funkčních skupin, je záporně nabitý. Z tohoto důvodu je vhodná adsorpce kladně nabitých adsorbentů, případně lze na povrch  $\text{SiO}_2$  zavést funkční skupiny (například slabé kyseliny nebo zásady) a dosáhnout tím větší možnosti rozsahu adsorpce a dalších specifických interakcí mezi částicemi a adsorbenty [42]. Mezoporézní částice oxidu křemičitého mají mnoho slibných využití především v systémech pro dodávání léčiv. Částice jsou schopné nést velké množství špatně rozpustných léčiv a aktivně se transportovat na cílová místa působení léků a zvýšit tak terapeutickou účinnost. Mezoporézní částice oxidu křemičitého byly použity jako nosiče léčiv pro terapii rakoviny, nosiče pro přenos antibiotik k prevenci vzniku zánětu

při operacích kyčelních a kloubních náhrad [42], dále jako zobrazovací činidla především pro diagnostiku rakoviny pomocí magnetické rezonance [11].

I přesto, že  $\text{SiO}_2$  materiály jsou poměrně stabilní a mají vynikající vlastnosti, existují i některé nedostatky, které je potřeba zmínit. Biokompatibilita oxidu křemičitého je stále předmětem sporů. Při dlouhodobé inhalaci nebo vdechnutí částic  $\text{SiO}_2$  mohou způsobit respirační problémy. Nicméně, to se obvykle vztahuje pouze na vysoké koncentrace částic  $\text{SiO}_2$ . Také proces výroby pomocí elektrospinningu může být v některých případech nákladný a neefektivní [45]. Je důležité brát v úvahu tyto nedostatky při výběru a využití  $\text{SiO}_2$  materiálů v různých aplikacích.

### 1.3.3 Kompozity s oxidem křemičitým

$\text{SiO}_2$  materiály se velmi často používají jako pomocný materiál v kompozitech. Kompozity mohou kombinovat vlastnosti různých materiálů, a tak vytvářet nové, synergické vlastnosti, které nelze dosáhnout pouze jedním materiálem. Například kombinace  $\text{SiO}_2$  a chitosanu může vést ke zlepšení mechanických vlastností, biokompatibility a stability materiálu [49]. Celkově tedy využití kompozitů může zvýšit využití nanomateriálů v praxi.

Protože kompozity s oxidem křemičitým mohou zlepšit fyzikální vlastnosti materiálů, jako mechanické a tepelné, přitahují velký zájem v mnoha průmyslových i biomedicínských odvětvích. Díky své tvrdosti se mnoho krystalických forem oxidu křemičitého používá k výrobě kompozitů s polymerními materiály, a to jako stavební materiál, rezné nástroje, dále také v oblasti stomatologie. Příkladem je  $\text{SiO}_2$  v kompozitu s chitosanem pro použití v zubních implantátech. V tomto případě je důležité použít materiál, který je pevný a odolný vůči mechanickému a chemickému působení, což komplex  $\text{SiO}_2$ /chitosan splňuje [50].

Možným využitím kompozitu s  $\text{SiO}_2$  je v oblasti ortopedických kovových implantátů. Zde byly použity dva typy kompozitů jako povlak na kovové implantáty z titanu a nerezové oceli. Titanové implantáty byly potaženy skleněnými částicemi, které byly aplikovány nástřikem, na něž byla nanese vrstva chitosanu, želatiny a nanočástic oxidu křemičitého. Na  $\text{SiO}_2$  nanočástice bylo iontovou vazbou navázáno antibiotikum gentamicin. Implantáty z nerezové oceli byly potaženy vrstvou nanočástic chitosanu, želatiny a  $\text{SiO}_2$  s navázaným gentamicinem. Kombinací chitosanu a želatiny lze zlepšit adhezi a proliferaci buněk, zatímco přidáním  $\text{SiO}_2$  nanočástic lze zvýšit odolnost proti opotřebení. Chitosan vykazuje antibakteriální vlastnosti z důvodu kladně nabitých aminoskupin v jeho struktuře,

kteře interagují s negativně nabitou buněčnou stěnou bakterií. Jeho antibakteriální účinek je zesílen kombinací dalších antibakteriálních molekul, jako jsou antibiotika. V tomto experimentu bylo použito antibiotikum gentamicin, které slouží k zabránění infekcí v místě implantátu. Skleněné částice podporují osteointegraci a růst kosti kolem implantátu. Potažení implantátů kompozitem zvýšilo mechanické vlastnosti jako je tvrdost a pružnost, což naznačuje, že by povlaky mohly být účinným způsobem ochrany proti korozi a opotřebení ortopedických implantátů. Antibiotikum gentamicin společně s chitosanem zajistili ochranu před rozvojem bakteriálních infekcí. Nanokompozit je biokompatibilní, biodegradabilní a podporuje osteointegraci [48].

V jiné práci byl pro prevenci infekce chronických kožních ran použit kompozitní hydrogel s nanočásticemi SiO<sub>2</sub> a kolagenem typu I společně s naloženým antibiotikem gentamicinem. Experimentálně bylo zkoumáno, jak různé koncentrace SiO<sub>2</sub> ovlivňují vlastnosti hydrogelu, jako je pevnost, pružnost a rychlost uvolňování antibiotika. Byla provedena také *in vitro* studie, která testovala antimikrobiální účinnost hydrogelu proti kmenům bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* během 7 dní. Výsledky ukázaly, že hydrogely s vyšší koncentrací SiO<sub>2</sub> měly lepší mechanické vlastnosti a pomalejší uvolňování gentamicinu. Tyto hydrogely také prokázaly větší antibakteriální účinnost než hydrogely s nižší koncentrací SiO<sub>2</sub>. Z těchto výsledků lze usuzovat, že kompozitní hydrogely s SiO<sub>2</sub> nanočásticemi a kolagenem typu I mají potenciál pro nový obvazový materiál k prevenci infekcí ran [51].

Kompozity s SiO<sub>2</sub> materiály lze použít také v cíleném doručování léčiv. Vhodným kompozitem by mohl být nosič z chitosanu a SiO<sub>2</sub>. Tento kompozit vytváří meziprostorové kanálky s velikostí v řádu nanometrů a umožňují tak vazbu a transport léčiva. Kompozit chrání a uvolňuje léčivo postupně, což vede k lepší účinnosti léčby. Kromě toho lze tento kompozit snadno modifikovat, aby splňoval specifické požadavky léčby [49].

Dalším příkladem je nanokompozit částic SiO<sub>2</sub> s Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pro cílenou léčbu rakoviny prsu, na které byly navázány proteázy izolované z *Cladosporium tenellum*. Nanokompozit byl následně obohacen chemoterapeutikem doxorubicinem. Proteázy jsou schopné cílit na specifické proteiny na povrchu rakovinných buněk a vyvolat jejich rozklad, čímž umožňují účinnější vstřebávání léčiv do nádoru. Použití proteáz je omezeno z důvodu jejich nízké stability a vyšší citlivosti na změny teploty a pH. K prodloužení poločasu proteáz byla použita imobilizace magneticky potaženými nanočásticemi oxidu křemičitého. Nanokompozitní částice navíc umožňují magnetické zachytávání a usměrňování léčiv přímo do nádoru. Výsledky ukázaly, že takto modifikované nanokompozitní částice byly účinnější

v eliminaci buněk rakoviny prsu v *in vitro* testech než použití čistého doxorubicinu a zároveň byly méně toxické pro normální buňky. Také uvolňování doxorubicinu z nanokompozitu bylo nejintenzivnější v prvních 12 hodinách. Celkově se z nanokompozitu uvolnilo během 6 dnů přibližně 76 % léčiva. Výsledky naznačují, že nanokompozit může být efektivní pro cílenou terapii rakoviny prsu a má potenciál pro budoucí klinické využití [52].

Dále lze zmínit odlišně modifikovaný nanokompozit pro účely terapie rakoviny. Nanokompozit byl tvořen mezoporézními nanočásticemi SiO<sub>2</sub>, na které byla funkčně vázaná kyselina hyaluronová. Tyto nanočástice byly následně naloženy fotosenzitivním léčivem pro účely terapie. Kyselina hyaluronová byla zvolena, protože mnoho typů rakovinných buněk vykazuje zvýšenou expresi receptoru CD44, který se na tuto kyselinu váže. Tento jev lze využít pro cílení léčiva na rakovinné buňky s vysokou expresí CD44, což může zvýšit účinnost léčby a zároveň snížit toxicitu pro zdravé buňky. Byl prokázán vysoký účinek nanokompozitu na fotodynamickou terapii kolorektálních rakovinných buněk, která zahrnovala expozici světlu pro aktivaci fotosenzitivního léčiva vázaného na nanokompozitu a následnou reakci s kyslíkem, což vedlo k poškození rakovinných buněk a inhibici jejich růstu [53].

Dalším slibným nanokompozitem je použití biopolymerů oxidu křemičitého s alginátem. Alginát je hydrofilní polysacharid, který má schopnost tvořit gelové matrice, což je užitečné například pro formulaci léčiv [8]. Společně s oxidem křemičitým nesou negativní náboj v neutrálním pH. Jsou spolu vzájemně propojeny slabými vodíkovými vazbami. Výhodou tohoto spojení je, že mohou být vzájemně modifikovány do různých forem, aniž by došlo k nežádoucí precipitaci nebo fázové separaci. Tento nanokompozit byl zkoumán pro využití jako enzymatické biokatalyzátory, buněčné bioreaktory, implantáty a v neposlední řadě také jako nosičové systémy léčiv. Konkrétním příkladem použití kompozitu je pro implantaci Langerhansových ostrůvků. Tyto ostrůvky jsou shluky specializovaných buněk v pankreatu, které produkují inzulín, a jsou zodpovědné za udržování stabilní hladiny glukózy v krvi. Pro pacienty s *diabetes mellitus* typu I, kteří mají tyto buňky nefunkční, může být implantace Langerhansových ostrůvků v alginátových kuličkách, které jsou obalené oxidem křemičitým, vhodnou léčebnou metodou. Tento kompozit pomáhá chránit zapouzdřené buňky před útokem imunitního systému, který je u pacientů s *diabetes mellitus* typu I nadměrně aktivní. Zároveň umožňuje difuzi malých molekul (glukóza, inzulín, kyslík), což pomáhá udržet funkčnost implantovaných buněk [7].

## 1.4 Kompozit chitosanu, kyseliny hyaluronové a oxidu křemičitého

Spojení chitosanu, kyseliny hyaluronové a oxidu křemičitého do kompozitu umožňuje využití jejich jedinečných vlastností k dosažení specifických aplikací. Chitosan má vynikající biokompatibilitu a biodegradabilitu, je šetrný k tkáním a může být snadno metabolizován v těle [26]. Kyselina hyaluronová má schopnost vázat velké množství vody, což ji činí vhodnou pro zlepšení hydratace tkání a zlepšení procesu hojení ran [54, 55]. Oxid křemičitý má dobré mechanické vlastnosti, má velkou povrchovou oblast a vynikající adsorpční vlastnosti, které umožňují využít jeho schopnosti vázat a uvolňovat látky [52, 58]. Výsledný nanokompozit může mít synergický efekt vlastností jednotlivých komponentů, což může vést ke zlepšené biokompatibilitě, voděodolnosti a mechanické pevnosti.

V současné době nejsou žádné konkrétní studie, které by se věnovaly specifické kombinaci všech tří materiálů, tedy kompozitu z chitosanových částic, kyseliny hyaluronové a vláken oxidu křemičitého. Nicméně existuje řada studií, které se zabývají kombinací některých těchto materiálů v různých aplikacích. Je možné usuzovat, že tyto biomateriály mohou vytvořit nový kompozit s výhodami všech zmíněných složek. Výsledkem by mohly být nové biomateriály pro různé aplikace v biomedicině.

Kombinace těchto tří materiálů může být využita pro mnoho aplikací, jako jsou například lékové nosiče, implantáty, obvazový materiál a další [51, 57]. V oblasti medicíny může být tento kompozit využit například k podpoře hojení ran nebo ke zlepšení regenerace kostí a tkání. V kosmetice může být využit ke zlepšení hydratace pokožky a k dosažení zlepšení textury kosmetických produktů [23].

Chitosanové nanočástice potažené kyselinou hyaluronovou mění svůj povrchový náboj z pozitivního na negativní. Díky tomuto jevu mohou interagovat s pozitivně nabitými buňkami, jako jsou například nádorové buňky, které mají na svém povrchu mnoho receptorů pro kyselinu hyaluronovou. Tyto interakce mohou zvýšit cílení nanokompozitu na rakovinné buňky, a tím snížit jeho toxicitu na zdravé buňky. Kromě toho negativní povrchový náboj může také přispět k větší stabilitě kompozitu a jeho dlouhodobějšímu uvolňování léčiv. Makrofágy vychytávají nanočástice potažené HA nižší rychlostí než částice bez HA. Tím je dosaženo prodloužení cirkulačního času léčiv v organismu. Umožňuje to lepší účinnost terapie, protože větší část léčiva dosáhne svého cíle a také se snižuje potřeba opakované aplikace léčiva. To může snížit náklady na léčbu a zlepšit pohodlí pacienta [33].

Při vytváření kompozitu však mohou nastat některé překážky, které by mohly ovlivnit výsledné vlastnosti kompozitu. Mohlo by dojít ke snížení biologické aktivity jednotlivých

materiálů nebo k nepřiměřené tvrdosti nebo naopak křehkosti kompozitu [33]. Kromě toho může být také náročně optimalizovat poměr jednotlivých složek, aby se dosáhlo požadovaných vlastností, jako je například stabilita, biodegradabilita nebo léková účinnost. Je důležité provést důkladnou charakterizaci kompozitu, aby se zjistily případné problémy a zajistila se jeho optimální funkce v daném prostředí.

## **1.5 Oblasti využití nosičových systémů**

Nosičové systémy jsou materiály, které slouží k přenosu, ukládání a dodávání různých látek jako jsou léčiva, proteiny, DNA a další biologicky aktivní látky. Tyto systémy mají využití v mnoha oblastech, včetně biomedicínských aplikací (v oblastech pro hojení ran, v cíleném dodávání léčiv, pro regeneraci tkání, pro zvýšení účinků vakcinace atd.), kosmetiky (např. použití liposomů ke zvýšení účinnosti kosmetických produktů, jako jsou krémy, séra apod.) a potravinářského průmyslu (např. pro prodloužení trvanlivosti potravin). V následujících podkapitolách jsou zmíněné některé z oblastí využití nosičových systémů.

### **1.5.1 Cílené doručování léčiv**

Nosičové systémy léčiv slouží k cílené a kontrolované distribuci léčivé látky v organismu [58]. Standardní podávání léků zahrnuje především perorální, intravenózní, intramuskulární a subkutánní cestu podání. Léčivo je podáváno v určité dávce a je z těla vyloučeno přirozenou cestou. Oproti tomu nosičové systémy mají umožnit cílené doručení léku na určité místo v těle a tím maximalizovat jeho účinnost, zvýšit stabilitu léčiva v organismu a zvýšit biologickou dostupnost léčiva, což může vést k menším podávaným dávkám a lepšímu terapeutickému účinku. Dochází tak k postupnému kontrolovatelnému uvolňování a minimalizují se negativní vedlejší účinky. Nosiče lze využít k uvolňování léčiva na povrchu kůže, sliznicích nebo v různých tkáních a orgánech [26].

Mimo léčiva se mohou vázat také další bioaktivní látky, jako jsou proteiny, protilátky, růstové faktory, antigeny či adjuvans ve vakcínách. V DDS se používají jako nosiče materiály ve formě přírodních nebo syntetických mikro nebo nanočástic, mikro nebo nanovláken, hydrogelů, liposomů, lipoproteinů, micel nebo rozpustných polymerů [26]. Vhodná volba nosiče závisí především na typu látky, kterou ponese, na časovém intervalu degradovatelnosti nosiče, citlivosti vůči změnám pH a teploty [59]. Optimální velikost částic pro systémy podávání léků je v rozmezí 100–200 nm. Obecně platí, že čím menší je velikost částic, tím rychlejší je rozpustnost a vyšší biologická dostupnost léčiva [54].



Důležitým faktorem je též enzymatická aktivita v těle. Ta může způsobit degradaci nosiče, předčasné vyvázání léčiva z nosiče nebo změnu struktury či vlastností nosiče nebo samotného léčiva. Enzymy mohou katalyzovat určité chemické reakce, které mohou vést k modifikaci struktury léčiva nebo změně jeho farmakokinetických vlastností. Konkrétní enzym, který je zodpovědný za degradaci chitosanových nosičů je lysozym. Lysozomy jsou enzymy, které štěpí vazby mezi N-acetylmuramovými kyselinami v peptidoglykanových stěnách bakterií. Tyto enzymy jsou přítomny na sliznicích, ve slinách a slzách a slouží jako přirozená obrana proti infekcím. Chitosan má podobnou strukturu jako peptidoglykan, a proto mohou lysozomy také katalyzovat jeho degradaci na menší molekuly, což může ovlivnit jeho fyzikální a chemické vlastnosti. Rychlost degradace je též závislá na stupni acetylace. Je známo, že chitosan s nízkým stupněm acetylace má tendenci být rychleji degradován [60].

Nosiče z chitosanu mají díky aminoskupinám kationtovou povahu, a tak na sebe mohou vázat pomocí elektrostatických interakcí proteiny a léčiva, které mají aniontový náboj. Kladně nabitý povrch chitosanu též podporuje mukoadhezivitu ke slizničním tkáním a tím umožňuje lepší adsorpci nosiče na konkrétní místo podání [60]. Kationtový charakter činí chitosan antibakteriálním polymerem. Chitosan má vysoký obsah aminoskupin, které jsou schopné se vázat na negativně nabitě bakteriální povrchy, jako jsou lipopolysacharidy a kyselina teichoová, což způsobuje porušení integrity bakteriálních buněk a inhibuje jejich růst. Tento mechanismus je zvláště účinný proti gramnegativním bakteriím, které mají vnější membránu bohatou na lipopolysacharidy [61].

Další důležitou vlastností nosičů, kterou musí splňovat je jejich biodegradace. Chitosan se nevyskytuje přirozeně v lidském těle, ale přesto může být degradován *in vivo* několika proteázami a to lysozymem, papainem nebo pepsinem. Biodegradace pomocí těchto proteáz vede k uvolnění netoxických oligosacharidů různé délky, které mohou být následně inkorporovány do glykosaminoglykanů, glykoproteinů, do metabolických drah nebo mohou být vylučovány ven z těla [62].

Uvolňování léčiva z nosičů je ovlivněno změnou pH nebo povrchovým nábojem biopolymerů. Jako příklad lze uvést kompozit nanočástic chitosanu a kyseliny hyaluronové. Na nanočástice CS:TPP/HA byla navázána léčivá látka raloxifen, a to vazbou vytvořenou mezi karboxylovou skupinou HA a amidovou skupinou CS. Raloxifen cílil na rakovinné buňky plic A549. Uvolňování léčiva z tohoto kompozitu bylo rychlejší při nízkém pH než při fyziologickém pH těla z důvodu hydrolýzy struktury chitosanu na monomery [63].

Aminová skupina chitosanu bobtná v důsledku protonace a umožňuje tak vyvázání účinné látky z nanočástic [46].

### 1.5.2 Hojení a regenerace ran

Problematika v oblasti hojení ran je v dnešní době stále v popředí výzkumů z důvodu snahy o zkracování doby regenerace rány a zamezení zdravotních komplikací během procesu hojení. Jako rána je označováno porušení integrity kožního krytí, ať už hluboké (zasahuje do *subcutis*) či povrchové (pouze na úrovni *epidermis* až *dermis*), dále porušení sliznice nebo povrchu některého orgánu vzniklé působením vnějších faktorů. Mezi tyto faktory je řazeno mechanické, termické, radiační a chemické působení [64].

Délka léčby se odvíjí od typu tkáně a závažnosti poranění. U komplikovanějších ran může být doba hojení i několik měsíců. V místě rány nejdříve dochází k aktivaci koagulační kaskády, která vede k tvorbě nerozpustné fibrinové sítě. Dále zde probíhají zánětlivé procesy způsobené imunitní odpovědí. Jako zánět se označuje reakce systému na lokální poškození tkání. Dochází mimo jiné k leukocytóze, tedy zvýšení koncentrace leukocytů nad fyziologický počet, nebo nahromadění makrofágů [65]. Tyto buňky jsou zodpovědné za boj s cizorodými látkami a patogeny a poskytují signály k zahájení procesu hojení.

