

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Studium chitosanových částic s proteiny k hojení ran
Diplomová práce

2025

Bc. Kateřina Štefanová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Štefanová**
Osobní číslo: **C23325**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Studium chitosanových částic s proteiny k hojení ran**
Téma práce anglicky: **Study of Chitosan Particles with Wound Healing Proteins**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- Seznamte se s literaturou týkající se aplikací polymerních částic z chitosanu v systémech drug delivery v oblasti hojení ran.
- Vypracujte literární rešerši o úloze růstových faktorů v hojení, jejich propojení s nanomateriály a způsobech hodnocení jejich toxicity. Zaměřte se také na způsoby skladování a stabilitu těchto systémů.
- Informace zpracujte přehledně, použijte také obrázky, schémata, grafy a závěry využijte pro experimentální část práce.

Experimentální část:

- Příprava submikročástic z chitosanu s ovalbuminem a růstovým faktorem, lyofilizace
- Charakterizace částic v monodisperzních a polydisperzních systémech (hydrodynamický rozptyl světla DLS, index polydisperzity PI, zeta potenciál, stabilita)
- Sledování účinnosti vazby proteinů na částice a jejich uvolňování po lyofilizaci částic
- Fluorescenční značení chitosanu a příprava submikročástic pro hodnocení jejich interakce s buněčnou linií A549
- Zhodnoťte získané výsledky s publikovanými výsledky v recentní literatuře.

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.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **RNDr. Karel Královec, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

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

LS.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Studium chitosanových částic s proteiny k hojení ran 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

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 9. 5. 2025

Kateřina Štefanová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala paní doc. Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za její trpělivost, ochotu a vřelý přístup, a to jak v laboratoři, tak při samotném psaní práce. Poděkování patří také konzultantovi mé diplomové práce panu RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D. za umožnění buněčných experimentů, užitečné rady a vstřícnost během celé spolupráce. Dále děkuji panu doc. Ing. Liboru Červenkoví, Ph.D. za umožnění provedení lyofilizace částic. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací submikročástic z chitosanu pro zachycení proteinů k hojení ran. V teoretické části je popsán proces hojení ran, růstové faktory a jejich kombinace s nanomateriály. Dále jsou popsány vlastnosti těchto materiálů a metody pro jejich charakterizaci. V experimentální části byly submikročástice s ovalbuminem a epidermálním růstovým faktorem charakterizovány pomocí dynamického rozptylu světla, účinnosti zachycení proteinů, stanovení stability a jejich profilu uvolňování po lyofilizaci. Byla také stanovena míra nespecifické buněčné internalizace chitosanových částic bez proteinu a receptorově zprostředkovaný příjem částic skrze receptor epidermálního růstového faktoru.

KLÍČOVÁ SLOVA

chitosan, submikročástice, epidermální růstový faktor, ovalbumin, hojení ran, buněčná internalizace

TITLE

Study of Chitosan Particles with Wound Healing Proteins

ANNOTATION

The diploma thesis focuses on the preparation and characterization of chitosan submicroparticles for the capture of wound healing proteins. The theoretical part describes the wound healing process, growth factors and their combination with nanomaterials. It also covers the properties of these materials and methods for their characterization. In the experimental part, submicroparticles loaded with ovalbumin and epidermal growth factor were characterized using dynamic light scattering, protein capture efficiency, stability testing and their release profile after lyophilization. The extent of non-specific cellular uptake of chitosan particles without protein was also determined and receptor-mediated uptake of particles via the epidermal growth factor receptor was investigated.

KEYWORDS

chitosan, submicroparticles, epidermal growth factor, ovalbumin, wound healing, cellular uptake

OBSAH

ÚVOD	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1. Spojení růstových faktorů s nanomateriály k hojení ran	15
1.1.1. Proces hojení ran.....	16
1.1.2. Růstové faktory v hojení ran.....	18
1.1.3. Epidermální růstový faktor	19
1.1.4. Nanomateriály s růstovými faktory	20
1.2. Nosičové systémy z chitosanu	21
1.2.1. Chitosan	22
1.2.2. Tripolyfosfát sodný.....	23
1.2.3. Částice.....	24
1.2.4. Nanovláknna	26
1.2.5. Hydrogely	27
1.3. Vazba látek s nosiči	27
1.3.1. Zachycení.....	28
1.3.2. Enkapsulace	29
1.3.3. Adsorpce	29
1.4. Charakterizace částic s proteiny	30
1.4.1. Hydrodynamická velikost a polydisperzní index.....	30
1.4.1. Zeta potenciál.....	32
1.4.2. Stanovení množství proteinu	32
1.4.3. Kinetika uvolňování proteinů z částic a jiných forem	33
1.5. Hodnocení toxicity nosičových systémů	35
1.5.1. Internalizace částic do buněk.....	36
1.5.2. Toxicita <i>in vitro</i>	37
1.6. Skladování nosičových systémů	39