K usnadnění léčby byla použita adheziva, která vyvolají akutní zánětlivou reakci pro urychlení hojení ran. Byla použita adheziva z anorganických nanomateriálů na bázi nanočástic z oxidu křemičitého, který má protizánětlivé účinky. Výhodou těchto nanočástic je porézní struktura a aktivní povrch, který zajišťuje silnou adhezi k tkáním a snadnou degradaci po splnění své funkce. Nanočástice napomáhají ke spojení porušených tkání tím, že reagují s tělesnou tekutinou v blízkosti rány. Na ránu následně nasedají zánětlivé buňky (neutrofilů, basofilů, eosinofilů, monocytů, T- a B-lymfocytů) a fibroblasty a tím je docíleno spojování ran bez nutnosti chirurgického zákroku v podobě sešívání [56].

Existuje mnoho typů obvazových materiálů na bázi polymerů, které mohou být použity k podpoře hojení ran. Tyto materiály se liší v závislosti na jejich složení, struktuře a vlastnostech.

Jedním z vhodných materiálů může být chitosan ve spojení s oxidem křemičitým. Tento kompozit může stimulovat proliferaci fibroblastů a angiogenezi. Konkrétně chitosan podporuje přirozenou hemokoagulaci a ukládání kolagenu do tkání. Naproti tomu oxid křemičitý podporuje uvolňování faktorů jako je tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-alfa) a transformující růstový faktor beta (TGF-beta) z aktivovaných alveolárních makrofágů. Zmíněné faktory jsou vzájemnými antagonisty a podílejí se na udržení rovnoměrné tvorby

kolagenu typu I. TNF-alfa je zodpovědný za obnovu tkání, zvyšuje expresi genu pro kolagen typu I. TGF-beta má opačný účinek, a to snižování exprese tohoto genu. Oba faktory jsou důležitými regulátory pro tvorbu kolagenu a tím i pro hojení porušených tkání a orgánů [66]. Tyto faktory mimo jiné napomáhají biosyntéze fibroblastů [57].

Hojení ran je velmi často doprovázeno rozvojem infekcí či zánětů. Za vznik infekcí jsou nejčastěji zodpovědné bakterie *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* či *Escherichia coli* [57]. Riziko vzniku infekcí lze eliminovat použitím vhodných obvazových materiálů s vlastnostmi jako je netoxičita, biologická rozložitelnost, antimikrobiální aktivita, biokompatibilita, pružnost, schopnost uvolňovat léčivé látky a dobrá propustnost plynů. Další nezbytné vlastnosti se určují podle cílového místa působení [57].

Jeden z nejčastějších typů používaných polymerních obvazových materiálů je hydrogel. Hydrogely jsou polymerní sítě, které mají schopnost zadržovat velké množství vody. Tyto materiály mohou být použity k udržování vlhkého prostředí na místě rány, což je klíčové pro podporu hojení. Hydrogely také pomáhají minimalizovat tvorbu jizev [55]. Vhodný polymer pro tvorbu hydrogelů je kyselina hyaluronová. Kyselina hyaluronová podporuje hojení ran tím, že stimuluje tvorbu nových buněk a kolagenu, který je důležitý pro správné zhojení. Navíc je HA schopna udržovat vlhké prostředí v místě rány, což je klíčové pro rychlé a úspěšné hojení. Obvazy s kyselinou hyaluronovou mohou být použity k léčbě různých typů ran, včetně vředů, popálenin nebo chirurgických ran. Tyto obvazy jsou obvykle vyrobeny z měkkých a pružných materiálů, aby se přizpůsobily tvaru rány a minimalizovaly bolest a nepohodlí [64]. Membrána z alginátu v kombinaci s HA a nanočásticemi stříbra byla použita pro hojení ran. Kombinací HA a nanočástic stříbra se zlepšily antimikrobiální účinky. Výsledkem tohoto kompozitu je materiál, který nejenže podporuje hojení ran díky přítomnosti kyseliny hyaluronové, ale také chrání ránu před bakteriální infekcí a urychluje proces hojení [67]. Dalším slibným kompozitem je HA s želatinou. Oba tyto materiály patří mezi biopolymery a jsou tak biokompatibilní s lidským organismem. Hydrogely na bázi HA s želatinou vykazují zvýšenou schopnost udržování vlhkosti v místě rány pro efektivnější hojení ran. Tento hydrogel nevykazuje buněčnou cytotoxicitu a v poměru 8 : 2 (želatina : HA) mají potenciál podporovat buněčnou proliferaci [55]. Kyselina hyaluronová může tvořit mimo jiné i vlákna, filmy nebo pěnové obvazy. Filmy se používají především v oftalmologii pro hojení ran způsobených syndromem suchého oka. Výhodou filmů je jejich pružnost, průhlednost a propustnost pro plyny [64]. Je prokázáno, že filmy v kompozitu kolagenu, chitosanu a HA zvyšují antimikrobiální

aktivitu antibiotika gentamicin sulfátu proti některým grampozitivním i gramnegativním bakteriím [64]. V současné době již existují na trhu komerčně vyráběné obvazové materiály na bázi chitosanu. Lze je nalézt pod názvy HidroKi®, Axiostat®, Chitopack®, Tegasorb® nebo KytoCel® [57].

Potenciálně vhodným materiálem může být kompozit z chitosanu, polyethylenoxidu a oxidu křemičitého. Tento materiál, v kombinaci s ciprofloxacinem jako antibakteriálním léčivem, splňuje výše uvedené vlastnosti a má účinnou antibakteriální aktivitu proti *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* [57]. Kombinace oxidu křemičitého s přírodními polymery zvyšuje stabilitu kompozitu. Samotné biopolymery jsou jinak nestálé ve vodném prostředí a dochází k rychlé degradaci. [57]. Nanovlákná chitosanu v kombinaci s polyethylenoxidem a oxidem křemičitým byla připravena metodou elektrospinningu [44]. Pomocí elektrospinningu se vytvoří požadovaný počet vláken, které jsou poté shromážděny a mohou být zpracovány do různých produktů, jako jsou obvazy, filtry, membrány, implantáty a další [47, 38].

### 1.5.3 Slizniční vakcíny

Slizniční vakcíny jsou jedním z novějších typů vakcín, které jsou aplikovány na slizniční povrchy. Tyto vakcíny lze aplikovat perorálně, intranazálně, vaginálně a sublinguálně [39]. Slizniční vakcíny jsou nejčastěji vyráběny ve formě spreje nebo kapek, které jsou aplikovány na sliznice, kde dojde k uvolnění antigenních částic, které aktivují imunitní systém. Největší část imunitního systému se nachází pod slizničním povrchem. Proto je výhodné použít právě slizniční vakcíny, které cíleně stimulují imunitní systém v místě expozice patogenu a aktivují místní buněčnou imunitu, což vede k tvorbě specifických protilátek (IgA) a ochraně před infekcí [69].

Produkce protilátek IgA na sliznicích je komplexní proces, který zahrnuje několik kroků. V případě perorálního podání vakcíny se antigen dostává do sliznic trávicí soustavy a tam je zachycen M-buňkami. M-buňky transportují antigen do oblasti Peyeroých plátů, kde se nachází velké množství imunitních buněk, které reagují s prezentovaným antigenem tím, že se diferencují až na plazmatické buňky. Plazmatické buňky produkují specifické IgA protilátky, které jsou transportovány sliznicemi do místa, kde byla stimulace zahájena [39]. Tyto protilátky blokují mimo jiné i adhezi patogenu k buňkám sliznic a tím brání rozvoji infekce [38].

Oproti parenterálnímu podání vakcín má slizniční vakcinace několik výhod. Vakcinace prostřednictvím slizničních povrchů je bezpečnější, snadněji se aplikuje, má vyšší specifitu a účinnost imunizace [38]. Na druhou stranu jsou některé slizniční vakcíny termálně nestabilní a náchylné k degradaci. To může způsobit problémy s jejich skladováním a transportem. Také tělní tekutiny mohou ovlivnit stabilitu a účinnost vakcíny. Například slizniční vakcíny, které jsou aplikovány perorálně, mohou být vystaveny trávicím enzymům v žaludku a střevech, což může vést k degradaci složek vakcíny a snížení její účinnosti. Také vychytávání antigenu Peyerovými pláty má nízkou účinnost oproti použití vakcín s nosičovými systémy [38]. Intranazální podání má oproti perorálnímu podání více výhod. Sliznice v nose má větší absorpční povrch, nižší proteolytickou aktivitu a celkově větší účinnost než orální imunizace [70].

Nosičové systémy mohou zlepšit stabilitu a účinnost antigenů ve vakcínách a umožňují kontrolované uvolňování antigenu. Tyto systémy mohou být navrženy tak, aby chránily složky vakcín před enzymy, pH změnami a dalšími faktory v těle, které by mohly vést k jejich degradaci [69]. Existuje několik typů nosičových systémů, které se používají pro slizniční vakcíny. Tyto zahrnují liposomy, polymerní mikročástice, nanočástice a další. V nedávných studiích bylo prokázáno, že velikost částic nosičů ovlivňuje příjem a zpracování imunitními buňkami. Nejlépe přijímané částice jsou o velikosti cca 300 nm. Důvodem je nejspíše podobná velikost patogenů, jako jsou například viry (5-300 nm) [69].

Pro nazálně podávaný antigen hepatitidy B byl použit nosičový systém s nanočásticemi chitosanu modifikovaných glykolem. Tato chemická modifikace byla zavedena z důvodu zvýšení rozpustnosti chitosanu ve vodě. V porovnání vakcíny s nemodifikovaným chitosanem vykazoval kompozit chitosan-glykol nižší rychlost nazální clearance a vyšší schopnost mukoadheze. Důvodem je zvýšení zeta potenciálu u částic chitosan-glycerol, a s tím spojený rozdíl v hustotě povrchového náboje [71].

Nanočástice z N,N,N-trimetylchitosanu jsou dalším z typů nosičů založených na modifikaci chitosanu. Byly zkoumány vlastnosti nanočástic N,N,N-trimetylchitosanu obohacené chřipkovým antigenem jako potenciální nosiče slizničních vakcín proti chřipce. Tyto vakcíny jsou vyvíjeny pro intranazální aplikaci a mohly by poskytnout ochranu proti různým kmenům chřipky. Vědecká studie ukázala, že nanočástice N,N,N-trimetylchitosanu mohou zvýšit imunitní odpověď na podaný antigen a zlepšit ochranu proti virové infekci [70].

Mezi další materiály, které lze využít jako nosiče ve slizničních vakcínách, patří polymery jako je kyselina polymléčná, poly (D, L-laktid-ko-glykolid), poly (D, L-mléčná-

koglykolová) kyselina, pullulan, polykaprolakton. Tyto polymery jsou rozsáhle studovány pro použití ve slizničních vakcínách díky svým specifickým vlastnostem, kterými je biokompatibilita, netoxičita, biologická rozložitelnost a schopnosti modifikací částic do požadovaných tvarů a velikostí [39].

Slizniční vakcíny se již používají v některých zemích, ale zatím nejsou tak hojně používány jako tradiční vakcíny aplikované parenterálně. V současné době se provádí řada výzkumů ohledně vývoje nových slizničních vakcín, které by mohly být v budoucnu použity na ochranu před různými infekčními chorobami.

#### **1.5.4 Léčba rakoviny**

Téma využití nosičových systémů ve spojení s léčbou rakoviny v oblasti výzkumu i klinické praxe se stále více rozšiřuje. Tento přístup může přinést značné výhody v terapii onkologických onemocnění, jako je zvýšení účinnosti léčby, snížení vedlejších účinků a zlepšení kvality života pacientů [72]. Konvenčně používaná chemoterapeutika mají několik nevýhod, které by nosičové systémy mohly vyřešit. Použitím nosičových systémů se sníží mechanismy rezistence vůči chemoterapeutiku,lepší se fyzikálně-chemická stabilita léčiv nebo specifita vůči patologickým buňkám [73].

Existují různé typy nosičů, které mohou být použity k transportu léčiv k nádorovým buňkám, včetně liposomů, mikročástic, nanočástic, gelů a micel polymerů [72, 73]. Tyto nosiče mohou být navrženy tak, aby měly specifické vlastnosti, jako je požadovaná velikost, povrchový náboj a rozpustnost [72].

Použití liposomů jako nosičů léčiv umožňuje zlepšit biodostupnost, snížit toxicitu a zvýšit terapeutický účinek léčiv. Liposomy se ukázaly být užitečné jako nosiče specifického lineárního TT1 peptidu pro cílení na protein p32. Ukázalo se, že protein p32 má zvýšenou expresi v nádorových buňkách u karcinomu prsu. Liposomy byly modifikovány TT1 peptidem a byly navázány chemoterapeutické léky doxorubicin a sorafenib. Modifikace léčiv s liposomy zvýšila terapeutickou aktivitu chemoterapeutik a umožnila tak cílenou léčbu [73].

Dalším příkladem nosičových systémů je kompozit nanočástic s alginátem sodným a chitosanem s chondroitin sulfátem. Kompozit byl připraven technologií elektrostatického rozprašování. Chondroitin sulfát má protizánětlivé a protirakovinné vlastnosti a může pomoci stimulovat imunitní systém k boji proti nádorovým buňkám, zatímco alginát sodný a chitosan poskytují stabilitu a možnost transportu látek do cílových tkání. Celkově je tento

kompozitní materiál slibným kandidátem pro použití v léčbě rakoviny. Tento kompozit byl použit jako tzv. protinádorový imunopotenciátor; to je látka, která stimuluje imunitní systém k boji proti rakovinným buňkám a podporuje tak protinádorovou imunitu [74].

Využití nosičových systémů v léčbě rakoviny nabízí velký potenciál pro vývoj nových typů terapií s vyšší účinností a menšími vedlejšími účinky než klasické chemoterapie. V budoucnu se očekává, že nosičové systémy budou hrát stále větší roli v personalizované medicíně, kdy budou moci být navrženy a upraveny pro každého pacienta individuálně. Díky pokroku v oblasti biotechnologií a bioinformatiky je také možné očekávat vývoj nových léčebných strategií založených na genetických a molekulárních charakteristikách nádoru, což by mohlo vést k větší účinnosti a lepšímu přizpůsobení terapie jednotlivým pacientům.

### **1.5.5 Zobrazovací činidla**

Nosičové systémy obsahující polymery v kombinaci se zobrazovacími činidly se často vyvíjejí a v některých případech i používají jako alternativa ke klasickým kontrastním činidlům v různých diagnostických a zobrazovacích technologiích, jako jsou například CT (výpočetní tomografie), magnetická rezonance, ultrazvukové zobrazování a další. Tyto systémy umožňují snímání obrazů tkání a převádějí je na digitální formát, který může být analyzován a zpracován softwarovými aplikacemi [75].

Nosičové systémy lze používat k diagnostice rakoviny. Nosiče mohou být označeny látkou, která umožňuje detekování nádorových buněk, jako jsou například nanočástice zlata. Nanočástice zlata mohou být snadno modifikovány do různých velikostí a tvarů, jsou netoxické, účinně absorbují elektromagnetické záření a poskytují vysoké rozlišení v zobrazovacích metodách. Nejpoužívanější zobrazovací metodou pro diagnostiku rakoviny je CT z důvodu vysokého rozlišení, nízké ceny a funkčnosti se všemi typy pacientů. Nanočástice zlata se akumulují výhradně v nádorech díky efektu zvýšené permeability a retence (EPR efektu) a ohraničují tak místo, kde se nádor nachází. Pomocí CT lze tak nádor lépe zmapovat a následně zahájit přesnější radiační terapii. Tím se sníží expozice nežádoucího radiačního záření pro okolní zdravé tkáně a nedochází tak k jejich poškození. Pro zlepšení vlastností nanočástic zlata je možné vytvořit polymerní micely na bázi polyethylenglykolu a polykaprolaktonu s hydrodynamickou velikostí v rozmezí od 25 do 150 nm naplněné nanočásticemi zlata. Tyto micely vykazují delší cirkulační časy, lépe se akumulují v nádoru a mají lepší rozlišení v záznamu z CT [75].

Dalšími polymerními nanočásticemi pro diagnostiku nádoru pomocí magnetické rezonance jsou nanočástice s obsahem gadolinia modifikované protilátkou proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (anti-VEGF). Konkrétně byly tyto polymery použity pro zobrazování hepatocelulárního karcinomu pomocí magnetické rezonance. Hepatocelulární karcinom je celosvětově velmi rozšířeným a vysoce letálním onemocněním [76]. Proto je včasná diagnóza důležitá z důvodu nasazení rychlé léčby. Magnetická rezonance dokáže vytvářet trojrozměrné obrazy orgánů a na rozdíl od CT nenese rizika spojená s ionizujícím zářením [76]. Ke zvýšení diferenciací mezi jednotlivými tkáněmi se používají kontrastní činidla. V klinické praxi se nejčastěji využívají činidla na bázi chelátů gadolinia (např. Magnevist®). Tato činidla jsou však poměrně rychle eliminována renální filtrací z důvodu nízké molekulové hmotnosti, což má za následek krátkou dobu zobrazování. Je zde také nízká specifita k cílovým orgánům. Z těchto důvodů byl pro přípravu nanočástic použit kompozit kyseliny polymléčné, polyethylenglykolu a polylysinu, který vykazuje delší dobu zobrazení, nízkou toxicitu, zvýšení kontrastu a má efekt aktivního cílení, který má za důsledek specifickou akumulaci kontrastních látek do maligních nádorů. K aktivnímu cílení byla použita zmíněná protilátka anti-VEGF, která cílí proti markeru u hepatocelulárního karcinomu, u kterého byla prokázána nadměrná exprese VEGF. Cheláty gadolinia byly kovalentně vázány na povrch kompozitu. Kompozit významně zvýšil specifitu akumulace do nádoru, intenzitu signálu a dobu zobrazování ve srovnání s kontrastním činidlem Magnevist® [76].

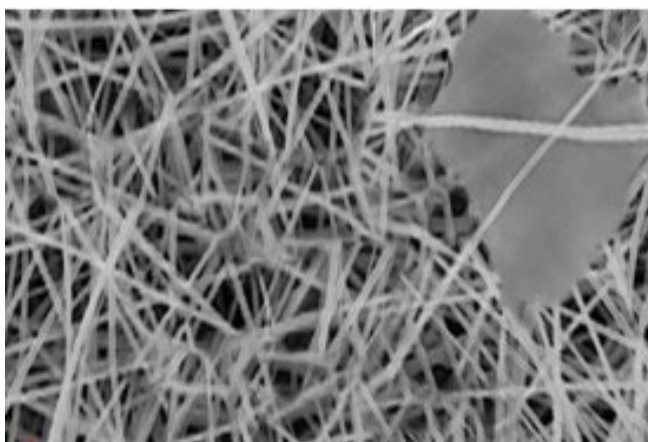
Mezi další polymery používající se jako zobrazovací činidla patří magnetické nanočástice [77], feromagnetické nanočástice, nanočástice oxidu železa [78], nanočástice oxidu manganu [79].

### 1.5.6 Tkáňové inženýrství

Chitosan může být v tkáňovém inženýrství využit jako nosič podpůrných buněk pro regeneraci kostní tkáně. Nosiče z chitosanu podporují tvorbu osteoblastů, což jsou buňky, odpovědné za tvorbu kostí a chrupavek. Konkrétně kompozit chitosanu, polyvinylalkoholu a oxidu grafenu by mohl regenerovat chrupavčitou tkáň tím, že by sloužil jako nosič pro buněčné linie nebo kmenové buňky kostní a chrupavčité tkáně [80]. Kompozit byl vyroben ve formě vláken technikou elektrostatického zvlákňování. Elektrostatické zvlákňování bylo použito především z důvodu zvýšení pórovitosti nanovláken a vysokému poměru povrchu k objemu nanovláken. Na Obr. 6 je snímek nanovláken zmíněného



kompozitu. Snímek byl vytvořen pomocí stolního elektronového mikroskopu s autoemisním zdrojem (FESEM).



**Obrázek 6:** FESEM snímek nanovláken CS/PVA/GO [80].

Oxid grafenu (GO) je syntetizován oxidací grafitu a vyniká skvělými mechanickými vlastnostmi. Je vysoce pružný, dobře rozpustný, má vysokou biokompatibilitu a antimikrobiální vlastnosti. Tento materiál též podporuje diferenciaci kmenových buněk nebo hojení ran. Z tohoto důvodu byl přidán do kompozitu s chitosanem a polyvinylalkoholem. Z experimentů bylo zjištěno, že použití grafenu zvýšilo pružnost a pevnost materiálu v tahu. Nanovláknna byla také biokompatibilní s chondrogenními buňkami ATDC5. Tato chondrogenní buněčná linie se používá nejčastěji ke zkoumání faktorů a drah souvisejících s vývojem skeletu, kam se řadí i zmíněná chrupavka [80].

Metodou elektrostatického zvlákňování byla připravena vlákna chitosanu s polykaprolaktonem, která byla použita jako vaskulární stenty do arterií s malými rozměry. Na rozdíl od nejpoužívanějších materiálů jako jsou kovové stenty či stenty z umělé hmoty, se tyto bioaktivní materiály lépe infiltrují do organismu a zmírňují tak negativní dopad při rozvoji imunitní odpovědi [81].

### **1.5.7 Nanotechnologie pro úpravu vody a ovzduší**

Aktuálním tématem vědeckých článků je velký nárůst znečištění ovzduší, půdy, a především vodních zdrojů. Velký podíl na kontaminaci má především masivní průmyslová výroba, těžba surovin, zemědělství a s ním spojené nadužívání pesticidů a herbicidů [82]. V důsledku toho vznikají škodlivé látky a sloučeniny, které nelze jednoduše odstranit z půdy, vodních zdrojů či ovzduší. Lze mezi ně zařadit například těžké kovy, barviva, různé

těkavé organické sloučeniny, organické sloučeniny fosforu, pesticidy, herbicidy, hnojiva, ropné skvrny, toxické plyny, odpadní vody [82]. Degradace těchto látek je finančně i časově velmi nákladná. V důsledku toho je nutné zavádění nových technologií a metod pro úpravu vody. V tom by mohly být nápomocny nové nanotechnologie, konkrétně využití nanokatalyzátorů, které pracují na principu adsorpce škodlivých látek na nanočásticích zlata, magnetitu, oxidu zinečnatého, titaničitého, hlinitého, hořečnatého, grafen, dusičnany. Pro separaci plynů jsou účinné materiály s oxidem uhelnatým, oxidem siřičitým [82].

Oxid grafenu má schopnost vázat těžké kovy a jeho adsorpční kapacita je poměrně vysoká. Nanočástice chitosanu v kompozitu s chitosan-g-polykyselinou akrylovou a attapulgitem lze použít pro adsorpci iontů mědi z vodného roztoku. Tento kompozit má vysokou adsorpční i desorpční kapacitu, takže ho lze využít pro účinné odstranění  $\text{Cu}^{2+}$  iontů z vodného roztoku [83]. Jiný kompozit chitosanových částic navázaných na magnetické nanočástice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modifikovaný iontovou gelací s tripolyfosfátem má vysokou účinnost adsorpce olovnatých a měďnatých iontů. Ve vodném roztoku však dochází u těchto nanočástic k dezintegraci, v alkalickém roztoku o pH 9 také k agregaci částic z důvodu slabých elektrostatických interakcí mezi molekulami chitosanu a TPP [34, 85]. Nanokompozit chitosanu s magnetitem je vhodný pro adsorpci arseničných iontů z vodného prostředí [86].

## 1.6 Vybrané metody zpracování a charakterizace materiálů/částic

### 1.6.1 Lyofilizace

Pro zachování vlastností a stability částic, ať už samotných nebo s ligandy, se využívá metoda lyofilizace. Lyofilizace je proces sušení, který umožňuje odstranit vodu nebo jiná rozpouštědla z materiálu při nízkých teplotách a tlacích. Využívá fyzikálních principů sublimace zmražených rozpouštědel, tedy přímé přeměny tuhé látky na plynnou fázi bez přechodu do kapalné fáze, což minimalizuje poškození materiálu a zachovává se jeho struktura a biologická aktivita [87]. Tento proces zahrnuje zamrazení materiálu, odstranění vodných roztoků sublimací a desorpci zbývající vlhkosti vysušením, čímž se získává suchý, porézní produkt s vysokou stabilitou a dlouhodobou trvanlivostí. Lyofilizace se používá v široké škále aplikací, jako jsou farmaceutické a biologické přípravky, potraviny nebo kosmetické produkty. Ve farmacii se lyofilizace využívá pro zachování fyzikálně-chemických vlastností u biologických materiálů, jako jsou enzymy, vakcíny a léky, které jsou za fyziologických podmínek nestabilní nebo dochází k urychlení degradace [36].

V oblasti nosičových systémů se lyofilizace využívá především z důvodu zlepšení stability částic. Částice chitosanu jsou během delší doby skladování náchylné k agregaci v suspenzi. Může také docházet k předčasnému uvolnění vázaného léčiva nebo proteinu z částic. Lyofilizace zvyšuje stabilitu chitosanových částic tím, že eliminuje vodu, která může být přítomna v jejich struktuře a může být zdrojem oxidace a hydrolýzy. Lyofilizát částic je mnohem méně náchylný k degradaci a může být skladován a používán po delší dobu bez ztráty jeho biologických vlastností [36].

Proces lyofilizace se skládá ze tří hlavních fází. V první fázi dochází k zamrazení. Suspenze je zmrazena, což má za následek vytvoření ledových krystalů. Druhým krokem je sublimace. V této fázi se ledové krystaly sublimují, tedy přímo přecházejí z tuhé do plynné fáze, přičemž se z materiálu odpařuje voda. Sublimace se obvykle provádí za vakua, což umožňuje snadnější odpařování vlhkosti. Poslední fází je desorpce, při které dochází k odstranění zbytkové vlhkosti pomocí zvýšení teploty [88].

Během procesu lyofilizace může voda v částicích krystalizovat a vytvářet ostré krystaly, které mohou porušit strukturu částic, což může vést k nevratným poškozením. Z tohoto důvodu se používají tzv. kryoprotektanty. Použití kryoprotektantů umožňuje snížit tvorbu ledových krystalů během zmrazení a tím minimalizovat poškození buněk a tkání. Kromě toho kryoprotektanty chrání buněčné membrány a bílkoviny před denaturací a usnadňují rychlé zmrazení a následné rozmrazení. Obdobně chitosan podléhá během procesu lyofilizace bez použití kryoprotektantů silným inter- a intramolekulárním interakcím v místech vodíkových můstků, které mohou negativně ovlivnit fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je viskozita, zeta potenciál a schopnost absorpce vody [36]. Existuje mnoho různých kryoprotektantů, které mají různé výhody a nevýhody v závislosti na aplikaci. Některé z nejčastěji používaných zahrnují bezvodá rozpouštědla jako dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, etylenglykol. Často se používají také sacharidy a to trehalóza, mannitol, sorbitol a sacharóza. Tyto kryoprotektanty se aplikují před zmrazením a umožňují rychlejší ochlazení a následné rozmrazení s minimálním poškozením struktury chitosanových částic a vláken [87].

Studie [26] porovnávala účinnost různých kryoprotektantů na stabilitu a změnu velikosti chitosanových částic. Studie ukázala, že při srovnání použitých kryoprotektantů, kterými byla trehalóza, mannitol a PEG, bylo pozorováno zvětšení velikosti částic u mannitolu a polyethylenglykolu. Zvýšení velikosti částic bylo způsobeno především agregací částic a jejich nestabilitou. Oproti tomu použití trehalózy jako kryoprotektantu vedlo k výrazně vyšší stabilitě a minimálním změnám ve velikosti částic. Tyto výsledky

mohou souviset s vlastnostmi trehalózy, kterými jsou nízká hygroskopičnost, absence vnitřních vodíkových vazeb, a s tím spojená lepší vaznost na částice, nízká chemická reaktivita a také vyšší teplota skelného přechodu.

Další studie [89] se zabývala přípravou nanočástic z chitosanu jako perorálního nosiče inzulínu. K procesu lyofilizace byly použity různé kryoprotektanty s širokou škálou koncentrací. Kryoprotektanty nanočástic byly sacharóza, mannitol, sorbitol a trehalóza. S použitím 7 % mannitolu indukovaly lyofilizované nanočástice chitosanu minimální odchylky ve velikosti před a po lyofilizaci, zanedbatelný rozdíl v zeta potenciálu a slibnou účinnost zapouzdření inzulínu do nanočástic.

Použití konkrétních kryoprotektantů v různých koncentracích závisí na použitém materiálu a aplikaci. Proto není možné určit jeden společný pro všechny dostupné aplikace.

## **1.7 Fyzikálně-chemická charakterizace materiálů**

Znát fyzikálně-chemické vlastnosti polymerů je klíčové pro úspěšné využití těchto materiálů v různých oblastech nosičových systémů. Polymerové nosiče jsou používány k transportu léčiv do cílových tkání a buněk v těle, a proto je důležité, aby byly tyto nosiče přizpůsobeny požadovaným vlastnostem a potřebám konkrétní terapie. Mít povědomí o fyzikálně-chemických vlastnostech polymerů může také pomoci při vývoji nových typů nosičů. Pomocí těchto informací lze optimalizovat vlastnosti nosičů pro konkrétní aplikace a umožnit tak vytvoření nosičů, které jsou účinnější a bezpečnější pro pacienty. Fyzikálně-chemické vlastnosti polymerů mohou ovlivňovat různé procesy v těle, jako je distribuce, vstřebávání a metabolismus léčiv [26].

### **1.7.1 Měření velikosti částic**

Velikost částic může ovlivnit vlastnosti a chování polymerních nosičů v těle. Při výrobě nosičů léčiv může být velikost částic kritickým faktorem, který ovlivňuje průchodnost nosičů přes biologické bariéry, adhezi na povrchy, interakci s tkáněmi a buňkami nebo rychlost a množství uvolňování léčiv z nosiče [90]. Kromě toho může být velikost částic důležitá pro interakci biopolymerů s tkáněmi a buňkami. Například při použití chitosanu v regenerativní medicíně, kde se snažíme stimulovat růst a regeneraci tkání, může být důležitá velikost částic chitosanu pro podporu růstu buněk [26]. Existuje několik metod, které lze použít k měření velikosti částic nebo vláken nosičů. Jednou z metod je rozptylová metoda laserového světla (DLS). Tato metoda měří intenzitu rozptylu světla od částic

v roztoku při úhlu  $90^\circ$ . Na základě této intenzity se vypočítá průměrná velikost částic v roztoku. Další metodou je elektronová mikroskopie, konkrétně metoda skenovací elektronové mikroskopie (SEM) nebo transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Tyto metody umožňují přímou vizualizaci částic nebo vláken pomocí elektronového paprsku [26]. Rozdíl mezi SEM a TEM spočívá v tom, jak se elektrony používají k vizualizaci vzorku. V TEM procházejí elektrony tenkým řezem vzorku a přenáší informace o struktuře na detektor. Na druhé straně SEM používá elektrony k ozařování povrchu vzorku a zaznamenávají se rozptýlené elektrony, což umožňuje získat detailní 3D obraz povrchu. TEM je tedy vhodný pro vizualizaci vnitřní struktury vzorku, zatímco SEM umožňuje vizualizaci povrchu vzorku [91].

### 1.7.2 Zeta potenciál částic

Zeta potenciál je hodnota povrchového elektrického náboje částic v roztoku nebo suspenzi. Vyjadřuje jejich schopnosti odpuzovat se navzájem a vyjadřuje jejich koloidální stabilitu. Vyjadřuje se v jednotkách voltů a značí se symbolem zeta ( $\zeta$ ). Výsledná hodnota zeta potenciálu ovlivňuje stabilitu částic v suspenzi a jejich schopnost tvořit agregáty. Dále ovlivňuje interakce mezi polymerními částicemi a cílovými buňkami, což může ovlivnit účinnost dodání léčiv do těla. Zároveň může být zeta potenciál významně ovlivněn molekulovou hmotností nebo koncentrací polymeru, pH roztoku, a také rychlostí míchání média částic. Čím vyšší je hodnota zeta potenciálu, tím silnější je elektrostatická odpuzovací síla mezi částicemi. Pokud je hodnota zeta potenciálu dostatečně vysoká, mohou částice zůstat stabilní v roztoku, protože se navzájem odpuzují. V opačném případě se částice přitahují a tvoří agregáty, což vede ke ztrátě stability. Obecně jsou částice se zeta potenciálem vyšším než +30 mV nebo nižším než -30 mV považovány za stabilní [25].

Hodnoty zeta potenciálu jsou důležité pro předvídání chování a stability polymerů v biologickém prostředí a mohou být využity při optimalizaci syntézy a modifikace biopolymerů pro konkrétní aplikace v medicíně.

### 1.7.3 Polydisperzní index

Polydisperzní index (PDI) je hodnotou rozdílnosti velikosti částic v suspenzi nebo roztoku [26]. Pokud jsou všechny částice stejné velikosti, bude PDI roven 0, což odpovídá monodisperzním systémům a homogenitě disperze. Čím vyšší je hodnota PDI, tím větší je rozdílnost velikosti částic v suspenzi nebo roztoku a tím je systém více polydisperzní. PDI

je důležitým faktorem při návrhu a charakterizaci nosičů léčiv, protože rozdílnost velikosti částic může ovlivnit jejich stabilitu a účinnost [90].

#### **1.7.4 Velikost pórů**

Velikost pórů ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti nosičů, jako je povrchová plocha, rozpustnost, permeabilita a reaktivita. Například u nosičů pro léčivé látky může velikost pórů ovlivnit schopnost nosiče vázat, transportovat a uvolňovat léčiva nebo ovlivňovat stabilitu a biodegradabilitu nosiče. Větší velikost pórů je vhodnější pro nosiče, které mají sloužit k rychlejší difúzi látek nebo k většímu toku kapaliny. Tyto nosiče mají větší objemový průtok a nižší celkový odpor, což zlepšuje rychlost transportu látek. Naopak, menší póry jsou vhodnější pro nosiče, které mají sloužit k uchování a pomalému uvolňování látek, například při řízeném uvolňování léčiv. Velikost pórů může být přizpůsobena výběrem vhodného materiálu a procesu výroby nosiče. Měření velikosti pórů může být prováděno různými metodami, například pomocí adsorpce plynů. Tato metoda umožňuje měření velikosti pórů a distribuci pórů v polymeru na základě schopnosti plynů adsorbovat se na povrch porézního materiálu. Plyn se vpraví do vzorku a měří se množství plynu, které se adsorbuje v závislosti na velikosti pórů. Další metodou měření je pomocí elektronové mikroskopie (SEM a TEM), kterou lze použít k vizualizaci pórů v materiálu a k měření velikosti pórů [92].

#### **1.7.5 Míra bobtnání**

Míra bobtnání vyjadřuje schopnost polymeru absorbovat vodu. U hydrogelů je míra bobtnání klíčovým parametrem pro mnoho aplikací, a to především v oblasti hojení ran a řízeném uvolňování léčiv. Míra bobtnání hydrogelů závisí na mnoha faktorech, včetně chemické struktury polymeru, teploty, pH nebo iontové síly [4].

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce byla příprava, charakterizace a lyofilizace biokompatibilních nosičů s obsahem chitosanu a SiO<sub>2</sub> mikrovláken s modelovým proteinem ovalbuminem. Jako nosiče byly studovány částice z chitosanu a kyseliny hyaluronové, mikrovlákná oxidu křemičitého a jejich kombinace. Charakterizace nosičů zahrnovala hydrodynamickou velikost (DLS) včetně PDI, měření povrchového náboje částic (zeta potenciál) a SEM analýzy. Na připravené nosiče byl metodou adsorpce vázán modelový protein ovalbumin a byla hodnocena míra sorpce a uvolňování proteinu z nosiče v čase.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

- analytické váhy Kern ABT 220-5DM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Německo)
- analyzátor velikosti částic a zeta potenciálu HORIBA Scientific SZ-100-Z (HORIBA Ltd, Horiba France SAS, Francie)
- centrifuga MiniSpin, rotor 6 cm (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- centrifuga Eppendorf AG 5702 (Hamburg, Německo)
- dialyzační střívka – MWCO 300 kDa, SpectraPor® , Biotech CE Tubing, Thermofisher
- filtr pro injekční stříkačku (25 mm Syringe Filter) – 0,45 µm celulózo-acetátová membrána (VWR international, North America, USA)
- křemenné kyvety – Semimikrokyveta SM/Q5, optická délka 5 mm (Exacta + Optech, Mnichov, Německo)
- laboratorní pomůcky – laboratorní sklo (kádinky, odměrné nádoby, odměrné válce), lékovky s víčkem a gumovými uzávěry, mikrozkušavky Eppendorf, mikropipety Eppendorf a Biohit, mikrotitrační destičky
- lyofilizátor L4-110 Pro (GREGOR Instruments s. r. o., Říčany, ČR)
- magnetické míchadlo Big Squid (IKA-WERKE, Německo)
- magnetické míchadlo MM4 LAVAT (LAVAT a.s., Chotutice, Česká republika)
- pH metr Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- rotátor – mini-rotátor Bio RS-24 Biosan (Biosan Laboratories, Inc., Warren, Spojené státy americké)
- rotátor Grant-bio (Grant Instruments Ltd, Shepreth, Cambridgeshire, Velká Británie)
- skenovací elektronový mikroskop (JSM 7500F, JEOL Ltd.)
- spektrofotometr Labsystems Multiscan RC (Labsystems Diagnostics Oy, Helsinki Vantaa, Finsko)
- stanice pro přípravu deionizované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Spojené státy americké)
- termostat INCU-Line (VWR International Ltd, Lutterworth, Leicestershire, Velká Británie)



- třepačka Mini Rocker MR-1 Biosan (Biosan Laboratories, Inc., Warren, Spojené státy americké)
- vortex (Grant-bio, Cambridge, Velká Británie)

### 3.2 Reagencie a chemikálie

- Celulóza (Perlóza, MT 100; 30-50  $\mu\text{m}$ ; vážková analýza: zjištěno, že 4 mg celulózy odpovídá objemu 30  $\mu\text{l}$  celulózy)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát –  $M_r = 156,01 \text{ g/mol}$ ; 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , Lach-Ner, s. r. o. (Neratovice, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p. a. –  $M_r = 358,14 \text{ g/mol}$ , 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , Penta s.r.o. (Chrudim, Česká republika)
- Chitosan - ChitoClear > 95% deacetylce),  $M_w \sim 110 - 360 \text{ kDa}$ , vysoká kvalita 10, 43000, Primex (Siglufjordur, Island)
- Kyselina hyaluronová, HYSILK, 200318-E1,  $M_w \sim 150 - 350 \text{ kDa}$ , Contipro (Dolní Dobrouč, Česká republika)
- Kyselina octová 99% p.a. –  $M_r = 60,05 \text{ g/mol}$ ,  $\rho = 1,055 \text{ g/cm}^3$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Penta s. r. o. (Chrudim, Česká republika)
- Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit, 23235, Pierce Biotechnology (Rockfor, IL, USA)
- Ovalbumin A7641,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- $\text{SiO}_2$  mikrovlákná připravená metodou odstředivého spřádání od Dr. Jana Macáka a Ing. Lud'ka Hromádka (CEMNAT UPCE), specifický povrch dle BET 600–700  $\text{m}^2/\text{g}$ , velikost pórů 0,38  $\text{cm}^3/\text{g}$ , průměr vláken  $1100 \pm 500 \text{ nm}$
- Trehalóza dihydrát -  $M_r = 378.33 \text{ g/mol}$ ,  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Tripolyfosfát sodný, TPP –  $M_r = 367,86 \text{ g/mol}$ ,  $\text{Na}_5\text{O}_{10}\text{P}_3$ , Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)

### 3.3 Příprava chitosanových částic

Chitosanové částice byly připraveny metodou ionotropního gelovatění s tripolyfosfátem. U chitosanu s tripolyfosfátem může docházet k ionotropnímu gelovatění díky elektrostatickým interakcím mezi kationty chitosanu a anionty tripolyfosfátu. Metoda byla provedena podle [26].

#### *Použité roztoky:*

- 0,05% roztok kyseliny octové ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )
- 2,5 mg/ml roztok chitosanu v 0,05 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- 0,25 mg/ml roztok chitosanu v deionizované vodě
- 0,25 mg/ml roztok TPP v deionizované vodě

#### *Postup:*

Byl připraven roztok chitosanových částic od společnosti Primex s molekulovou hmotností 110–360 kDa o koncentraci 2,5 mg/ml rozpuštěných v 0,05%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Dále byl roztok promícháván na magnetickém míchadle 24 hodin při laboratorní teplotě. Během 24 hodin se udržovalo pH částic přibližně 4,8. Pokud bylo pH vyšší, roztok se okyselil 0,05 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Po 24 hodinách se následně zásobní roztok chitosanu naředil na koncentraci 0,25 mg/ml v deionizované vodě a roztok byl přefiltrován přes 0,45 $\mu\text{m}$  celulózo-acetátovou membránu. Dále byl připraven zásobní roztok tripolyfosfátu v deionizované vodě o koncentraci 0,25 mg/ml. Roztok TPP byl také přefiltrován přes 0,45 $\mu\text{m}$  celulózo-acetátovou membránu. Samotné částice poté byly připraveny v lékovkách přikapáváním 0,25 mg/ml roztoku TPP k 0,25 mg/ml chitosanu v poměru CS:TPP = 5 : 1 v tripletu. Tvorba částic probíhala po dobu 30 minut za stálého míchání na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě. Dále byl odebrán 1 ml (odpovídající 250  $\mu\text{g}$  částic) do 0,5 ml deionizované vody a změřila se hydrodynamická velikost částic (DLS), polydisperzní index a zeta potenciál.