1.6.1.	Lyofilizace	39
1.6.2.	Sušení rozprašováním	40
2.	CÍL PRÁCE.....	41
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
3.1.	Laboratorní přístroje a pomůcky.....	42
3.2.	Reagencie a chemikálie	43
3.3.	Příprava částic z chitosanu a tripolyfosfátu sodného.....	44
3.4.	Fluorescenční značení částic z chitosanu a tripolyfosfátu sodného.....	45
3.4.1.	Příprava fluorescenčně značeného chitosanu	45
3.4.2.	Příprava fluorescenčně značených chitosanových částic.....	46
3.5.	Zachycení proteinu ve struktuře částic	47
3.5.1.	Hodnocení účinnosti zachycení proteinu a vazebné kapacity částic	48
3.6.	Obalení částic do kyseliny hyaluronové	48
3.6.1.	Chitosanové částice obalené kyselinou hyaluronovou s proteinem.....	49
3.7.	Fyzikálně-chemická charakterizace částic.....	50
3.7.1.	Stanovení hydrodynamické velikosti a polydisperzního indexu	50
3.7.2.	Stanovení zeta potenciálu	51
3.8.	Sledování charakteristik částic v čase.....	51
3.9.	Hodnocení interakce částic s buněčnou linií A549.....	52
3.10.	Stanovení množství proteinu bicinchoninovou metodou.....	54
3.10.1.	Metoda v mikrotitrační destičce	54
3.10.2.	Metoda v mikrozkušnicích	55
3.11.	Lyofilizace částic s proteiny	56
3.12.	Kinetika uvolňování proteinu z lyofilizovaných částic	57
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	59
4.1.	Příprava a charakterizace částic z chitosanu a tripolyfosfátu sodného.....	60
4.1.1.	Vyhodnocení krátkodobé stability částic	63

4.2.	Příprava částic se zachyceným proteinem	64
4.2.1.	Účinnost vazby proteinu do struktury částic.....	66
4.2.2.	Kinetika uvolňování proteinů z lyofilizovaných částic	68
4.3.	Příprava částic z chitosanu a kyseliny hyaluronové s proteiny	73
4.3.1.	Účinnost vazby proteinu do obalu částic	76
4.3.2.	Kinetika uvolňování proteinu z obalu částic po lyofilizaci	78
4.4.	Porovnání účinnosti vazby a uvolňování proteinů z lyofilizovaných částic.....	79
4.5.	Studium interakce částic s buněčnou linií A549.....	81
4.5.1.	Příprava a charakterizace fluorescenčně značených částic	83
4.5.2.	Vyhodnocení krátkodobé stability částic	84
4.5.3.	Hodnocení interakce částic s EGF s buněčnou linií A549.....	85
5.	ZÁVĚR.....	92
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	93

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Klasifikace nanomateriálů podle počtu rozměrů, upraveno dle [6].....	15
Obrázek 2: Fáze hojení ran, upraveno dle [18]	17
Obrázek 3: Chemická struktura chitosanu, upraveno dle [80]	22
Obrázek 4: Vzorec tripolyfosfátu sodného [93]	23
Obrázek 5: Příprava částic CS/TPP, upraveno dle [104]	25
Obrázek 6: Možnosti vazby látek s částicemi, převzato z [130] a upraveno dle [117].....	28
Obrázek 7: Mechanismy uvolňování látek z částic, upraveno dle [117]	33
Obrázek 8: Mechanismy buněčné internalizace částic, upraveno dle [173]	36
Obrázek 9: Schéma přípravy částic v této práci	45
Obrázek 10: Schématické znázornění všech připravených CS částic v této práci	59
Obrázek 11: Distribuce velikosti částic (12 měření) – monodisperzní forma.....	61
Obrázek 12: Distribuce velikosti částic (12 měření) – polydisperzní forma.....	61
Obrázek 13: Elektrostatické interakce mezi CS a HA [221].....	74
Obrázek 14: Reakce značení chitosanu pomocí FITC, upraveno dle [182].....	83
Obrázek 15: Chitosan značený FITC po přípravě a po lyofilizaci	83
Obrázek 16: Zobrazení buněčné internalizace FITC značených částic CS/TPP.....	87
Obrázek 17: Zobrazení buněčné internalizace FITC značených částic CS/TPP s EGF.....	88