### 3.4 Příprava chitosanových částic s kyselinou hyaluronovou

Principem této přípravy je vytvoření vodíkových vazeb mezi karboxylovými skupinami kyseliny hyaluronové a volnými aminoskupinami, přítomnými na povrchu částic chitosanu. Metoda byla upravena a vychází z tohoto zdroje [33].

#### *Použité roztoky:*

- 0,1 M acetátový pufr pH 5
- 1,5 mg/ml roztok kyseliny hyaluronové v 0,1 M acetátovém pufru pH 5

#### *Postup:*

Byly připraveny chitosanové částice s tripolyfosfátem podle kapitoly 3.3. Částice byly po dialýze do 0,1 M acetátového pufru pH 5 obaleny kyselinou hyaluronovou HYSILK, Mw ~ 150–350 kDa, Contipro (Dolní Dobrouč, Česká republika). Obalení probíhalo přikapáváním CS:TPP částic k roztoku HA na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Poměr objemových dílů roztoku chitosanových částic k HA byl 1 : 1. U připravených a homogenizovaných vzorků částic byla měřena DLS a zeta potenciál v prostředí deionizované vody dle kapitol 3.8.1 a 3.8.2. U zbylého roztoku následovala dialýza v deionizované vodě dle kapitoly 3.6.

### 3.5 Příprava kompozitu s chitosanovými částicemi a mikrovlákny oxidu křemičitého

Principem přípravy kompozitu bylo promísení vláken oxidu křemičitého se záporně nabitými hydroxylovými skupinami a chitosanových částic s kladně nabitými aminoskupinami v roztoku.

#### *Postup:*

Byl navážen 1 mg SiO<sub>2</sub> mikrovláken, ke kterým byl přidán 1 mg připravených chitosanových částic, které byly připraveny podle kapitoly 3.3. Roztok byl důkladně promíchán a použit pro další experimenty.

### 3.6 Dialýza částic

Principem dialýzy je difúze nízkomolekulárních látek přes dialyzační membránu s určitou velikostí pórů, která je nepropustná pro látky s vyšší molekulovou hmotností. Hnací silou dialýzy částic je koncentrační gradient dialyzované látky a rychlost dialýzy je určena především koncentračním spádem, který je na začátku experimentu nejrychlejší a postupně se zpomaluje.

#### *Použité roztoky:*

- Destilovaná voda
- 0,1 M acetátový pufr pH 5

#### *Postup:*

Z dialyzačních střívek (SpectraPor®, Biotech CE Tubing, Thermofisher) bylo odebráno 3krát po cca 6 cm. CS:TPP částice připravené v tripletu byly jednotlivě napipetovány do hydratovaných střívek a ponořeny po jednom do destilované vody. U CS:TPP/HA částic probíhala dialýza v 0,1 M acetátovém pufru pH 5. Objem vody odpovídal nejméně 100násobku objemu vzorku. Dialýza probíhala 16 hodin při laboratorní teplotě s mírným mícháním pomocí míchadla. Během experimentu došlo třikrát k výměně dialyzačního roztoku v rozmezí cca 5-8 hodin. Po ukončení experimentu byl odebrán celý objem vzorku ze střívek a byla přepočítána koncentrace částic v roztoku.

### 3.7 Lyofilizace částic

Lyofilizace, také nazývána sublimace nebo sušení mrazem, je proces odstraňování kapaliny ze suspenze částic při nízkém tlaku nebo ve vakuu.

#### *Použité roztoky:*

- Trehalóza (Sigma-Aldrich) 55 % w/v

#### *Postup:*

K 1 ml vzorku částic (odpovídá 250  $\mu$ g částic) bylo přidáno 0,1 ml trehalózy. Zmražení na teplotu  $-80$  °C probíhalo v lyofilizačních vialkách s víčkem. Takto připravené vzorky byly vloženy do lyofilizátoru a po ustálení teploty na  $-80$  °C byla zahájena

lyofilizace, která trvala 24 hodin při teplotě -110 °C. Po ukončení lyofilizace byla na vialky dána gumová zátka s víčkem. Vialky byly uskladněny při teplotě 4 °C.

### **3.8 Fyzikálně-chemická charakterizace částic**

U připravených částic byla stanovena průměrná hydrodynamická velikost DLS, polydisperzní index PDI a zeta potenciál. Tyto veličiny byly měřeny pomocí dynamického rozptylu světla na přístroji Horiba Scientific (software SZ-100).

#### **3.8.1 Stanovení hydrodynamické velikosti částic**

***Použité roztoky:***

- Deionizovaná voda

***Postup:***

Pro měření hydrodynamické velikosti částic bylo odebráno množství 250 µg částic, které bylo doplněno na celkový objem 1,5 ml deionizovanou vodou. Byla změřena hydrodynamická velikost na přístroji Horiba Scientific (software SZ-100). Velikost částic byla měřena pod úhlem 173° v jednorázových kyvetách (Brand GMBH, P-LAB, Praha, Česká republika) s hodnotou indexu lomu pro chitosan 1,540. Každé měření bylo provedeno v minimálně 12 opakováních při teplotě 25 °C. Výsledné hodnoty DLS byly určeny jako průměr z těchto 12 měření doplněné směrodatnou odchylkou měření.

#### **3.8.2 Stanovení zeta potenciálu částic**

***Postup:***

Pro měření zeta potenciálu částic bylo odebráno množství 250 µg částic, které bylo doplněno na celkový objem 1,5 ml deionizovanou vodou. Vzorek částic byl pomocí plastové stříkačky pomalu vstříknut do měřicí kyvety, která byla před samotným měřením propláchnuta vodou, aby se eliminovaly případné vzduchové bubliny, které by mohly negativně ovlivnit výsledky měření. Samotná kyveta je složena z komory pro vzorek a z elektrod. Takto připravená kyveta byla vložena do analyzátoru Horiba Scientific (software SZ-100) a byl změřen zeta potenciál. Každé měření bylo provedeno v minimálně 12 opakováních při úhlu rozptylu 90° a konstantní teplotě 25 °C pro udržení konstantní

viskozity média. Výsledné hodnoty zeta potenciálu byly určeny jako průměr z těchto 12 měření doplněné směrodatnou odchylkou měření. Byla použita hodnota Peak1 size (Mean).

### **3.8.3 Analýza částic metodou SEM**

SEM (scanning electron microscopy) umožňuje pozorování a zobrazení povrchového detailu a morfologie částic s vysokým rozlišením. SEM využívá paprsek elektronů ke skenování povrchu vzorku a zaznamenávání informací o interakci elektronů s povrchem. Z výstupních dat SEM můžeme získat informace o tvaru, velikosti, struktuře a rozložení částic.

#### ***Postup:***

Analýzu vzorků SEM poskytl pan Ing. Hromádko z CEMNATu Univerzity Pardubice. Analýza probíhala na skenovacím elektronovém mikroskopu (JSM 7500F, JEOL Ltd.). Byla hodnocena detekce částic, mikrovláken a jejich velikosti.

## **3.9 Adsorpce ovalbuminu na připravené částice**

Principem adsorpce ovalbuminu na částice je interakce mezi proteinem ovalbuminem a nosičem. Uplatňují se nízkoenergetické síly jako jsou Van der Waalsovy síly, iontové interakce, vodíkové vazby a hydrofobní interakce.

#### ***Použité roztoky:***

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

#### ***Postup:***

Vzorky připravených částic CS:TPP, CS:TPP/HA, CS:TPP/SiO<sub>2</sub> v celkovém množství 2 mg v roztoku, provedené v tripletu, byly pro odstranění a separování částic od roztoku 4x promyty 1 ml fosfátového pufru a vždy po promytí centrifugovány 5 minut při  $1,7 \cdot 10^3$  RCF a poté byl odtážen supernatant. Pro vazbu bylo k částicím přidáno 500  $\mu$ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 a 500  $\mu$ l roztoku ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml (výsledná koncentrace 0,5 mg/ml). Reakční směs byla inkubována za mírného otáčení na rotátoru 2 hodiny při laboratorní teplotě. Pro stanovení koncentrace sorbovaného proteinu na částicích byly uchovány supernatanty ze vzorků po vazbě.

### 3.10 Stanovení koncentrace ovalbuminu pomocí bicinchoninového testu

Bicinchoninová (BCA) metoda MicroBCA™ využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové ke stanovení koncentrace proteinů spektrofotometrickou metodou. Patří mezi kolorimetrické metody a principem tohoto testu je tvorba fialově zbarveného komplexu kyseliny bicinchoninové s měďnými ionty  $\text{Cu}^+$ , které vznikly redukcí  $\text{Cu}^{2+}$  iontů na  $\text{Cu}^+$  ionty po reakci s redukčním činidlem. Standardem pro kalibraci byl zvolen ovalbumin o koncentraci 2 mg/ml, jehož koncentrační řada byla připravena podle Tabulky 1. Intenzita vzniklého fialovomodrého zbarvení se měří při 570 nm.

#### *Použité roztoky:*

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- roztoky A, B a C součástí soupravy MicroBCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Rockfor, IL, USA)
  - Roztok A: uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, vinan sodný v 0,2 M NaOH
  - Roztok B: 4% 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina (BCA) v destilované vodě
  - Roztok C: 4% pentahydrát síranu měďnatého v destilované vodě
- zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

#### *Postup:*

Nejdříve byla připravena kalibrační řada o koncentracích ovalbuminu 0 až 200  $\mu\text{g/ml}$  dle tabulky 1. Ředícím roztokem je 0,1 M fosfátový pufr a zásobní roztok proteinu měl koncentraci 2 mg/ml. Poté byl připraven pracovní roztok BCA dle pokynů výrobce. Roztoky A, B a C byly smíchány v objemovém poměru 25:24:1), jehož množství se připravuje podle počtu vzorků, které budou měřeny, a to dle následujícího výpočtu: (9 standardů + počet neznámých vzorků) x 3 opakování x 150  $\mu\text{l}$ .

Pro vyhodnocení sorpce proteinu na částicích byla stanovena koncentrace proteinu na připravených vzorcích částic dle kapitoly 3.11, v supernatantech po vazbě a v zásobním roztoku proteinu proti slepým vzorkům. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno po 150  $\mu\text{l}$  standardu (pro kalibrační řadu) nebo supernatantu a ke každému přidáno 150  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku. Vzorky částic byly ponechány v mikrozkuvkách a bylo k nim přidáno 150  $\mu\text{l}$  0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 a 150  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku. Poté byla

provedena inkubace částic a mikrotitrační destičky se vzorky při 37 °C po dobu 2 hodin. Vzorky částic byly po celou dobu inkubovány za mírného otáčení na rotátoru. Po inkubaci byly částice zcentrifugovány (5 minut/ $1,7 \cdot 10^3$  RCF), supernatant byl přenesen do mikrotitrační destičky a všechny vzorky byly proměřeny na spektrofotometru Multiscan při 570 nm během 10 minut. Z absorbancí kalibrační řady byla sestrojena kalibrační křivka a koncentrace proteinu v neznámých vzorcích a na částicích byla vypočítána pomocí regresní rovnice kalibrační křivky.

**Tabulka 1:** Hodnoty kalibrační řady pro metodu BCA.

zkumavka	Objem 0,1 M fosfátového pufru [ $\mu$ l]	Objem ovalbuminu [ $\mu$ l]	Výsledná koncentrace ovalbuminu [ $\mu$ g/ml]
A	900	100	200
B	925	75	150
C	950	50	100
D	980	20	40
E	990	10	20
F	995	5	10
G	998	2,5	5
H	999	1,25	2,5
I	1000	0	0 = blank

### 3.11 Vyhodnocení účinnosti adsorpce ovalbuminu na částice a vazebné kapacity částic

**Postup:**

U připravených vzorků částic s ovalbuminem byla vypočítána účinnost adsorpce a vazebná kapacita nosiče podle [94]. Tyto parametry byly kvantifikovány nepřímým způsobem ze stanovení proteinu ze supernatantů částic metodou BCA. Supernatant bez částic byl použit jako slepý vzorek, aby se zamezilo interferenci. Účinnost adsorpce vyjadřuje procento hmotnosti proteinu zachyceného v polymerním nosiči ve vztahu k počátečnímu množství vloženého proteinu (Rovnice 1). Kapacita nosiče udává hmotnost proteinu, který je zachycen na částicích vztažený k hmotnosti částic v suchém stavu (Rovnice 2).



$$\text{Účinnost adsorpce [\%]} = \frac{\text{celkový vložený protein } [\mu\text{g/ml}] - \text{nenavázaný protein po vazbě } [\mu\text{g/ml}]}{\text{celkový vložený protein } [\mu\text{g/ml}]} \cdot 100$$

**Rovnice 1:** Výpočet účinnosti adsorpce v procentech.

$$\text{Vazebná kapacita nosiče } [\mu\text{g/mg}] = \frac{\text{celkový vložený protein } [\mu\text{g/ml}] - \text{nenavázaný protein po vazbě } [\mu\text{g/ml}]}{\text{hmotnost částic v suchém stavu } [\text{mg}]}$$

**Rovnice 2:** Výpočet vazebné kapacity nosiče vztažené k hmotnosti částic v suchém stavu.

### 3.12 Kinetika uvolňování ovalbuminu z chitosanových částic

Metoda měření kinetiky uvolňování proteinu z částic byla převzata podle [95].

#### *Pracovní roztoky:*

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

#### *Postup:*

Na chitosanové částice, připravené dle kapitoly 3.3 byla provedena sorpce ovalbuminu 0,5 mg v 1 ml 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3. U částic byla sledována míra a kinetika uvolnění proteinu do 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 při teplotě 37 °C. 2 mg částic v tripletu bylo resuspendováno v 5 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 vytemperovaného na 37 °C. V případě lyofilizace částic byl 1 mg částic resuspendován v polovičním objemu 2,5 ml fosfátového pufru. Tento roztok byl skladován za intenzivního otáčení v 37 °C po celou dobu experimentu. V pravidelných časových intervalech (15 minut až 24 hodin) byly odebírány alikvoty po 0,3 ml a tento objem byl nahrazen 0,3 ml temperovaného pufru. Alikvoty byly centrifugovány 5 minut při  $1,7 \cdot 10^3$  RCF a poté bylo odebráno 150  $\mu\text{l}$  supernatantu, pro stanovení koncentrace proteinu. Po ukončení uvolňování bylo změřeno množství uvolněného ovalbuminu ve frakcích, ve vazebném roztoku před vazbou ovalbuminu na částice a v roztoku po vazbě ovalbuminu na částice. Koncentrace byly stanoveny metodou BCA uvedené v kapitole 3.10. Výpočet množství uvolněného ovalbuminu byl proveden podle následující Rovnice 3 [95].

$$\text{uvolněný OVA [\%]} = \frac{\mu\text{g uvolněného ovalbuminu}}{\mu\text{g sorbovaného ovalbuminu}} \cdot 100$$

**Rovnice 3:** Výpočet množství uvolněného ovalbuminu v procentech.

Pro vyhodnocení uvolňování ovalbuminu z částic byla použita metoda kumulativní křivky podle [95], která vyjadřuje koncentraci uvolněného ovalbuminu v odebraných frakcích vztaženou k původní koncentraci ovalbuminu na částicích v čase. Množství uvolněného ovalbuminu z částic bylo sledováno v tripletu vzorků, byly vypočítané průměrné hodnoty a směrodatná odchylka. Kumulativní princip vyhodnocení uvolňování proteinu z částic spočívá v postupném sčítání uvolněného proteinu v čase. Výsledkem je kumulativní graf závislosti množství uvolněného proteinu v průběhu celého experimentu.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentů bylo připravit a následně charakterizovat biokompatibilní částicové nosiče, které budou mít vhodné vlastnosti pro využití v oblasti cíleného doručování proteinů a léčiv. Ideální nosič vytváří homogenní a monodisperzní roztok částic, a se stabilitou částic bez tvorby agregátů. Dále bude mít vysokou účinnost sorpce a s pomalým uvolňováním proteinů či léčiv. Všechny tyto vlastnosti by měly zůstat stabilní i po lyofilizaci nosiče, která slouží k zachování fyzikálně-chemických vlastností biomateriálů [87]. Cílem této práce bylo mimo jiné vytvořit kompozit z částic z chitosanu a SiO<sub>2</sub>.

Pro přípravu částic byl zvolen chitosan a kyselina hyaluronová. Částice byly připraveny metodou ionotropního gelování chitosanu s tripolyfosfátem, který byl použit jako zesilovací činidlo. Metoda probíhá na principu elektrostatických interakcí mezi kladně nabitými aminoskupinami chitosanu (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, pK<sub>a</sub> acetylovaných skupin je 6,5) a záporně nabitými anionty tripolyfosfátu (O<sup>-</sup>, pK<sub>a</sub> se pohybuje v rozmezí 7,1 až 7,4 v závislosti na pH roztoku). V případě obalení částic do kyseliny hyaluronové se mění kladně nabitý povrch částic chitosanu na negativní. Díky záporně nabitému povrchu částic může v *in vivo* systémech docházet k interakcím s pozitivně nabitým povrchem buněk, jako jsou například karcinomy [53].

Poměr chitosanu a TPP 5:1 byl zvolen podle [97]. U připravených částic bude sledována průměrná hydrodynamická velikost částic, polydisperzní index a zeta potenciál pro určení stability nosiče. Připravené částice budou lyofilizovány z roztoku, s cílem sledování změn vlastností. Dalším krokem bude provedení sorpce modelového proteinu a sledována míra účinnosti adsorpce proteinu. U částic bude sledována kinetika uvolňování proteinu z nosiče do pufru, který simuluje *in vivo* prostředí.

Porovnáním výsledků částic chitosanu a kyseliny hyaluronové bude vybrán nejvhodnější nosič, se kterými se vytvoří kompozit s mikrovlákný oxidu křemičitého. U kompozitu budou hodnoceny stejné parametry. Zavedení mikrovláken oxidu křemičitého by mělo zvýšit stabilitu částic a tepelnou a chemickou odolnost.

## 4.1 Příprava a charakterizace chitosanových částic

Pro přípravu chitosanových částic byl použit chitosan od společnosti Primex o molekulové hmotnosti 110–360 kDa a vysokým stupněm deacetylace (> 95 %). Chitosanové částice s tripolyfosfátem byly připraveny podle kapitoly 3.3.

### *Optimalizace objemových poměrů chitosanu a tripolyfosfátu*

Z předchozích experimentů vyplynulo, že je charakter připravených částic závislý mimo jiné na celkovém objemu použitých roztoků CS a TPP. Z tohoto důvodu jsme porovnali přípravu s odlišným celkovým objemem chitosanu a TPP a se zachovaným poměrem 5 : 1. Celkový objem byl 36 ml. U částic byla změřena hydrodynamická velikost částic, polydisperzní index a zeta potenciál. Všechny naměřené parametry jsou shrnuty v tab. 2.

**Tabulka 2:** Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu CS:TPP částic v objemových poměrech 5:1; 7,5:1,5; 10:2; 15:3 (počet opakování 3).

<b>Celkový objem (ml), v/v poměr CS:TPP</b>	<b>6 5 : 1</b>	<b>9 7,5 : 1,5</b>	<b>12 10 : 2</b>	<b>18 15 : 3</b>
<b>DLS</b>	141,33 ± 6,63	122,57 ± 18,4	199,63 ± 14,03	256,6 ± 186,5
<b>PDI</b>	0,42 ± 0,07	0,53 ± 0,15	0,54 ± 0,08	1,02 ± 1,06
<b>Zeta potenciál [mV]</b>	20,17 ± 17,53	32,8 ± 5,8	1,63 ± 5,23	0,2 ± 0,1

Z výsledků analýz bylo zjištěno, že celkový objem velmi ovlivní všechny parametry částic, jak DLS, PDI, tak i zeta potenciál.

Hodnoty DLS se od poměru 10 : 2 zvětšují se zvyšujícím se připraveným objemem. Zároveň se zvyšuje i směrodatná odchylka, která zřejmě indikuje vznik agregátů částic během přípravy, a tedy i distribuci částic různých velikostí. Hodnota PDI je u objemu 6; 9 a 12 ml obdobná. U objemu 18 ml se PDI zvýšilo na hodnotu 1,02 ± 1,06. To potvrzuje úvahu o vzniku agregátů částic během přípravy. Naopak hodnota zeta potenciálu částic se snižuje se zvyšujícím se celkovým objemem. To svědčí o snižování koloidální stability částic.

Hodnoty velikosti a indexu polydisperzity částic byly až do celkového objemu 12 ml přijatelné, s limitem PDI do 0,6 ale hodnota zeta potenciálu je stále nízká. Proto také nejsou vhodnou volbou pro nosičové systémy. Stupeň nerovnoměrné distribuce velikostí částic,

tedy polydisperzity, popisuje hodnota PDI. Pro částicové systémy, založené na polysacharidech, se obvykle považuje hodnota PDI do přibližně 0,6 za maximální mezní hodnotu disperze.

Průměrná hodnota zeta potenciálu u nejvyššího celkového objemu byla téměř nulová, což znamená, že částice mají malý náboj a jsou náchylné k agregaci. To se také potvrdilo se zmíněnou velikostí částic. Agregace může ovlivnit fyzikální vlastnosti nosičového systému, může vést ke ztrátě stability a snížení účinnosti nosiče. Agregáty mohou také blokovat nebo snížit dostupnost aktivních míst pro interakci s cílovými molekulami.

Ze všech uvedených důvodů byl pro přípravu částic CS:TPP používán postup s objemem nejvýše 9 ml.

### ***Dialýza chitosanových částic***

V dalším kroku byl sledován vliv dialýzy částic na vlastnosti částic do 0,1 M acetátového pufru (pH 5). Dialýza připravených částic se provádí za účelem odstranění volných nebo malých molekul, viz tab. 3. Tento krok předcházela obalení chitosanových částic kyselinou hyaluronovou. Z tohoto důvodu byla dialýza provedena do acetátového pufru. Pokud by nenásledoval tento krok, tak by dialýza probíhala do destilované vody.

**Tabulka 3:** Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu CS:TPP částic po přípravě a po dialýze (počet opakování 3).

	<b>CS:TPP částice po přípravě</b>	<b>CS:TPP částice po dialýze</b>
<b>DLS [nm]</b>	141,33 ± 6,63	106,9 ± 26
<b>PDI</b>	0,42 ± 0,07	0,58 ± 0,37
<b>Zeta potenciál [mV]</b>	21,83 ± 10,54	12,07 ± 9,66

Hodnoty průměrné hydrodynamické velikosti po dialýze do 0,1 M acetátového pufru (pH 5) vykazují zmenšení částic, jak je vidět v tab. 3. Hodnoty polydisperzního indexu se zvětšily. Možným důvodem je ztráta větších iontů, která vede ke změně povrchového náboje částic a narušení jejich stability.

Hodnota zeta potenciálu po dialýze se snížila na 12,07 ± 9,66 mV a také ukazuje na snížení koloidální stability částic.

## 4.2 Příprava a charakterizace chitosanových částic s kyselinou hyaluronovou

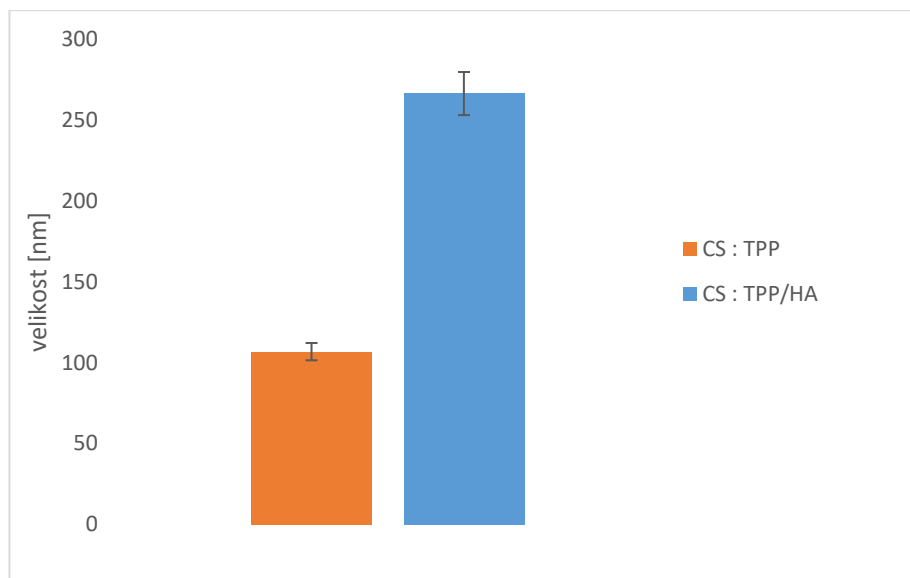
V dalším kroku byly připraveny CS:TPPP částice podle optimalizované metody přípravy, obalené do HA.

CS:TPP/HA částice byly vytvořeny v prvním kroku podle optimalizovaného postupu viz kapitola 3.4, a podle metody 3.6 byla provedena dialýza do acetátového pufru. Částice byly obaleny HA (Contipro) s molekulovou hmotností 150–350 kDa.

**Tabulka 4:** Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu CS:TPP/HA částic po přípravě a po dialýze (počet opakování 3).

	<b>CS:TPP/HA částice po přípravě</b>	<b>CS:TPP/HA částice po dialýze</b>
<b>DLS [nm]</b>	277,61 ± 5,41	266,55 ± 9,6
<b>PDI</b>	0,42 ± 0,1	0,22 ± 0,06
<b>Zeta potenciál [mV]</b>	-30,63 ± 5,43	-32,85 ± 4,95

U chitosanových částic s kyselinou hyaluronovou byl před dialýzou proměřen jejich DLS, PDI a zeta potenciál. Výsledky v tab. 4 potvrdily, že po obalení chitosanových částic kyselinou hyaluronovou se změnil pozitivně nabitý povrch částic na negativně nabitý. Velikost částic se po dialýze zmenšila. Hodnota polydisperzního indexu se po dialýze také snížila z  $0,42 \pm 0,1$  na  $0,22 \pm 0,06$ , což naznačuje více homogenní rozložení velikosti částic v roztoku, a je žádoucí pro nosičové systémy. Změny zeta potenciálu jsou zanedbatelné a také naznačují stabilitu částic.



**Graf 1:** Velikost částic CS:TPP a CS:TPP/HA po dialýze v 0,1 M acetátovém pufru pH 5 (počet opakování 3).

Částice s navázanou HA vykazovaly zvětšení velikosti (Graf 1) oproti samotným chitosanovým částicím. Menší velikost samotných CS:TPP částic může souviset s dialýzou do acetátového pufru.

### 4.3 Vliv lyofilizace na fyzikálně-chemické charakteristiky částic

Důvodů k lyofilizaci částic z chitosanu bylo několik. Jedním z nich bylo zachovat charakteristiky částic po dlouhou dobu skladování, dalším důvodem byla SEM analýza, která vyžadovala suchý vzorek částic.

Lyofilizace spočívá v odpařování vody z materiálu při nízké teplotě a tlaku a má významný vliv na fyzikálně-chemické charakteristiky částic. Lyofilizace částic se provádí především z důvodu jejich stabilizace a prodloužení jejich skladovatelnosti. Díky lyofilizaci se také snižuje riziko bakteriálního a enzymatického rozkladu částic, což je velmi důležité především v případě biologických materiálů.

Během lyofilizace mohou částice čelit různým fyzikálním a chemickým změnám, které mohou mít vliv na jejich vlastnosti. V první řadě se během lyofilizace částice vysušují, což může vést ke změně jejich velikosti a tvaru. Částice mohou ztratit svou původní hydrataci a shlukovat se do větších agregátů [89].

Použitím kryoprotektantu (např. trehalózy, manitolu aj. [89]) se snižuje riziko poškození částic. Trehalóza vytváří ochrannou vrstvu kolem částic, která pomáhá udržet jejich stabilitu během lyofilizace a dalšího uchovávání. Podmínky použití trehalózy byly převzaty podle [26].

Nejprve byly připraveny vzorky chitosanových částic (kapitola 3.3) a částic s kyselinou hyaluronovou (kapitola 3.4) a podle kapitoly 3.7 byla k takto připraveným vzorkům přidána trehalóza, s výslednou koncentrací 5 % jako kryoprotektant pro následnou lyofilizaci na Katedře analytické chemie ve spolupráci s panem doc. Ing. Liborem Červenkou, Ph.D. Po lyofilizaci byly částice rozpuštěny v deionizované vodě a byly hodnoceny změny v hydrodynamické velikosti, polydisperzní index a zeta potenciál. Tyto hodnoty byly porovnány s hodnotami před lyofilizací. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 5.

**Tabulka 5:** Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu CS:TPP částic čerstvých a po lyofilizaci (počet opakování 3).

	<b>CS:TPP částice čerstvé</b>	<b>CS:TPP částice po lyofilizaci</b>
<b>DLS [nm]</b>	199,63 ± 14,03	208,33 ± 20,17
<b>PDI</b>	0,54 ± 0,08	0,57 ± 0,09
<b>Zeta potenciál [mV]</b>	30,47 ± 6,37	24,03 ± 1,01

Z výsledků v tab. 5 lze zhodnotit, že DLS velikost a PDI částic po lyofilizaci se téměř nezměnily. Hodnoty polydisperzního indexu jsou v obou případech kolem hranice hodnoty 0,6. Hodnoty zeta potenciálu po lyofilizaci ukazují na mírné snížení stability částic.

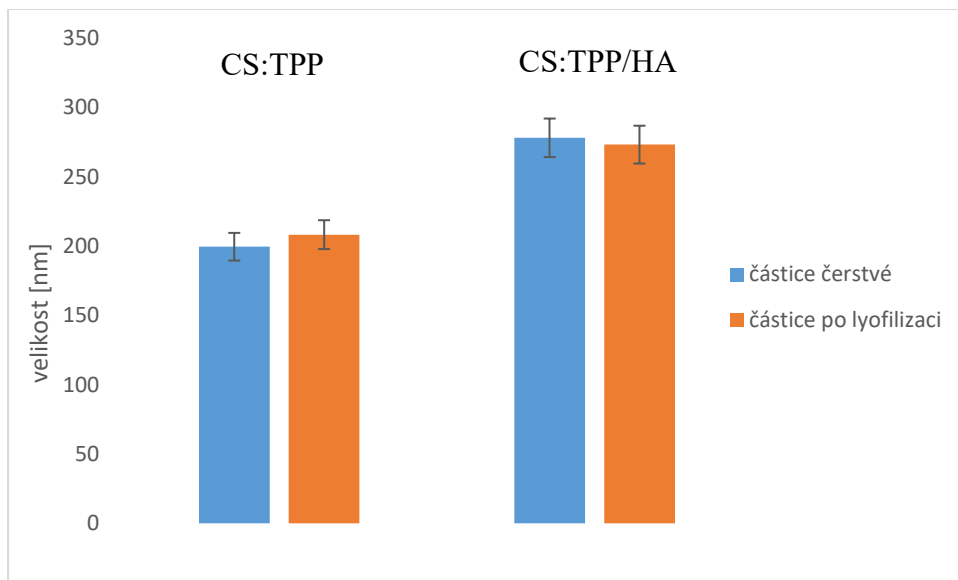
**Tabulka 6:** Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu CS:TPP/HA částic čerstvých a po lyofilizaci (počet opakování 3).

	<b>CS:TPP/HA částice čerstvé</b>	<b>CS:TPP/HA částice po lyofilizaci</b>
<b>DLS [nm]</b>	278,23 ± 5,57	273,3 ± 4,93
<b>PDI</b>	0,38 ± 0,07	0,38 ± 0,05
<b>Zeta potenciál [mV]</b>	-26,17 ± 4,77	-22,83 ± 5,87

Stejně parametry byly hodnoceny také u chitosanových částic obalených kyselinou hyaluronovou. Výsledné hodnoty jsou uvedené v tab. 6. Zde se průměrná velikost částic před lyofilizací a po lyofilizaci lišila jen nepatrně. Hodnoty polydisperzního indexu potvrzují, že velikost částic po lyofilizaci je nezměněná. Lze tedy usuzovat, že částice jsou stabilní v obou případech. To potvrzuje i zeta potenciál, částice mají záporný náboj a jsou v roztoku



stabilní. Po lyofilizaci se hodnota zeta potenciálu mírně zvýšila, ale může být indikací dobré stability částic v disperzi.

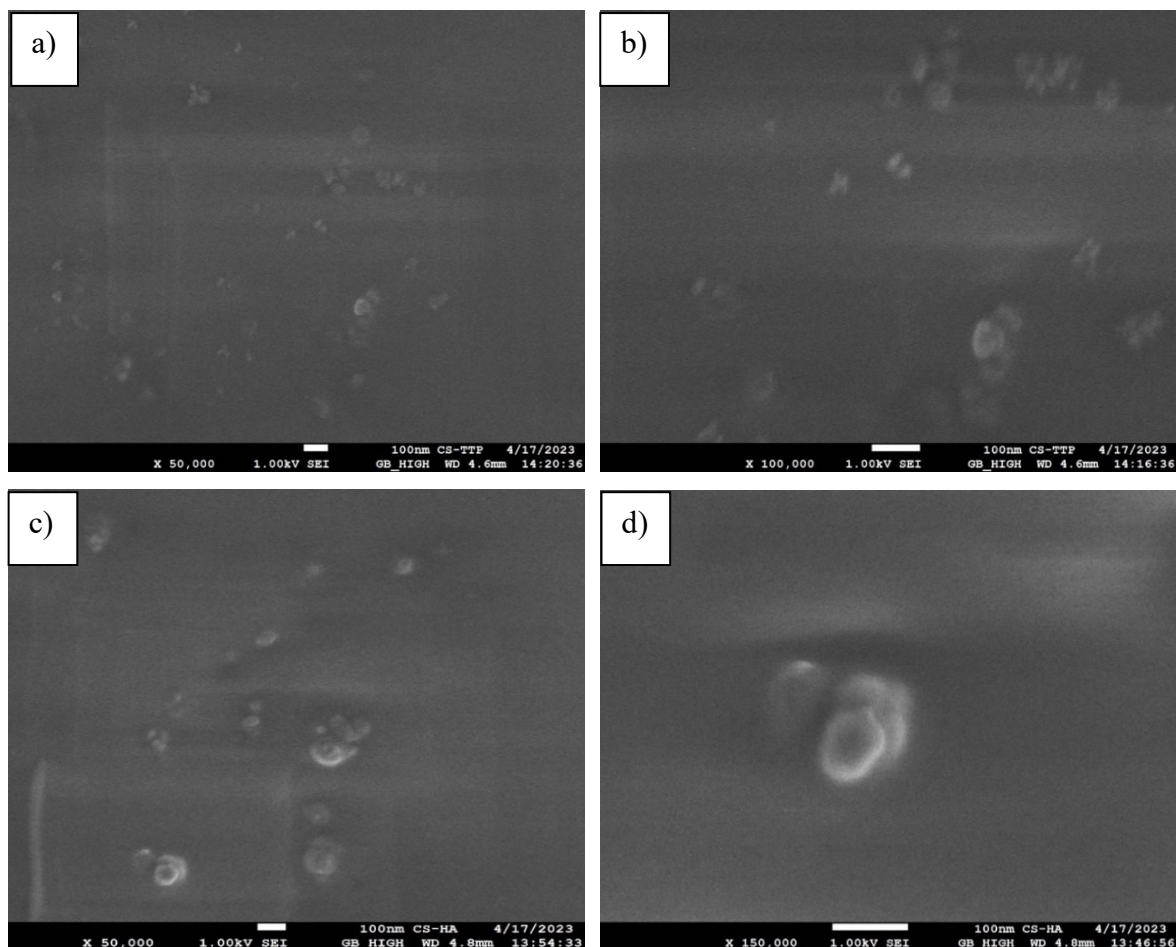


**Graf 2:** Vliv lyofilizace na CS:TPP a CS:TPP/HA (počet opakování 3).

V Grafu 2 jsou porovnány velikosti čerstvě připravených částic CS:TPP a CS:TPP/HA. V obou případech se velikost po lyofilizaci mírně zvětšila, ovšem nepatrně. Po lyofilizaci jsou tedy částice stabilní, což dokazuje také hodnota PDI pod 0,6.

#### 4.3.1 Hodnocení připravených částic metodou SEM

Lyofilizace částic CS:TPP a CS:TPP/HA umožnila analýzu metodou SEM. Analýza rastrovací elektronovou mikroskopií umožňuje dalším způsobem sledovat tvar a velikosti částic. Vzorky částic CS:TPP a CS:TPP/HA byly připraveny a lyofilizovány podle metody v kapitole 3.7. SEM analýzu provedl pan Ing. Hromádka na pracovišti CEMNAT. SEM fotografie byla získána pomocí procházejících elektronů s různým zvětšením a rozlišením.



**Obrázek 7:** Skenovací elektronové mikrofotografie částic a, b) CS:TPP; c, d) CS:TPP/HA.

Z Obr. 7 jsou patrné jednotlivé částice, koncentrace částic před lyofilizací byla 250  $\mu\text{g}$  v 1 ml deionizované vody. Velikost CS:TPP částic je na SEM snímkách menší (v rozmezí 22–66 nm) v porovnání s hydrodynamickou velikostí měřenou pomocí DLS ( $159,1 \pm 6,30$  nm). Tento rozdíl, může být způsobený tím, že DLS měří hydrodynamický průměr částic v roztoku, tj. včetně hydratačního obalu, zatímco SEM měří velikosti suchých částic. Jednalo se o pilotní měření velikosti jednotlivých detekovaných částic.

Velikost částic s HA se v porovnání se samotnými částicemi zvětšila na velikost v rozmezí 50-100 nm. V porovnání s hydrodynamickou velikostí měřenou pomocí DLS ( $270,8 \pm 9$  nm) je velikost analyzovaná pomocí SEM mnohem menší. Ve srovnání s DLS (kde je hydratační obal), jsou bez hydratačního obalu. Opět se jednalo o pilotní studii velikostí.

#### 4.4 Adsorpce ovalbuminu na částice a vlákna

Dalším experimentem pro charakterizaci připravených částic a výběr vhodných částic pro kompozit s SiO<sub>2</sub> bylo sledování míry adsorpce modelového vysokomolekulárního proteinu ovalbuminu (OVA) na částice a vlákna. Izoelektrický bod (pI) ovalbuminu se pohybuje v rozmezí 4,5 – 4,9. Molekulová hmotnost OVA je 42,881 Da.

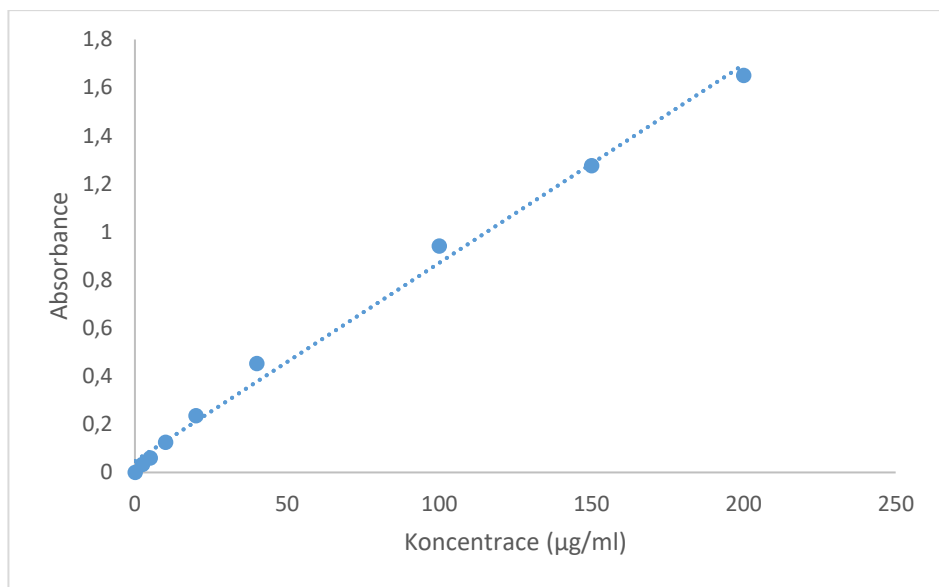
Adsorpce proteinu na částice je proces, při kterém se protein v závislosti na hodnotě svého pI váže na povrch částic a dochází zde k vytvoření proteinové vrstvy. Adsorpce spočívá v přitažlivých interakcích mezi povrchem adsorbentu a adsorbovanými molekulami. Tyto interakce jsou obvykle slabé a jsou ovlivněny vlastnostmi adsorbentu a adsorbovaných molekul, jako jsou polarita, velikost, tvar, pH a iontová síla. Většina proteinů obsahuje hydrofobní a hydrofilní oblasti, které se mohou vázat na různé typy povrchů částic. V případě chitosanových částic jsou uplatněny kladné náboje aminoskupin na povrchu částic, které adsorbují záporně nabitě karboxylové skupiny ovalbuminu.

Účinnost adsorpce ovalbuminu na částice může být zvýšena vhodným výběrem pH roztoku, jehož hodnoty jsou odlišné od izoelektrického bodu ovalbuminu. Náboj OVA je v takovém pH nejnižší a interakce s nábojem částic jsou silnější.

##### *Optimalizace koncentrace ovalbuminu v sorpci*

Cílem experimentu bylo vybrat nejvhodnější koncentraci ovalbuminu, který se bude vázat na částice s nejvyšší účinností. Dále také porovnat jednotlivé adsorbenty pro vazbu OVA a jejich účinnost vazby. Jako adsorbenty jsem zvolila částice CS:TPP (5:1), CS:TPP/HA a SiO<sub>2</sub> mikrovlákna. Slepými vzorky pro částice anebo mikrovlákna s navázaným proteinem byly použity částice anebo vlákna bez proteinu v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3.