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled běžných materiálů k tvorbě nosičů růstových faktorů	21
Tabulka 2: Přehled studií kinetiky uvolňování EGF do různých roztoků simulující rány.....	35
Tabulka 3: Přehled využívaných testů pro hodnocení cytotoxicity CS částic	38
Tabulka 4: Příprava kalibračních standardů pro MicroBCA TM test v mikrotitrační destičce	55
Tabulka 5: Příprava kalibračních standardů pro MicroBCA TM test v mikrozkušnicích	56
Tabulka 6: Lyofilizační program.....	57
Tabulka 7: Fyzikálně-chemická charakterizace částic CS/TPP (n = 3)	61
Tabulka 8: Fyzikálně-chemická charakterizace částic se zachyceným proteinem v polymerní matici (n = 3)	65
Tabulka 9: Účinnost zachycení proteinu v polymerní matici částic (n = 3)	67
Tabulka 10: Naměřené koncentrace uvolněného OVA ze struktury částic po lyofilizaci (n = 3).....	70
Tabulka 11: Naměřené koncentrace EGF v alikvotech po uvolnění ze struktury částic po lyofilizaci (n = 3)	72
Tabulka 12: Fyzikálně-chemická charakterizace částic obalených kyselinou hyaluronovou a s OVA (n = 3)	75
Tabulka 13: Účinnost zachycení ovalbuminu v obalu částic (n = 3)	77
Tabulka 14: Naměřené koncentrace OVA v alikvotech po uvolnění z obalu částic po lyofilizaci (n = 2)	78
Tabulka 15: Fyzikálně-chemická charakterizace FITC značených částic CS/TPP (n = 3).....	84
Tabulka 16: Fyzikálně-chemická charakterizace FITC značených částic CS/TPP s a bez EGF použitých pro hodnocení interakce s buňkami (průměr z 12 měření)	86

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1: Reakce bicinchoninového testu, upraveno dle [149].....	33
Rovnice 2: Výpočet účinnosti zachycení proteinu.....	48
Rovnice 3: Výpočet vazebné kapacity nosiče.....	48
Rovnice 4: Výpočet procentuálního nárůstu velikosti částic, upraveno dle [198].....	51
Rovnice 5: Výpočet uvolněného proteinu v procentech.....	58

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Stabilita částic CS/TPP – DLS a PDI (n = 3).....	63
Graf 2: Stabilita částic CS/TPP – zeta potenciál (n = 3).....	64
Graf 3: Kalibrační závislost stanovení proteinu CS/TPP – metoda v mikrotitrační destičce..	67
Graf 4: Kalibrační závislost stanovení uvolněného proteinu – metoda v mikroskopických	69
Graf 5: Kinetika uvolňování zachyceného OVA z lyofilizovaných částic – kumulativní metoda (n = 3).....	70
Graf 6: Kinetika uvolňování zachyceného EGF z lyofilizovaných částic – kumulativní metoda (n = 3).....	72
Graf 7: Kalibrační závislost stanovení proteinu v částicích CS/TPP obalených HA – metoda v mikrotitrační destičce.....	77
Graf 8: Kinetika uvolňování zachyceného OVA z obalu lyofilizovaných částic – kumulativní metoda (n = 2).....	78
Graf 9: Porovnání účinnosti vazby proteinu v částicích (n = 3).....	80
Graf 10: Porovnání uvolňování proteinu z jednotlivých částic – kumulativní metoda (CS/TPP se zachyceným OVA a EGF: n = 3; (CS/TPP)-OVA-HA: n = 2).....	80
Graf 11: Stabilita částic FITC-CS/TPP - DLS a PDI (n = 3).....	85
Graf 12: Stabilita částic FITC-CS/TPP – zeta potenciál (n = 3).....	85
Graf 13: Procentuální míra internalizace FITC značených částic CS/TPP s/bez EGF (n = 6)	89
Graf 14: Kvantitativní analýza částic pomocí FITC signálu (n = 6).....	90