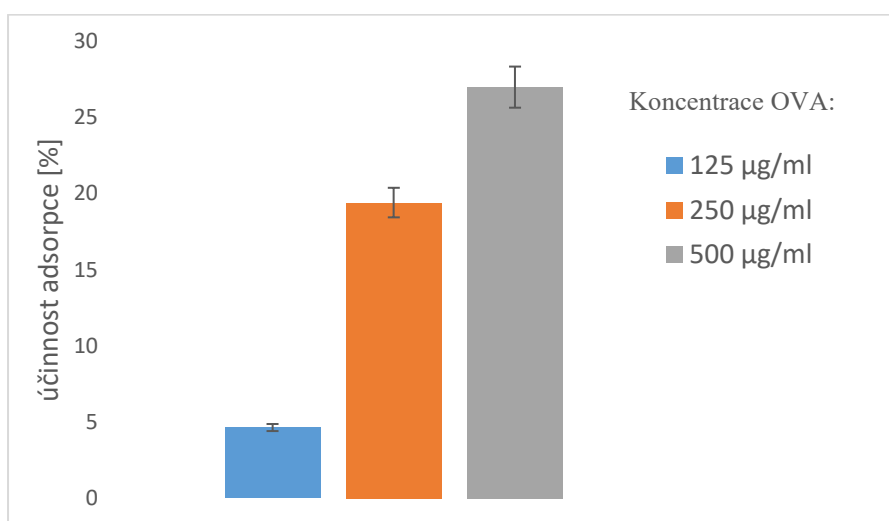
Adsorpce ovalbuminu probíhala na 2 mg částic/vláken po dobu 2 hodin za laboratorní teploty při mírném otáčení, podle kapitoly 3.9. Koncentrace OVA v roztocích byla stanovena metodou BCA podle kapitoly 3.10 podle postupu převzatého z kitu MicroBCA™. Pro odečet přesné koncentrace ovalbuminu byla připravena kalibrační křivka (Graf 3), s rovnicí regrese  $y = 0,0082x + 0,0473$  a hodnotou spolehlivosti  $R^2 = 0,9942$ .



**Graf 3:** Kalibrační křivka ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA při vlnové délce 570 nm (počet opakování 3).

Nejprve byla provedena optimalizace koncentrace ovalbuminu pro sorpci na CS:TPP částice, s koncentracemi OVA 125, 250 a 500 µg/ml. Po provedení sorpce pro všechny koncentrace a stanovení ovalbuminu byla vypočtena účinnost adsorpce a adsorpční kapacita.

Nepřímé hodnocení účinnosti adsorpce bylo vypočtené dle Rovnice 1 v kapitole 3.11. Účinnost adsorpce vyjadřuje poměr mezi množstvím adsorbované látky a počátečním množstvím látky v roztoku, vyjádřený v procentech. Kapacita nosiče byla vypočtena podle Rovnice 2 z kapitoly 3.11 a udává hmotnost proteinu, který je zachycen na částicích vztahený k hmotnosti částic v suchém stavu.



**Graf 4:** Účinnost adsorpce OVA hodnocená nepřímou detekcí metodou BCA s koncentracemi OVA 125, 250 a 500 µg na 2 mg CS:TPP částic (počet opakování 3).

V Grafu 4 jsou porovnány účinnosti adsorpce OVA při různých koncentracích na 2 mg CS:TPP částic. Účinnost adsorpce pro koncentraci OVA 125 µg/ml měla nejnižší hodnotu a to pouhých 4,64 %. O něco vyšší účinnost měla koncentrace OVA 250 µg/ml, a to 19,39 %. Nejvyšší hodnoty (26,96 %) dosáhla koncentrace OVA 500 µg/ml.

**Tabulka 7:** Vazebná kapacita nosiče (CS:TPP) vztažená na 2 mg částic hodnocená metodou BCA pro koncentrace 125, 250 a 500 µg/ml (počet opakování 3).

Koncentrace vázaného OVA	Vazebná kapacita CS:TPP [ µg/2 mg]
125 µg/ml	6,3
250 µg/ml	21,4
500 µg/ml	64,7

V tab. 7 jsou uvedeny hodnoty vazebné kapacity nosiče, v tomto případě CS:TPP částic, pro koncentrace 125, 250 a 500 µg/ml. Z výsledků je zřejmé, že nejvyšší vazebná kapacita je u koncentrace OVA 500 µg/ml.

Pro další experimenty i s ostatními materiály byla použita koncentrace 500 µg/ml ovalbuminu na 2 mg částic.

Ve výsledcích diplomové práce Alexandry Bolkové [97], je uvedeno, že účinnost sorpce byla přibližně 42,15 % z celkového množství vloženého proteinu. Podobný experiment probíhal za odlišných podmínek a výsledky obou experimentů se výrazně liší. V experimentu z diplomové práce [97] byl použit poměr CS:TPP – 2:1 a hmotnost částic, na kterých probíhala vazba, byla 4 mg. Dále se lišila DLS velikost částic, která se pohybovala v hodnotách  $255 \pm 6,27$  nm.

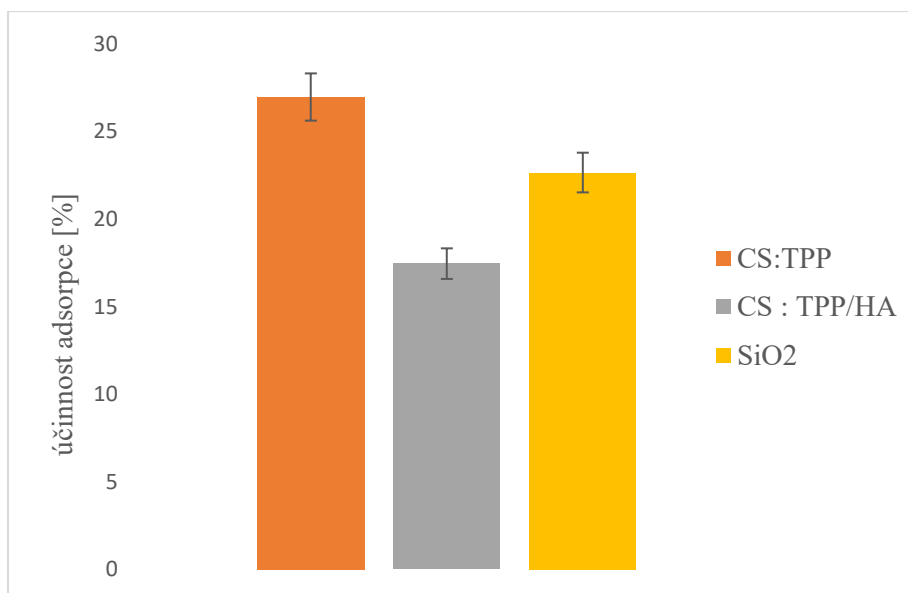
## ***Porovnání účinnosti adsorpce ovalbuminu na částice s kyselinou hyaluronovou a mikrovlákna oxidu křemičitého a kapacity nosičů***

V dalším experimentu byly jako adsorbenty použity částice CS:TPP/HA a mikrovlákna SiO<sub>2</sub>. Bylo sorbováno 500 µg ovalbuminu na 2 mg částic.

**Tabulka 8:** Hodnoty účinnosti adsorpce na CS:TPP/HA částice a SiO<sub>2</sub> mikrovlákna hodnocené nepřímou detekcí metodou BCA a výpočet vazebné kapacity nosiče vztažené na 2 mg částic/vláken (počet opakování 3).

	<b>CS:TPP/HA</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>
<b>Účinnost adsorpce – nepřímé hodnocení [%]</b>	17,45	22,65
<b>Vazebná kapacita nosiče [µg/2 mg]</b>	51,8	55,6

Z výpočtu pro nepřímé hodnocení účinnosti adsorpce proteinu vidíme v tab. 8, že částice CS:TPP/HA měly účinnost sorpce 17,45 %, zatímco SiO<sub>2</sub> mikrovlákna měla 22,65 %. Vazebná kapacita nosiče vztažená na 2 mg částic/mikrovláken byla u CS:TPP/HA částic 51,8 µg a u SiO<sub>2</sub> byla 55,6 µg.



**Graf 5:** Účinnost adsorpce OVA hodnocené nepřímou detekcí metodou BCA s koncentrací OVA 500 µg/ml u CS:TPP, CS:TPP/HA a SiO<sub>2</sub> (počet opakování 3).

V Grafu 5 jsou porovnány účinnosti sorpce ovalbuminu o koncentraci 500 µg/ml na jednotlivé adsorbenty. Nejvyšší účinnost sorpce OVA měly samotné chitosanové částice

(CS:TPP), a to 26,96 %. Pro další práci s tvorbou kompozitu s SiO<sub>2</sub> mikrovlákny vychází jako nejvhodnější nosič CS:TPP částice.

#### **4.5 Hodnocení vytvořeného kompozitu s chitosanovými částicemi a mikrovlákny oxidu křemičitého**

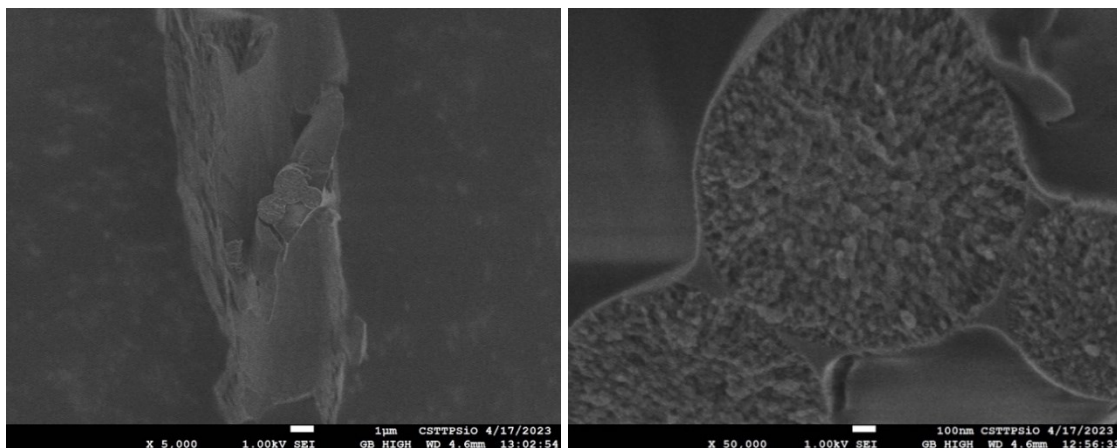
SiO<sub>2</sub> materiály se používají jako pomocný materiál v kompozitech. Kombinace SiO<sub>2</sub> mikrovláken s částicemi chitosanu může vést ke zlepšení mechanických vlastností, biokompatibility a stability nosičového systému.

##### ***Stanovení zeta potenciálu u kompozitu***

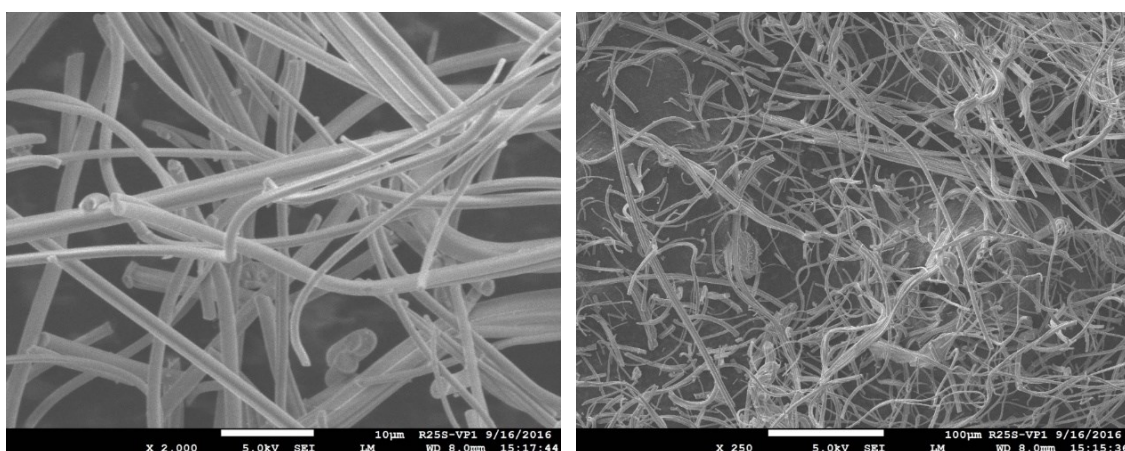
U kompozitu CS:TPP a SiO<sub>2</sub> mikrovláken připraveného podle kapitoly 3.5 byl změřen zeta potenciál. Hodnoty zeta potenciálu u samotných mikrovláken měly velmi nestabilní hodnoty. Pohybovaly se v rozmezí od kladných 0,9 mV do záporných -2,9 mV hodnot. Hodnoty zeta potenciálu u kompozitu byly též velice nestabilní, pohybovaly se jak v kladných (nejvyšší hodnota byla +36,3 mV), tak záporných hodnotách (nejnižší hodnota byla -13,7 mV). Kombinace částic s vlákny mohla mít nejspíš vliv na výsledky měření zeta potenciálu. Vlákna mají svůj nestabilní náboj a mohou tak ovlivnit nábojové vlastnosti kladně nabitých chitosanových částic, které jsou s nimi kombinovány. Nejspíš došlo k tvorbě komplexů, kde jsou náboje částic a vláken vykompenzovány, a to může vést k výskytu jak kladných, tak záporných hodnot zeta potenciálu v jednom vzorku.

##### ***Hodnocení kompozitu metodou SEM***

Pomocí SEM metody byla analyzována struktura a velikost SiO<sub>2</sub> vláken v kompozitu s CS částicemi. Výsledky analýzy jsou zobrazeny na Obr. 8.



**Obrázek 8:** Skenovací elektronové mikrofotografie nanočástic chitosanu s mikrovlákný oxidu křemičitého.



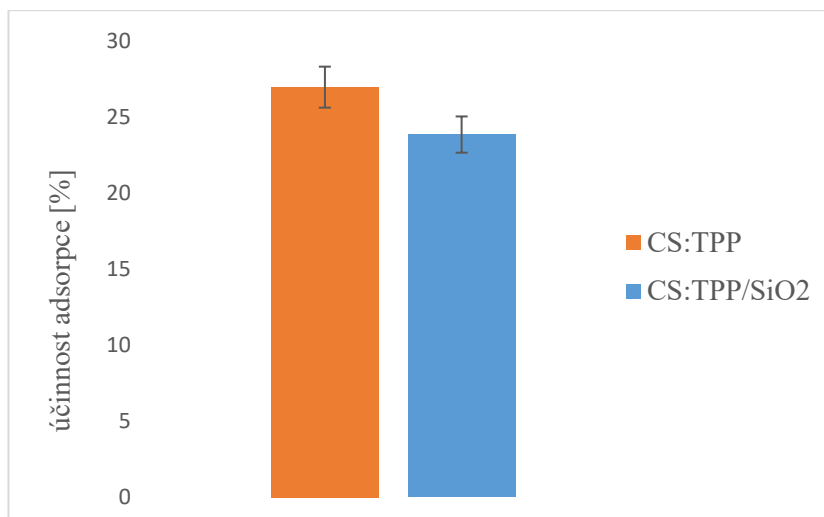
**Obrázek 9:** Skenovací elektronové mikrofotografie samotných mikrovláken oxidu křemičitého. Poskytnuto s laskavým svolením Ing. Hromádka, CEMNAT.

Pro zobrazení vláken bylo použito zvětšení 5 000 – 50 000x. Na Obr. 9 jsou zobrazena původní samotná mikrovlákná. Vlákná jsou relativně tlustá, proto bylo skenováno mimo ně. Na Obr. 8 vlevo je patrné mikrovláknko SiO<sub>2</sub> v matrici s částicemi chitosanu, vpravo na Obr. 8 potom detail chitosanových částic. Částice měly velikost přibližně 100 nm. Struktura částic je v případě kompozitu zachovaná.

### ***Adsorpce ovalbuminu na kompozit***

Dalším experimentem byla sledována míra adsorpce ovalbuminu na kompozit CS:TPP/SiO<sub>2</sub>. Vazba ovalbuminu metodou adsorpce (podle kapitoly 3.9) probíhala na 2 mg kompozitu, a to v poměru 1:1, tedy 1 mg CS:TPP a 1 mg mikrovláken SiO<sub>2</sub>. Adsorpce OVA probíhala po dobu 2 hodin za laboratorní teploty při mírném otáčení. Koncentrace navázaného a nenavázaného OVA na kompozitu byla stanovena metodou BCA podle kapitoly 3.10 na spektrofotometru.





**Graf 6:** Účinnost adsorpce OVA hodnocené nepřímou detekcí metodou BCA s koncentrací OVA 500 µg/ml u CS:TPP a CS:TPP/SiO<sub>2</sub> (počet opakování 3).

Na kompozit CS:TPP/SiO<sub>2</sub> se metodou adsorpce navázalo 23,84 % z celkového vloženého ovalbuminu (znázorněno v Grafu 6). To je v porovnání se 2 mg CS:TPP částic pouze o 3,12 % méně. Lze tedy uvažovat, že se sorbuje téměř stejné množství ovalbuminu a účinnost sorpce se vazbou SiO<sub>2</sub> mikrovláken jen mírně snížila. Vlákna oxidu křemičitého jsou povrchově záporně nabitá, což může adsorpci negativně nabitého ovalbuminu snížit. Dalším důležitým faktorem je, že v kompozitu bylo poloviční množství chitosanových částic, tedy 1 mg CS a 1 mg SiO<sub>2</sub> vláken, na které se mohl sorbovat OVA.

Kapacita nosiče pro CS:TPP částice byla 64,7 µg a CS:TPP/SiO<sub>2</sub> měly 62,6 µg na 2 mg částic.

#### 4.6 Kinetika uvolňování ovalbuminu z částic

Pro sledování kinetiky uvolňování ovalbuminu z částic za určitý časový úsek (15 min až 24 h) byly použity CS:TPP, CS:TPP/HA částice a kompozit CS:TPP/SiO<sub>2</sub> s navázaným modelovým proteinem ovalbuminem o koncentraci 500 µg v 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 podle kapitoly 3.9. Uvolňování probíhalo do 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,3 při 37 °C při intenzivním míchání.

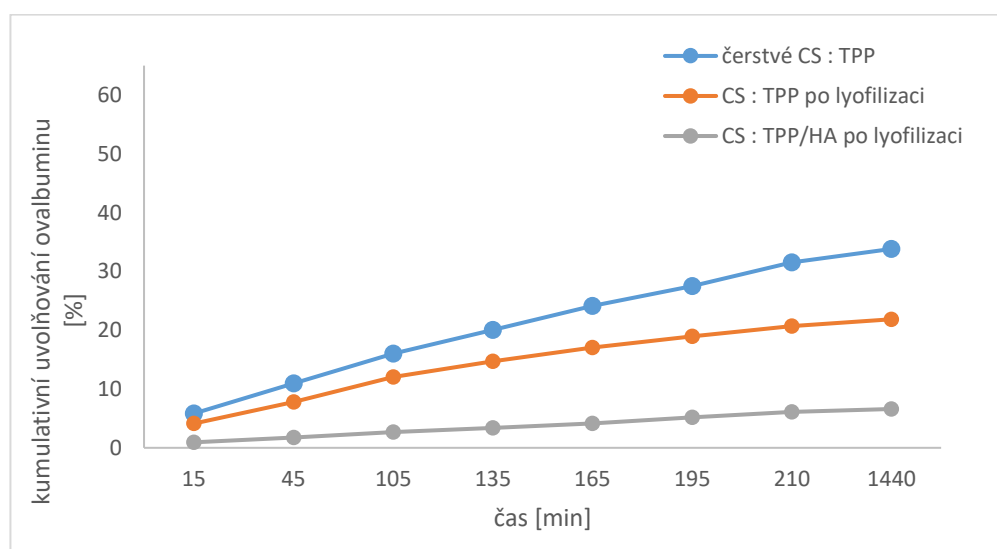
Uvolňování proteinu z částic obecně závisí na několika faktorech, a to jak na vlastnostech adsorbentu (způsob přípravy, velikost a porozita částic), tak i na vlastnostech vázaného proteinu (izoelektrický bod) i na reakčních podmínkách, jako například na iontové síle, pH prostředí či teplotě [98]. Experiment probíhal při 37 °C, která se obecně používá pro *in vitro* studie, a to jako fyziologická teplota lidského těla [96]. Proces lyofilizace může

ovlivnit kinetiku uvolňování proteinu tím, že se mohou změnit některé fyzikálně-chemické vlastnosti částic, především velikost či poréznost. Může také do jisté míry ovlivnit strukturu proteinu. Tyto změny mohou ovlivnit rychlost a rozsah uvolňování proteinu z částic.

Pro vyhodnocení uvolňování ovalbuminu z částic byla použita metoda kumulativní křivky podle [96], která vyjadřuje procentuální hodnoty uvolněného ovalbuminu z chitosanových částic v promývacích frakcích v čase, vztažené ke koncentraci ovalbuminu na částicích. Princip kumulativní křivky spočívá v měření množství uvolněného proteinu v průběhu času a postupném sčítání tohoto množství s množstvím uvolněným v předchozích časových intervalech.

### ***Uvolňování ovalbuminu z chitosanových částic a částic s kyselinou hyaluronovou***

V tomto experimentu byla sledována kinetika uvolňování u CS:TPP a CS:TPP/HA částic. Kumulativní křivka uvolňování OVA z částic je znázorněna v Grafu 7.



**Graf 7:** Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z CS:TPP částic v promývacích frakcích z čerstvě připravených částic a částic po lyofilizaci; uvolňování z CS:TPP/HA po lyofilizaci (počet opakování 3).

Z křivek je patrné, že nejvíce proteinu se uvolnilo z čerstvých CS:TPP částic. Po lyofilizaci těchto částic se uvolnilo o něco méně OVA než z čerstvě připravených částic. Částice s kyselinou hyaluronovou vykazovaly nejnižší míru uvolňování OVA, což souvisí s nízkou kapacitou sorpce OVA na CS:TPP/HA. Počáteční hodnota uvolňování

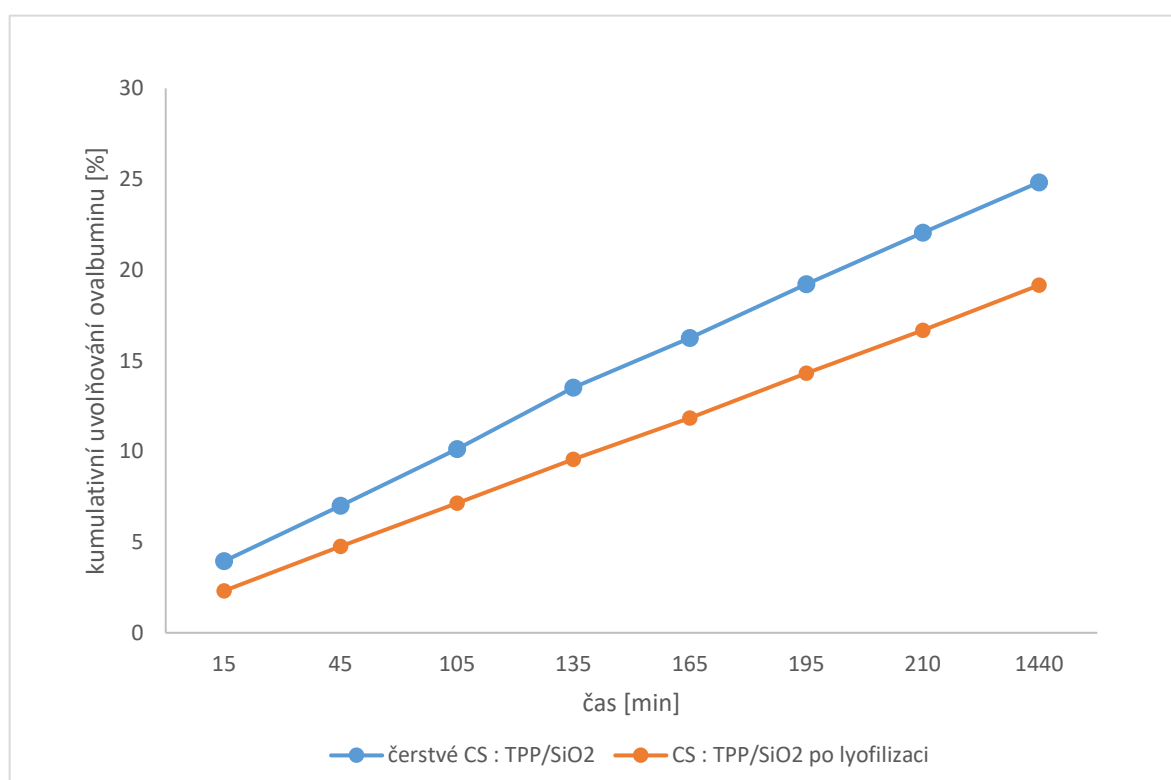
u CS:TPP/HA začínala na hodnotě 0,94 % a nejvyšší hodnota uvolňování dosahovala 6,60 %.

Uvolňování OVA u čerstvých CS:TPP částic začalo na počáteční hodnotě 5,83 %, u částic po lyofilizaci se počáteční hodnota snížila na 4,12 %. V obou případech byla závislost lineární s hodnotou spolehlivosti  $R^2 = 0,9908$  pro čerstvé a  $R^2 = 0,9618$  pro částice po lyofilizaci.

Nejvyšší hodnoty uvolňování byly pozorovány u čerstvých CS:TPP částic, které dosahovaly 33,82 %. U částic po lyofilizaci byla nejvyšší hodnota 21,86 %. U samotných chitosanových částic jsou křivky strmější než u částic s HA. To poukazuje na postupné uvolňování OVA, na rozdíl od CS:TPP/HA, kde se v průběhu času uvolnilo minimum proteinu.

### ***Uvolňování ovalbuminu z kompozitu***

Pro vyhodnocení uvolňování ovalbuminu z kompozitu byla též použita metoda kumulativní křivky podle [96]. Kumulativní křivka uvolňování OVA z kompozitu CS:TPP/SiO<sub>2</sub> je znázorněna v Grafu 8.



**Graf 8:** Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z CS:TPP/SiO<sub>2</sub> v promývacích frakcích z čerstvě připravených částic a částic po lyofilizaci (počet opakování 3).

Uvolňování OVA u čerstvě připraveného CS:TPP/SiO<sub>2</sub> kompozitu začínalo na hodnotě 3,94 %, u kompozitu po lyofilizaci se počáteční hodnota snížila na 2,31 %. V obou případech byla závislost lineární s hodnotou spolehlivosti  $R^2 = 0,9992$  pro čerstvý a  $R^2 = 0,9999$  pro kompozit po lyofilizaci. V porovnání se samotnými CS:TPP částicemi se více OVA uvolnilo ze samotných CS:TPP částic, ovšem musíme uvažovat, že v kompozitu bylo poloviční množství CS částic, tedy 1 mg, na který se mohl vázat protein.

## 5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla optimalizována příprava částic z chitosanu a kyseliny hyaluronové v kombinaci s mikrovlákný oxidu křemičitého. Částice a vlákna byla poté charakterizována. Cílem bylo vytvořit biokompatibilní nosič modelového proteinu ovalbuminu, který by měl přijatelnou velikost, dobrou stabilitu, vysokou účinnost adsorpce a řízené uvolňování proteinu ovalbuminu.

Nejprve byly připraveny chitosanové částice s tripolyfosfátem metodou ionotropního gelovatění. Byla provedena optimalizace přípravy s odlišnými celkovými objemy chitosanu a TPP a se zachovaným poměrem 5:1. Byly připraveny čtyři různé přípravy objemových poměrů chitosanu a TPP. Z důvodu snižování koloidální stability částic při vyšším množství celkového objemu bylo stanoveno, že pro přípravu částic CS:TPP bude používán postup s objemem nejvýše do 9 ml.

Za účelem odstranění volných nebo malých molekul po procesu přípravy byla provedena dialýza částic. Po dialýze došlo ke zmenšení CS částic na velikost  $106,9 \pm 26$  nm. Hodnota zeta potenciálu ( $12,07 \pm 9,66$  mV) poukazovala na nižší stabilitu částic. Možným důvodem mohla být neadekvátní rychlost míchání během procesu dialýzy, která způsobila rozpad větších částic.

Dále byly připraveny chitosanové částice obalené kyselinou hyaluronovou, které dosahovaly velikosti  $266,55 \pm 9,6$  nm a jejich povrchový náboj se změnil z kladného na záporný, a to na hodnotu  $-32,85 \pm 4,95$  mV, která ukazuje na vysokou koloidální stabilitu částic. Hodnota PDI s hodnotou  $0,22 \pm 0,06$  vykazovala více homogenní rozložení velikostí částic v roztoku.

Poté byl zkoumán vliv lyofilizace na fyzikálně-chemické charakteristiky CS:TPP a CS:TPP/HA částic. Byla měřena hydrodynamická velikost, PDI a zeta potenciál. Naměřené hodnoty u obou typů částic se téměř nelišily od hodnot naměřených před lyofilizací.

CS:TPP a CS:TPP/HA částice byly po lyofilizaci analyzované pomocí SEM mikroskopie. Analýza byla pilotní studií. Na fotografiích byly patrné jednotlivé částice, které měly mnohem menší velikost částic v porovnání s hodnotami DLS. Pro další analýzy bych použila vyšší koncentraci částic, případně vytvořila větší velikost částic a použila více vzorků pro porovnání.

V dalších experimentech byla sledována míra adsorpce modelového proteinu ovalbuminu na CS:TPP, CS:TPP/HA částice a na SiO<sub>2</sub> mikrovlákna. Po optimalizaci

koncentrace sorbovaného ovalbuminu byla zvolena koncentrace OVA 500  $\mu\text{g/ml}$ . Nejvyšší účinnost sorpce OVA měly samotné chitosanové částice (CS:TPP). Z tohoto důvodu byly CS:TPP vybrány pro tvorbu kompozitu s mikrovláknou  $\text{SiO}_2$ .

U kompozitu CS:TPP/ $\text{SiO}_2$  byl hodnocen zeta potenciál, který se změnil k jiným hodnotám, které byly nestabilní. CS:TPP/ $\text{SiO}_2$  byl hodnocen metodou SEM. Částice byly detekovány, takže kompozit zřejmě nemění jejich morfologické vlastnosti. Na kompozit CS:TPP/ $\text{SiO}_2$  bylo nasorbováno 23,84 % z celkového vloženého ovalbuminu o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$ . V porovnání se samotnými CS:TPP částicemi jde o téměř stejné množství a účinnost sorpce se vazbou  $\text{SiO}_2$  mikrovláken téměř nezměnila.

CS:TPP a CS:TPP/HA částice a kompozit CS:TPP/ $\text{SiO}_2$  byly použity jako nosičové systémy pro sledování kinetiky uvolňování ovalbuminu z těchto nosičů. Nejvíce OVA se uvolnilo z čerstvých CS:TPP částic v porovnání s částicemi po lyofilizaci. Částice s HA vykazovaly nejnižší míru uvolňování OVA ve srovnání s CS:TPP částicemi. Kompozit v porovnání se samotnými CS:TPP částicemi uvolňoval téměř stejné množství OVA. Největší množství ovalbuminu se tedy uvolňovalo z CS:TPP částic, poté z kompozitu CS:TPP/ $\text{SiO}_2$  a nejméně z CS:TPP/HA.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] HOFFMAN, Allan S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* [online]. 2008, **132**(3), 153-163 [cit. 2023-03-02]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2008.08.012
- [2] ENGLERT, Christoph, Johannes BRENDEL, Tobias MAJDANSKI, Turgay YILDIRIM, Stephanie SCHUBERT, Michael GOTTSCHALDT, Norbert WINDHAB a Ulrich SCHUBERT. Pharmapolymers in the 21st century: Synthetic polymers in drug delivery applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2018, **87**, 107-164 [cit. 2023-03-02]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2018.07.005
- [3] BHATIA, Saurabh. Natural Polymers vs Synthetic Polymer. In: BHATIA, Saurabh. *Natural Polymer Drug Delivery Systems* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, s. 95-118 [cit. 2023-03-02]. ISBN 978-3-319-41128-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-41129-3\_3
- [4] MATICA, Mariana, Finn AACHMANN, Anne TøNDERVIK, Håvard SLETTA a Vasile OSTAFE. "Preparation, physico-chemical characterization and antibacterial properties of chitosan and chitosan–nisin membranes ". *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia* [online]. 2022, **67**(1), 209-226 [cit. 2023-04-09]. ISSN 12247154. Dostupné z: doi:10.24193/subbchem.2022.1.14
- [5] CAMCI-UNAL, Gulden, Davide CUTTICA, Nasim ANNABI, Danilo DEMARCHI a Ali KHADEMHOSEINI. Synthesis and Characterization of Hybrid Hyaluronic Acid-Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(4), 1085-1092 [cit. 2023-03-02]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm3019856
- [6] HU, Qiaobin, Yingjian LU a Yangchao LUO. Recent advances in dextran-based drug delivery systems: From fabrication strategies to applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, **264** [cit. 2023-03-02]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.117999
- [7] CORADIN, Thibaud. Silica/alginate bio-nanocomposites. In: MITTAL, Vikas. *Nanocomposites with Biodegradable Polymers* [online]. Oxford University Press, 2011, s. 166-188 [cit. 2023-04-06]. ISBN 9780199581924. Dostupné z: doi:10.1093/acprof:oso/9780199581924.003.0007

- [8] LEE, Kuen a David MOONEY. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2012, **37**(1), 106-126 [cit. 2023-03-02]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
- [9] GOLSHAN, Marzieh, Mehdi SALAMI-KALAJAHI, Hossein ROGHANI-MAMAQANI a Maryam MOHAMMADI. Poly(propylene imine) dendrimer-grafted nanocrystalline cellulose: Doxorubicin loading and release behavior. *Polymer* [online]. 2017, **117**, 287-294 [cit. 2023-03-02]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2017.04.047
- [10] THAKUR, Vijay a Manju THAKUR. Processing and characterization of natural cellulose fibers/thermoset polymer composites. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, **109**, 102-117 [cit. 2023-03-02]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.03.039
- [11] MEBERT, Andrea, Carolyn BAGLOLE, Martin DESIMONE a Dusica MAYSINGER. Nanoengineered silica: Properties, applications and toxicity. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2017, **109**, 753-770 [cit. 2023-04-05]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2017.05.054
- [12] HUANG, Ching-Yuang, Tsui-Hsien HUANG, Chia-Tze KAO, Yuan-Haw WU, Wan-Chen CHEN a Ming-You SHIE. Mesoporous Calcium Silicate Nanoparticles with Drug Delivery and Odontogenesis Properties. *Journal of Endodontics* [online]. 2017, **43**(1), 69-76 [cit. 2023-03-02]. ISSN 00992399. Dostupné z: doi:10.1016/j.joen.2016.09.012
- [13] LU, Bing-Qiang, Ying-Jie ZHU, Hai-Yong AO, Chao QI a Feng CHEN. Synthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide/Calcium Silicate Mesoporous Nanocomposites as a Promising Vehicle for Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2012, **4**(12), 6969-6974 [cit. 2023-03-02]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/am3021284
- [14] JAROSZ, Magdalena, Anna PAWLIK, Michał SZUWARZYŃSKI, Marian JASKUŁA a Grzegorz SULKA. Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential drug delivery systems: Drug release kinetics and mechanism. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, **143**, 447-454 [cit. 2023-03-02]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2016.03.073



- [15] ROMDONI, Yoga, Grandprix KADJA, Yoshitaka KITAMOTO a Munawar KHALIL. Synthesis of multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-Ag nanocomposite for antibacterial and anticancer drug delivery. *Applied Surface Science* [online]. 2023, **610** [cit. 2023-04-03]. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2022.155610
- [16] JAMIL, Shahid, Ghulam DASTAGIR, Ahmed FOUDAH et al. Carduus edelbergii Rech. f. Mediated Fabrication of Gold Nanoparticles; Characterization and Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Antidiabetic Potency of the Synthesized AuNPs. *Molecules* [online]. 2022, **27**(19) [cit. 2023-03-02]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27196669
- [17] KAMBLE, Sonali, Bhimashankar UTAGE, Pratima MOGLE, Rahul KAMBLE, Shrikant HESE, Bhaskar DAWANE a Rajesh GACCHE. Evaluation of Curcumin Capped Copper Nanoparticles as Possible Inhibitors of Human Breast Cancer Cells and Angiogenesis: a Comparative Study with Native Curcumin. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2016, **17**(5), 1030-1041 [cit. 2023-03-02]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-015-0435-5
- [18] ABOLGHASEMZADE, Samere, Mehrab POURMADADI, Hamid RASHEDI, Fatemeh YAZDIAN, Saeed KIANBAKHT a Mona NAVAEI-NIGJEH. PVA based nanofiber containing CQDs modified with silica NPs and silk fibroin accelerates wound healing in a rat model. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2021, **9**(3), 658-676 [cit. 2023-03-02]. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/D0TB01747G
- [19] GHASEMI HAMIDABADI, Hatef, Zahra REZVANI, Maryam NAZM BOJNORDI et al. Chitosan-Intercalated Montmorillonite/Poly(vinyl alcohol) Nanofibers as a Platform to Guide Neuronlike Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2017, **9**(13), 11392-11404 [cit. 2023-03-02]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.6b14283
- [20] KASAAI, Mohammad, Joseph ARUL a Gérard CHARLET. Fragmentation of Chitosan by Acids. *The Scientific World Journal* [online]. 2013, **2013**, 1-11 [cit. 2023-03-02]. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1155/2013/508540
- [21] SIVANESAN, Iyyakkannu, Judy GOPAL, Manikandan MUTHU, Juhyun SHIN, Selvaraj MARI a Jaewook OH. Green Synthesized Chitosan/Chitosan Nanoforms/Nanocomposites for Drug Delivery Applications. *Polymers* [online]. 2021, **13**(14) [cit. 2023-03-02]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13142256

- [22] TSIGOS, Iason, Aggeliki MARTINO, Dimitris KAFETZOPOULOS a Vassilis BOURIOTIS. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology* [online]. 2000, **18**(7), 305-312 [cit. 2023-03-02]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(00)01462-1
- [23] MURUGESAN, Selvakumar a Thomas SCHEIBEL. Chitosan-based nanocomposites for medical applications. *Journal of Polymer Science* [online]. 2021, **59**(15), 1610-1642 [cit. 2023-03-02]. ISSN 2642-4150. Dostupné z: doi:10.1002/pol.20210251
- [24] DENG, Zhenwei, Ting WANG, Xiguang CHEN a Ya LIU. Applications of chitosan-based biomaterials: a focus on dependent antimicrobial properties. *Marine Life Science & Technology* [online]. 2020, **2**(4), 398-413 [cit. 2023-03-02]. ISSN 2096-6490. Dostupné z: doi:10.1007/s42995-020-00044-0
- [25] BENAMER OUDIH, Samah, Djamel TAHTAT, Assia NACER KHODJA, Mohamed MAHLOUS, Yasmina HAMMACHE, Abd-Errahim GUITTOUM a Salima KEBBOUCHE GANA. Chitosan nanoparticles with controlled size and zeta potential. *Polymer Engineering & Science* [online]. 2023, **63**(3), 1011-1021 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0032-3888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.26261
- [26] RAMPINO, Antonio, Massimiliano BORGOGNA, Paolo BLASI, Barbara BELLICH a Attilio CESÀRO. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **455**(1-2), 219-228 [cit. 2023-03-02]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.034
- [27] LUSIANA, Retno, Vivi SANGKOTA, Nurwarrohan SASONGKO et al. Permeability improvement of polyethersulfone-polyethylene glycol (PEG-PES) flat sheet type membranes by tripolyphosphate-crosslinked chitosan (TPP-CS) coating. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **152**, 633-644 [cit. 2023-04-09]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.290
- [28] LI, Lu, Bing YUAN, Shiwei LIU et al. Preparation of high strength chitosan fibers by using ionic liquid as spinning solution. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2012, **22**(17) [cit. 2023-03-02]. ISSN 0959-9428. Dostupné z: doi:10.1039/c2jm30555k
- [29] DAMIRI, Fouad, Yahya BACHRA, Chaimaa BOUNACIR, Asmae LAARAIBI a Mohammed BERRADA. Synthesis and Characterization of Lyophilized Chitosan-Based Hydrogels Cross-Linked with Benzaldehyde for Controlled Drug Release.