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A549	imortalizovaná buněčná linie lidského adenokarcinomu plic
BCA	bicinchoninová kyselina
bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor
BSA	bovinní sérový albumin
CD	identifikační znak CD (z angl. Cluster of differentiation)
CS	chitosan
DD	stupeň deacetylace
DLS	dynamický rozptyl světla
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix (hmota)
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
ELISA	enzymově spřažený imunosorbentní test (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ELS	elektroforetický rozptyl světla
FDA	Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Administration)
FGF	fibroblastový růstový faktor
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
GAG	glykosaminoglykany
GF	růstový faktor
GM-CSF	faktor stimulující růst kolonií granulocytů a makrofágů
HA	kyselina hyaluronová
hEGF	lidský epidermální růstový faktor
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
KGf	keratinocytový růstový faktor
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (test buněčné viability)
n	počet opakování
NC	negativní kontrola
NK	nukleová kyselina

NP	nanočástice
OVA	ovalbumin
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCL	polykaprolakton
PDGF	růstový faktor odvozený od krevních destiček
PDI	polydisperzní index
PEG	polyethylenglykol
PLGA	poly(mléčno-glykolová kyselina)
PRP	plazma bohatá na trombocyty
rhEGF	rekombinantní epidermální růstový faktor
RNA	ribonukleová kyselina
TGF	transformující růstový faktor
TPP	tripolyfosfát sodný
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

ÚVOD

Současný farmaceutický výzkum se stále více zaměřuje na vývoj systémů umožňujících cílené a kontrolované podávání bioaktivních látek, včetně proteinů. Proteiny mají díky své vysoké specifitě a biologické účinnosti značný terapeutický potenciál, avšak jejich využití je často limitováno nízkou stabilitou, krátkým biologickým poločasem a problematickým transportem v organismu. K překonání těchto překážek se vyvíjejí různé nosičové systémy, jako jsou nano- a mikročástice, nanovlákná, hydrogely a jejich kombinace např. na bázi syntetických a přírodních polymerů.

Jedním z nejpoužívanějších přírodních polymerů k tvorbě nosičů je chitosan (CS), který je biokompatibilní, antimikrobiální, neimunogenní a má protirakovinné a regenerační účinky. Tyto systémy jsou schopny zachytit a ochránit široké spektrum proteinů, od modelových přes růstové faktory (GF) používané v oblasti hojení ran a regenerace, antigenů při přípravě vakcín, až po terapeutické protilátky a léčiva pro cílenou onkologickou terapii. Např. růstové faktory, jako je epidermální růstový faktor (EGF), hrají klíčovou roli v procesu hojení ran, kde podporují proliferaci a migraci buněk. I jen v rámci této práce byly citovány desítky odborných publikací studující nosičové systémy s růstovými faktory, které dokládají značný přínos této strategie.

Cílem této diplomové práce je příprava a charakterizace chitosanových submikročástic s navázanými proteiny. Nejprve byl pro optimalizaci metodiky využit modelový protein ovalbumin. Poté byly studovány částice s EGF s cílem zajištění jeho ochrany, stability a efektivního uvolňování, které je klíčové pro možné využití v terapii chronických ran. Vzhledem k tomu, že se pro dlouhodobé uchování částic často využívá lyofilizace, bylo testováno i jejich uvolňování po tomto procesu.

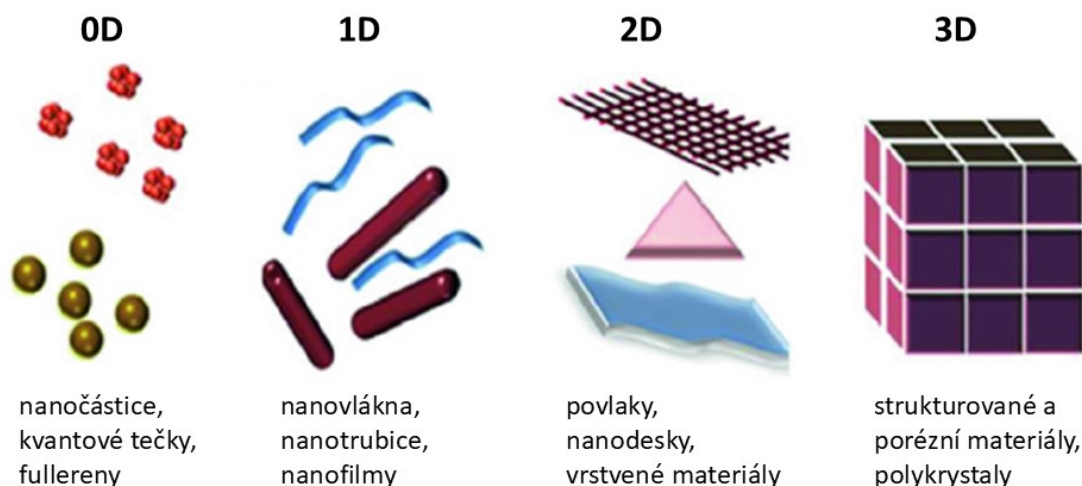
V další části práce je testována možnost cíleného transportu pomocí receptorově zprostředkovaného vstupu do buněk. Konkrétně přes EGF receptor (EGFR), který je nadměrně exprimován v řadě nádorových buněk. Takový přístup může umožnit selektivní dodání léčiva do nádorové tkáně, čímž se minimalizují toxické účinky na zdravé buňky. Tato strategie je předmětem intenzivního výzkumu pro dodávání inhibitorů a toxických protirakovinných látek prostřednictvím EGFR, ale mohla by pomoci i lépe charakterizovat nosiče s EGF k hojení ran.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Spojení růstových faktorů s nanomateriály k hojení ran