- Journal of Chemistry* [online]. 2020, **2020**, 1-10 [cit. 2023-03-02]. ISSN 2090-9063. Dostupné z: doi:10.1155/2020/8747639
- [30] PELLÁ, Michelly, Michele LIMA-TENÓRIO, Ernandes TENÓRIO-NETO, Marcos GUILHERME, Edvani MUNIZ a Adley RUBIRA. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, **196**, 233-245 [cit. 2023-03-02]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.05.033
- [31] VAN DEN BROEK, Lambertus, Rutger KNOOP, Frans KAPPEN a Carmen BOERIU. Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, **116**, 237-242 [cit. 2023-03-02]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.039
- [32] DUTTA, P.K., Shipra TRIPATHI, G.K. MEHROTRA a Joydeep DUTTA. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* [online]. 2009, **114**(4), 1173-1182 [cit. 2023-03-02]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.047
- [33] ALMALIK, Abdulaziz, Roberto DONNO, Christopher CADMAN, Francesco CELLESI, Philip DAY a Nicola TIRELLI. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: Molecular weight-dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation. *Journal of Controlled Release* [online]. 2013, **172**(3), 1142-1150 [cit. 2023-03-02]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2013.09.032
- [34] REGHIOUA, Abdallah, Djamel BARKAT, Ali JAWAD, Ahmed ABDULHAMEED a Mohammad KHAN. Synthesis of Schiff's base magnetic crosslinked chitosan-glyoxal/ZnO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for enhanced adsorption of organic dye: Modeling and mechanism study. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* [online]. 2021, **20** [cit. 2023-03-02]. ISSN 23525541. Dostupné z: doi:10.1016/j.scp.2021.100379
- [35] MORIMOTO, Minoru, Masaru NAKAO, Naoya ISHIBASHI, Yoshihiro SHIGEMASA, Shinsuke IFUKU a Hiroyuki SAIMOTO. Synthesis of novel chitosan with chitosan side chains. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **84**(2), 727-731 [cit. 2023-03-02]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2010.03.035
- [36] SZYMAŃSKA, Emilia a Katarzyna WINNICKA. Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Marine Drugs* [online]. 2015, **13**(4), 1819-1846 [cit. 2023-03-03]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md13041819

- [37] SCHMIDL, Doreen, René WERKMEISTER, Semira KAYA et al. A Controlled, Randomized Double-Blind Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Chitosan- N -Acetylcysteine for the Treatment of Dry Eye Syndrome. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* [online]. 2017, **33**(5), 375-382 [cit. 2023-03-02]. ISSN 1080-7683. Dostupné z: doi:10.1089/jop.2016.0123
- [38] VAN DER LUBBEN, I.M, J.C VERHOEF, G BORCHARD a H.E JUNGINGER. Chitosan for mucosal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2001, **52**(2), 139-144 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00197-1
- [39] JIN, Zheng, Shuang GAO, Xianlan CUI, Dejun SUN a Kai ZHAO. Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2019, **572** [cit. 2023-03-27]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118731
- [40] BADR, Emad, Hassan HEFNI, S.H. SHAFEK a Samy SHABAN. Synthesis of anionic chitosan surfactant and application in silver nanoparticles preparation and corrosion inhibition of steel. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **157**, 187-201 [cit. 2023-03-02]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.184
- [41] BELTON, David, Olivier DESCHAUME a Carole PERRY. An overview of the fundamentals of the chemistry of silica with relevance to biosilicification and technological advances. *FEBS Journal* [online]. 2012, **279**(10), 1710-1720 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1742464X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08531.x
- [42] MAMAEVA, Veronika, Cecilia SAHLGREN a Mika LINDÉN. Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2013, **65**(5), 689-702 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2012.07.018
- [43] MANZANO, Miguel a María VALLET-REGÍ. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Advanced Functional Materials* [online]. 2019, **30**(2) [cit. 2023-04-05]. ISSN 1616-301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.201902634
- [44] MERRITT, Sonia, Agata EXNER, Zhenghong LEE a Horst VON RECUM. Electrospinning and Imaging. *Advanced Engineering Materials* [online]. 2012, **14**(5),

266-278 [cit. 2023-04-04]. ISSN 14381656. Dostupné z:  
doi:10.1002/adem.201180010

- [45] SHAHHOSSEININIA, Mehran, Saeed BAZGIR a Morteza JOUPARI. Fabrication and investigation of silica nanofibers via electrospinning. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2018, **91**, 502-511 [cit. 2023-04-04]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2018.05.068
- [46] SALIS, Andrea, Maura FANTI, Luca MEDDA, Valentina NAIRI, Francesca CUGIA, Marco PILUDU, Valeria SOGOS a Maura MONDUZZI. Mesoporous Silica Nanoparticles Functionalized with Hyaluronic Acid and Chitosan Biopolymers. Effect of Functionalization on Cell Internalization. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. 2016, **2**(5), 741-751 [cit. 2023-04-07]. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.5b00502
- [47] TSOU, P-H, C-K CHOU, S SALDANA, M-C HUNG a J KAMEOKA. The fabrication and testing of electrospun silica nanofiber membranes for the detection of proteins. *Nanotechnology* [online]. 2008, **19**(44) [cit. 2023-04-04]. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/19/44/445714
- [48] AYDEMIR, Tuba, Juan PASTORE, Emilio JIMENEZ-PIQUE, Joan ROA, Aldo BOCCACCINI a Josefina BALLARRE. Morphological and mechanical characterization of chitosan/gelatin/silica-gentamicin/bioactive glass coatings on orthopaedic metallic implant materials. *Thin Solid Films* [online]. 2021, **732** [cit. 2023-04-03]. ISSN 00406090. Dostupné z: doi:10.1016/j.tsf.2021.138780
- [49] SIGNORETTO, M., E. GHEDINI, V. NICHELE et al. Formulation of Innovative Hybrid Chitosan/TiO<sub>2</sub>- and Chitosan/SiO<sub>2</sub>-Based Drug-Delivery Systems. In: *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting* [online]. Elsevier, 2016, s. 201-226 [cit. 2023-04-06]. ISBN 9780323473477. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-47347-7.00008-2
- [50] PALLA-RUBIO, B., N. ARAÚJO-GOMES, M. FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, L. ROJO, J. SUAY, M. GURRUCHAGA a I. GOÑI. Synthesis and characterization of silica-chitosan hybrid materials as antibacterial coatings for titanium implants. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, **203**, 331-341 [cit. 2023-04-03]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.09.064

- [51] ALVAREZ, Gisela, Christophe HÉLARY, Andrea MEBERT, Xiaolin WANG, Thibaud CORADIN a Martin DESIMONE. Antibiotic-loaded silica nanoparticle–collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2014, **2**(29) [cit. 2023-04-05]. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/c4tb00327f
- [52] VAHABI, Leila, Parviz RASHIDI RANJBAR a Fatemeh DAVAR. Cladosporium protease/doxorubicin decorated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanocomposite: An efficient nanoparticle for drug delivery and combating breast cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2023, **80** [cit. 2023-04-06]. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2022.104144
- [53] GARY-BOBO, Magali, David BREVET, Nadia BENKIRANE-JESSEL, Laurence RAEHM, Philippe MAILLARD, Marcel GARCIA a Jean-Olivier DURAND. Hyaluronic acid-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient photodynamic therapy of cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2012, **9**(3), 256-260 [cit. 2023-04-06]. ISSN 15721000. Dostupné z: doi:10.1016/j.pdpdt.2011.12.010
- [54] PULUHULAWA, Lisa, I JONI, Khaled ELAMIN, Ahmed MOHAMMED, Muchtaridi MUCHTARIDI a Nasrul WATHONI. Chitosan–Hyaluronic Acid Nanoparticles for Active Targeting in Cancer Therapy. *Polymers* [online]. 2022, **14**(16) [cit. 2023-04-07]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14163410
- [55] WU, Song, Liang DENG, Hanson HSIA et al. Evaluation of gelatin-hyaluronic acid composite hydrogels for accelerating wound healing. *Journal of Biomaterials Applications* [online]. 2017, **31**(10), 1380-1390 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0885-3282. Dostupné z: doi:10.1177/0885328217702526
- [56] PAN, Zhao, Kai-Run ZHANG, Huai-Ling GAO et al. Activating proper inflammation for wound-healing acceleration via mesoporous silica nanoparticle tissue adhesive. *Nano Research* [online]. 2020, **13**(2), 373-379 [cit. 2023-03-24]. ISSN 1998-0124. Dostupné z: doi:10.1007/s12274-020-2619-x
- [57] HASHEMIKIA, Samaneh, Farhad FARHANGPAZHOUH, Maliheh PARSA, Maryam HASAN, Atiyeh HASSANZADEH a Mehrdad HAMIDI. Fabrication of ciprofloxacin-loaded chitosan/polyethylene oxide/silica nanofibers for wound dressing application: In vitro and in vivo evaluations. *International Journal of Pharmaceutics*

- [online]. 2021, **597** [cit. 2023-03-02]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120313
- [58] BEGINES, Belén, Tamara ORTIZ, María PÉREZ-ARANDA, Guillermo MARTÍNEZ, Manuel MERINERO, Federico ARGÜELLES-ARIAS a Ana ALCUDIA. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials* [online]. 2020, **10**(7) [cit. 2023-03-30]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano10071403
- [59] RUMAN, Umme, Sharida FAKURAZI, Mas MASARUDIN a Mohd HUSSEIN. PNanocarrier-Based Therapeutics and Theranostics Drug Delivery Systems for Next Generation of Liver Cancer Nanodrug Modalities/p. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2020, **15**, 1437-1456 [cit. 2023-03-02]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S236927
- [60] ISLAM, Nazrul, Isra DMOUR a Mutasem TAHA. Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. *Heliyon* [online]. 2019, **5**(5) [cit. 2023-03-09]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01684
- [61] RAAFAT, Dina, Kristine VON BARGEN, Albert HAAS a Hans-Georg SAHL. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2008, **74**(12), 3764-3773 [cit. 2023-03-10]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00453-08
- [62] ARANAZ, Inmaculada, Marian MENGIBAR, Ruth HARRIS, Ines PANOS, Beatriz MIRALLES, Niuris ACOSTA, Gemma GALED a Angeles HERAS. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology* [online]. 2009, **3**(2), 203-230 [cit. 2023-03-09]. ISSN 22127968. Dostupné z: doi:10.2174/2212796810903020203
- [63] ALMUTAIRI, Fahad, Ahmed ABD-RABOU a Mervat MOHAMED. Raloxifene-encapsulated hyaluronic acid-decorated chitosan nanoparticles selectively induce apoptosis in lung cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2019, **27**(8), 1629-1638 [cit. 2023-04-27]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2019.03.004
- [64] DELLA SALA, Francesca, Gennaro LONGOBARDO, Antonio FABOZZI, Mario DI GENNARO a Assunta BORZACCHIELLO. Hyaluronic Acid-Based Wound Dressing with Antimicrobial Properties for Wound Healing Application. *Applied Sciences*

- [online]. 2022, **12**(6) [cit. 2023-03-16]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app12063091
- [65] KOH, Timothy a Luisa DIPIETRO. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine* [online]. 2011, **13** [cit. 2023-03-24]. ISSN 1462-3994. Dostupné z: doi:10.1017/S1462399411001943
- [66] LIU, Zhi-wei, Yi-ming ZHANG, Li-ying ZHANG et al. Duality of Interactions Between TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  During Tumor Formation. *Frontiers in Immunology* [online]. 2022, **12** [cit. 2023-03-02]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2021.810286
- [67] TARUSHA, Lorena, Sergio PAOLETTI, Andrea TRAVAN a Eleonora MARSICH. Alginate membranes loaded with hyaluronic acid and silver nanoparticles to foster tissue healing and to control bacterial contamination of non-healing wounds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2018, **29**(2) [cit. 2023-04-27]. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-018-6027-7
- [68] SUWANTONG, Orawan. Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats. *Polymers for Advanced Technologies* [online]. 2016, **27**(10), 1264-1273 [cit. 2023-03-16]. ISSN 10427147. Dostupné z: doi:10.1002/pat.3876
- [69] PATI, Rashmirekha, Maxim SHEVTSOV a Avinash SONAWANE. Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology* [online]. 2018, **9** [cit. 2023-03-27]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.02224
- [70] AMIDI, Maryam, Stefan ROMELIJN, J. VERHOEF, Hans JUNGINGER, Laura BUNGENER, Anke HUCKRIEDE, Daan CROMMELIN a Wim JISKOOT. N-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine* [online]. 2007, **25**(1), 144-153 [cit. 2023-03-27]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.086
- [71] PAWAR, Dilip a K.S. JAGANATHAN. Mucoadhesive glycol chitosan nanoparticles for intranasal delivery of hepatitis B vaccine: enhancement of mucosal and systemic immune response. *Drug Delivery* [online]. 2016, **23**(1), 185-194 [cit. 2023-03-27]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.3109/10717544.2014.908427
- [72] GOWD, Vemana, Anas AHMAD, Mohammad TARIQUE, Mohd SUHAIL, Torki ZUGHAIPI, Shams TABREZ a Rehan KHAN. Advancement of cancer



- immunotherapy using nanoparticles-based nanomedicine. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2022, **86**, 624-644 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2022.03.026
- [73] D'AVANZO, Nicola, Giulia TORRIERI, Patrícia FIGUEIREDO et al. LinTT1 peptide-functionalized liposomes for targeted breast cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2021, **597** [cit. 2023-03-28]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120346
- [74] YIN, X., Q. YU, B. LI, C. ZHANG a Mikhail ZHELUDKEVICH. Preparation and Characterization of Sodium Alginate/Chitosan Composite Nanoparticles Loaded with Chondroitin Sulfate. *Advances in Materials Science and Engineering* [online]. 2021, **2021**, 1-9 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1687-8442. Dostupné z: doi:10.1155/2021/6665488
- [75] MAHAN, Matthew a Amber DOIRON. Gold Nanoparticles as X-Ray, CT, and Multimodal Imaging Contrast Agents: Formulation, Targeting, and Methodology. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2018, **2018**, 1-15 [cit. 2023-04-27]. ISSN 1687-4110. Dostupné z: doi:10.1155/2018/5837276
- [76] LIU, Yongjun, Zhijin CHEN, Chunxi LIU, Dexin YU, Zaijun LU a Na ZHANG. Gadolinium-loaded polymeric nanoparticles modified with Anti-VEGF as multifunctional MRI contrast agents for the diagnosis of liver cancer. *Biomaterials* [online]. 2011, **32**(22), 5167-5176 [cit. 2023-03-30]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.077
- [77] BELLIZZI, G., O. BUCCI a I. CATAPANO. Microwave Cancer Imaging Exploiting Magnetic Nanoparticles as Contrast Agent. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* [online]. 2011, **58**(9), 2528-2536 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0018-9294. Dostupné z: doi:10.1109/TBME.2011.2158544
- [78] EL-GENDY, Ahmed, Shane HARSTAD, Vimalan VIJAYARAGAVAN, Shalabh GUPTA, Vitalij PECHARSKY, Jamal ZWEIT a Ravi HADIMANI. Ferromagnetic Gd<sub>5</sub>Si<sub>4</sub> Nanoparticles as T<sub>2</sub> Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *IEEE Magnetics Letters* [online]. 2017, **8**, 1-4 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1949-307X. Dostupné z: doi:10.1109/LMAG.2017.2728503
- [79] CAI, Xiaoxia, Qingxia ZHU, Yun ZENG, Qi ZENG, Xueli CHEN a Yonghua ZHAN. PManganese Oxide Nanoparticles As MRI Contrast Agents In Tumor Multimodal

- Imaging And Therapy/p. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2019, **14**, 8321-8344 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S218085
- [80] CAO, Lei, Fei ZHANG, Qiugen WANG a Xiaofeng WU. Fabrication of chitosan/graphene oxide polymer nanofiber and its biocompatibility for cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **79**, 697-701 [cit. 2023-03-02]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.05.056
- [81] FUKUNISHI, Takuma, Cameron BEST, Tadahisa SUGIURA et al. Tissue-Engineered Small Diameter Arterial Vascular Grafts from Cell-Free Nanofiber PCL/Chitosan Scaffolds in a Sheep Model. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11(7)** [cit. 2023-03-02]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0158555
- [82] NINGTHOUJAM, Rina, Yengkhom SINGH, Punuri BABU, Akriti TIRKEY, Srimay PRADHAN a Mrinal SARMA. Nanocatalyst in remediating environmental pollutants. *Chemical Physics Impact* [online]. 2022, **4** [cit. 2023-03-02]. ISSN 26670224. Dostupné z: doi:10.1016/j.chphi.2022.100064
- [83] MALLIK, Abul, SM KABIR, Fahim BIN ABDUR RAHMAN, Mohammad SAKIB, Shakil EFTY a Mohammed RAHMAN. Cu(II) removal from wastewater using chitosan-based adsorbents: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2022, **10(4)** [cit. 2023-03-02]. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2022.108048
- [84] JAWAD, Ali, Uttam SAHU, Nur JANI, Zeid ALOTHMAN a Lee WILSON. Magnetic crosslinked chitosan-tripolyphosphate/MgO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite for reactive blue 19 dye removal: Optimization using desirability function approach. *Surfaces and Interfaces* [online]. 2022, **28** [cit. 2023-03-02]. ISSN 24680230. Dostupné z: doi:10.1016/j.surfin.2021.101698
- [85] PRASAD, Cheera, P. MURTHY, R. KRISHNA, R. RAO, V. SUNEETHA a Ponneri VENKATESWARLU. Bio-inspired green synthesis of RGO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles using Murraykoenigii leaves extract and its application for removal of Pb(II) from aqueous solution. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2017, **5(5)**, 4374-4380 [cit. 2023-03-02]. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2017.07.026
- [86] GOGOI, Pankaj, Ashim THAKUR, Rashmi DEVI, Bodhaditya DAS a Tarun MAJI. Adsorption of As(V) from contaminated water over chitosan coated magnetite

- nanoparticle: Equilibrium and kinetics study. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* [online]. 2017, **8**, 297-305 [cit. 2023-03-02]. ISSN 22151532. Dostupné z: doi:10.1016/j.enmm.2017.09.002
- [87] WANG, Wei. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2000, **203**(1-2), 1-60 [cit. 2023-03-04]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(00)00423-3
- [88] WANG, Wei, Mo CHEN a Guohua CHEN. Issues in Freeze Drying of Aqueous Solutions. *Chinese Journal of Chemical Engineering* [online]. 2012, **20**(3), 551-559 [cit. 2023-03-04]. ISSN 10049541. Dostupné z: doi:10.1016/S1004-9541(11)60218-8
- [89] WONG, Chun, Hani AL-SALAMI a Crispin DASS. Lyophilisation Improves Bioactivity and Stability of Insulin-Loaded Polymeric-Oligonucleotide Nanoparticles for Diabetes Treatment. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2020, **21**(3) [cit. 2023-03-08]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-020-01648-6
- [90] BUDI, Setia, B. SULIASIH, Indah RAHMAWATIA a Erdawati ERDAWATI. Size-controlled chitosan nanoparticles prepared using ionotropic gelation. *ScienceAsia* [online]. 2020, **46**(4) [cit. 2023-04-09]. ISSN 1513-1874. Dostupné z: doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2020.059
- [91] INKSON, B.J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In: *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods* [online]. Elsevier, 2016, s. 17-43 [cit. 2023-04-27]. ISBN 9780081000403. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X
- [92] HE, Yongju, Jing LI, Mengqiu LONG, Shuquan LIANG a Hui XU. Tuning pore size of mesoporous silica nanoparticles simply by varying reaction parameters. *Journal of Non-Crystalline Solids* [online]. 2017, **457**, 9-12 [cit. 2023-04-09]. ISSN 00223093. Dostupné z: doi:10.1016/j.jnoncrysol.2016.11.023
- [93] BISWAS, Subrata, Mainak CHATTOPADHYAY, Kalyan SEN a Malay SAHA. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, **121**, 403-410 [cit. 2023-04-09]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.12.044

- [94] S, Jesus. Freeze Dried Chitosan/ Poly- $\epsilon$ -Caprolactone and Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Nanoparticles: Evaluation of their Potential as DNA and Antigen Delivery Systems. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy* [online]. 2013, **4**(7) [cit. 2023-04-10]. ISSN 21577412. Dostupné z: doi:10.4172/2157-7412.1000164
- [95] KAHYA, Nilay a F. Bedia ERIM. Surfactant modified alginate composite gels for controlled release of protein drug. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, **224** [cit. 2023-05-04]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115165
- [96] BORGES, Olga, Anabela CORDEIRO-DA-SILVA, Stefan ROMEIJN, Maryam AMIDI, Adriano DE SOUSA, Gerrit BORCHARD a Hans JUNGINGER. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *Journal of Controlled Release* [online]. 2006, **114**(3), 348-358 [cit. 2023-04-10]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2006.06.011
- [97] BOLKOVÁ, Alexandra. *Příprava chitosanových částic s proteiny pro podání na sliznici*. Pardubice, 2021. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [98] DI MARTINO, Antonio a Vladimir SEDLARİK. Amphiphilic chitosan-grafted-functionalized polylactic acid based nanoparticles as a delivery system for doxorubicin and temozolomide co-therapy. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, **474**(1-2), 134-145 [cit. 2023-05-02]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2014.08.014
- [99] S., Vignesh, Sivashanmugam A., Mohandas ANNAPOORNA, Janarthanan R., Iyer SUBRAMANIA, Nair SHANTIKUMAR V. a Jayakumar R. Injectable deferoxamine nanoparticles loaded chitosan-hyaluronic acid coacervate hydrogel for therapeutic angiogenesis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2018, **161**, 129-138 [cit. 2023-04-28]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.10.033