Dodávání volných růstových faktorů pro hojení ran je v dnešní lékařské praxi dobře známo. Již v roce 1997 schválil Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) první přípravek obsahující GF k hojení diabetických vředů. Konkrétně se jednalo o přípravek obsahující růstový faktor odvozený od destiček (PDGF) s obchodním názvem Regranex®, po kterém následovaly i další přípravky s GF [1–3].

V současnosti se vyvíjejí také nanomateriály, které díky své malé velikosti, vysokému poměru povrchu k objemu, povrchové funkcionalizaci a schopnosti cíleně dodávat bioaktivní molekuly, jako jsou GF, přímo do místa poranění nabízejí inovativní přístup k urychlení hojení a zlepšení regenerace ve srovnání s tradičními metodami léčby [4, 5]. Nanomateriály jsou látky, které mají velikost mezi 1 a 100 nm, alespoň v jednom ze tří rozměrů, díky čemuž mají jedinečné chemické, fyzikální a biologické vlastnosti ve srovnání s příslušnými materiály ve větším měřítku. Nanomateriály se rovněž liší od pevného, kapalného, plynného a plazmatického skupenství, jelikož materiály v rámci nano mají výrazné optické, magnetické a elektrické vlastnosti [6]. Praktické využití nanomateriálů s GF bylo prokázáno v několika experimentálních studiích [7–13].



Obrázek 1: Klasifikace nanomateriálů podle počtu rozměrů, upraveno dle [6]

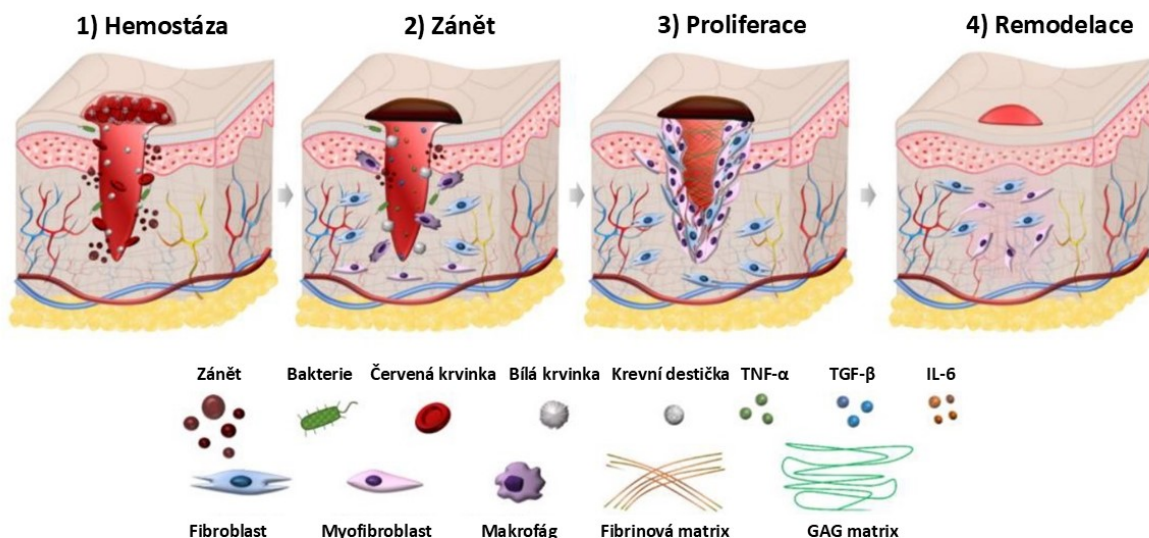
Nanomateriály lze klasifikovat podle počtu rozměrů, které spadají do nanometrového rozsahu. 0D nanomateriály mají všechny tři rozměry v nanometrech, zatímco 1D nanomateriály disponují jednou makroskopickou a dvěma nanometrovými dimenzemi. 2D nanomateriály mají dvě dimenze mimo nanometrový rozsah a pouze jednu v nanometrech. Naopak 3D

nanomateriály nejsou v žádném rozměru omezeny na nanoměřítko, ale jsou tvořeny strukturami s nanorozměrovými prvky. Toto rozdělení, včetně příkladů jednotlivých kategorií, je znázorněno na obrázku 1 [6].

1.1.1. Proces hojení ran

Kůže se skládá ze tří vrstev, epidermis, dermis a podkožního tuku, pokrývá celý vnější povrch těla a tvoří asi 8 % celkové tělesné hmotnosti [14]. Kůže tak působí jako ochranná bariéra proti vnějším vlivům a má vlastnosti, které ji pomáhají chránit se před mechanickým, chemickým, osmotickým, tepelným a fotopoškozením. Při jejím poškození je podkožní tkáň a orgány vystaveny riziku infekce patogeny a nadměrné ztrátě vody, proto je klíčové její co nejrychlejší zahojení [8, 14].

Hojení ran je vysoce koordinovaný proces obnovy poškozené tkáně, který zahrnuje čtyři po sobě jdoucí, ale překrývající se biologická stádia: hemostázu, zánět, proliferaci a remodelaci (znázorněno na obrázku 2) [15]. Tento složitý proces vyžaduje spolupráci extracelulární matrix (ECM) a různých typů buněk, včetně keratinocytů, fibroblastů, endoteliálních buněk, makrofágů a krevních destiček. Tyto buňky jsou v jednotlivých fázích hojení řízeny složitou signální sítí, zahrnující růstové faktory, cytokiny a chemokiny [8, 15, 16]. Hemostáza je první fází hojení ran a zahrnuje procesy, jako je vazokonstrikce, agregace krevních destiček a adheze kolagenu. Tyto procesy jsou nezbytné pro zastavení krvácení a zahájení regeneračního procesu. Zánětlivá fáze zahrnuje odstranění poškozených buněk a patogenů, přičemž buňky jako neutrofilů a monocytů uvolňují enzymy a růstové faktory [15]. Proliferativní fáze je charakterizována tvorbou granulační tkáně, neovaskularizací, reepitelizací, ukládáním kolagenu a kontrakcí rány. Během proliferativní fáze se postupně zvyšuje množství fibroblastů, zánětlivých buněk a endoteliálních buněk a také dochází k obnově kožních adnex [16, 17].



Obrázek 2: Fáze hojení ran, upraveno dle [18]

Během hojení ran dochází k postupné obnově poškozené tkáně, přičemž výsledkem tohoto procesu může být vznik jizvy. Jizva je tvořena vláknitou tkání bohatou na kolagen, která vzniká zejména během remodelační fáze, kdy dochází k reorganizaci a zpevnění kolagenových vláken. Tento proces zajišťuje pevnost a stabilitu tkáně, avšak často na úkor její původní funkčnosti a elasticity [15, 16, 19].

Běžná doba hojení ran je přibližně 2–3 dny [20]. Během ranných fází hojení kožních ran se imunitní buňky shromažďují v místě rány za účelem odstranění poškozené tkáně a vnějších patogenů. Současně se v místě poranění uvolňují růstový faktor odvozený od destiček (PDGF) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), který přitahuje endoteliální buňky do spodiny rány a stimuluje tvorbu nových krevních cév. Nové krevní cévy dodávají kyslík a živiny a hrají důležitou roli při odstraňování metabolického odpadu [21].

Ovšem jakékoli narušení vnějšími nebo vnitřními faktory v kterékoli z výše uvedených fází hojení ran může prodloužit hojení a vést ke vzniku chronické rány [22]. Mezi nejčastější vlivy patří zejména infekce, jelikož rány jsou velmi snadno kontaminovány bakteriemi [15]. Léčba akutních traumat se zaměřuje především na zastavení krvácení, prevenci poškození cév a infekcí [23].

Na rozdíl od akutních ran, hojení chronických ran je obtížné a doba potřebná k jejich opravě se prodlužuje [16]. Chronická rána je definována jako kožní rána, u které dlouhodobě (déle než 3 měsíce) nedochází k obnově normální struktury a funkce tkáně. Je spojena s pokračujícím zánětem, silným oxidačním stresem a opožděnou reepitelizací, což má za následek chronické zhoršování procesu hojení a v konečném důsledku neléčitelné rány. Často

se projevuje u pacientů s diabetem, arteriálními, žilními a tlakovými vředy [22]. Nevhodná léčba chronických ran vede ke snížení fyzické aktivity pacienta a může vést až k amputaci postižených končetin [24].

1.1.2. Růstové faktory v hojení ran

Jak bylo zjištěno, zhoršené hojení chronických ran je spojeno se sníženou sekrecí endogenních růstových faktorů. Proto by poskytování exogenních růstových faktorů v přesně načasovaných intervalech poskytlo stimulaci k rychlejší reepitelizaci, snížilo riziko infekce a přispělo k odstranění abnormalit v procesu hojení [7, 8]. Z těchto důvodů se začalo zkoumat mnoho růstových faktorů, jako je růstový faktor odvozený od destiček (PDGF), epidermální růstový faktor, transformující růstový faktor β (TGF- β), fibroblastový růstový faktor (FGF), inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) [7, 20, 25].

Růstové faktory jsou ve vodě rozpustné proteiny mající schopnost regulovat mnoho buněčných procesů a jsou klíčové pro koordinaci interakcí buňka-buňka i buňka-mezibuněčná hmota během fyziologického hojení poranění [26]. Např. TGF- β hraje klíčovou roli při hojení ran tím, že reguluje ukládání ECM, moduluje imunitní reakce a podporuje proliferaci buněk, ovšem jeho nadměrná exprese může podporovat jizvení [27]. VEGF je hlavní proangiogenní faktor, stimuluje proliferaci endoteliálních buněk a zvyšuje permeabilitu cév [25]. FGF, zejména FGF-2, podporuje proliferaci buněk spojených s procesem hojení, angiogenezi a je znám svými protijizvicími vlastnostmi [25, 28]. PDGF usnadňuje různé biologické mechanismy, jako je buněčná migrace, proliferace, přežívání, syntéza složek ECM a chemotaxe [29, 30]. IGF-1 podporuje proliferaci a migraci keratinocytů a fibroblastů, syntézu kolagenu, epitelizaci a remodelaci tkání. Kromě toho podporuje angiogenezi, reguluje vaskulární reakce a moduluje zánětlivé reakce, čímž udržuje buněčnou homeostázu [31, 32].

Aktuálně schválené GF (alespoň v jedné zemi světa, v roce 2025) k hojení chronických ran, zejména diabetických vředů, jsou PDGF (konkrétně PDGF-BB) ve formě topického gelu nebo masti, EGF ve formě injekce, spreje nebo masti, a bazický FGF (bFGF) ve formě injekce do léze [2, 3, 28, 33–35]. Mimo hojení ran se užívají také přípravky s keratinocytovým růstovým faktorem (KGF) k léčbě zánětů ústní sliznice u pacientů s maligním hematologickým onemocněním [36]. A v hematonekologii se využívá faktor stimulující růst kolonií granulocytů a makrofágů (GM-CSF) [38].

Daleko více používané je však dodávání endogenních růstových faktorů ve formě autologní plazmy bohaté na krevní destičky (PRP) a to jak u chirurgických ran, tak při hojení

těch chronických. Aktivované krevní destičky v PRP mohou uvolňovat řadu růstových faktorů a cytokinů, včetně PDGF, bFGF, VEGF, IGF-1, TGF- β a dalších, které se podílejí na podpoře obnovy a regenerace tkání [38, 39]. V České republice se PRP využívá na mnoha pracovištích s různým zaměřením terapie již po více než desetiletí [40].

1.1.3. Epidermální růstový faktor

Aktivní EGF je malý jednořetězcový polypeptid o velikosti přibližně 6 kDa, složený z 53 aminokyselin. Vzniká proteolytickým štěpením svého prekurzoru, pro-EGF, který je ukotven v buněčné membráně [9, 41, 42]. Ve své struktuře má 6 cysteinových intramolekulárních zbytků, které vytvářejí 3 disulfidové vazby, stabilizující smyčky A, B a C, které jsou nezbytné pro jeho biologickou aktivitu [43]. EGF je hydrofilní a tepelně stabilní polypeptid, avšak náchylný k proteolytické degradaci. Jeho poločas rozpadu v těle se pohybuje kolem 2 až 3 hodiny [44, 45, 46]. EGF má izoelektrický bod přibližně 4,6, což znamená, že za fyziologických podmínek (pH ~ 7) nese záporný náboj [47].

Existují další příbuzné růstové faktory, které dohromady s EGF tvoří rodinu růstových faktorů EGF. Každý z nich sdílí alespoň jednu doménu podobnou EGF a společně se vážou na EGF receptor, známý také jako HER1/ErB1. Jedná se o heparin-vázající EGF, transformující růstový faktor α , amfíregulin, epiregulin, betacelulin, epigen a neureguliny [48, 49, 50].

EGF je vylučován především krevními destičkami, makrofágy a fibroblasty a působí parakrinně na keratinocyty [13]. Detekovatelné hladiny EGF můžeme nalézt v různých tkáňových extraktech a tělesných tekutinách, včetně plodové vody, mléka, slin, obsahu žaludku a dvanáctníku, pankreatické šťávy, žluči a moči [51, 52].

Hlavním mediátorem biologických účinků EGF je jeho receptor EGFR, což je transmembránový glykoprotein patřící do rodiny tyrosinkináz [53, 54]. Kromě EGFR tato skupina zahrnuje další receptory: HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) a HER4 (ErbB4) [54, 55]. EGFR má hmotnost ~170 kDa a skládá se z extracelulární, transmembránové a intracelulární cytoplazmatické domény, která se dále dělí na tyrosinkinázovou doménu a C-terminální ocásek [54, 56]. Ligandy se vážou na extracelulární oblast receptoru, která se skládá ze čtyř poddomén (I–IV). Tato vazba spouští dimerizaci receptoru, aktivuje jeho tyrosinkinázovou aktivitu a zahajuje signální transdukční kaskády, které ovlivňují široké spektrum biologických procesů [45, 53, 56].

EGF prostřednictvím EGFR hraje klíčovou roli v regulaci růstu, diferenciaci a přežívání buněk [10, 13]. Tato funkce je zásadní nejen při hojení a regeneraci poškozených tkání, ale i při vývoji orgánů během embryogeneze a udržování homeostázy v dospělých tkáních [10, 13,

44]. V procesu hojení ran podporuje proliferaci keratinocytů a fibroblastů, které jsou klíčové pro obnovu epidermis a tvorbu ECM [10]. Zároveň stimuluje migraci buněk do místa poranění, což urychluje uzavření rány a reguluje produkci růstových faktorů a cytokinů, jež koordinují zánětlivou a regenerační fázi hojení [10, 13, 57]. EGF také snižuje apoptózu v poškozených tkáních, podporuje tvorbu granulační tkáně a neovaskularizaci, což jsou další klíčové procesy pro efektivní hojení ran [44, 57, 58].

Na druhou stranu dysregulace dráhy EGF/EGFR významně přispívá k rozvoji mnoha typů rakoviny [53]. Konkrétně hyperaktivace dráhy podporuje nádorovou proliferaci, inhibuje apoptózu a usnadňuje invazivní růst a metastazování [59]. Proto je EGFR klíčovým cílem v onkologické léčbě [53].

Rekombinantní epidermální růstový faktor

Lidský EGF (hEGF) označuje přirozeně se vyskytující růstový faktor v lidském organismu. Kvůli neúspěšným pokusům o izolaci dostatečného množství hEGF z moči se začal využívat rekombinantní lidský EGF (rhEGF) získávaný pomocí rekombinantní DNA technologie [45, 60]. Pokroky v technologiích genové rekombinace umožňují velkou produkci rhEGF s vhodnou čistotou a bezpečností pro experimentální i klinické použití [44].

Nejpoužívanějším a nejuniverzálnějším systémem pro výrobu rhEGF zůstává bakterie *Escherichia coli*, protože umožňuje snadnou genetickou modifikaci, rychlou expresi proteinů a vysokou rychlost růstu. rhEGF je navíc biologicky aktivní i bez posttranslačních modifikací a není tak nutné využití složitějších eukaryotických systémů [61, 62]. Vzhledem k strukturnímu uspořádání EGF však může rekombinantní produkce v prokaryotických systémech vést k problémům, jako je nesprávné sbalování proteinu, tvorba inkluzních tělísek, neshoda disulfidových vazeb a dalším omezením. *E. coli* se však geneticky modifikuje a podmínky produkce se zdokonalují, aby se těmto problémům předešlo [63].

1.1.4. Nanomateriály s růstovými faktory

Terapeutické využití volných růstových faktorů je značně omezené, protože mohou být snadno degradovány proteinázami přítomnými v prostředí rány nebo odstraněny exsudátem dříve, než se dostanou do lůžka rány [8]. Kromě toho mají nízkou stabilitu a krátký biologický poločas [16]. Aby zůstaly růstové faktory v terapeutickém okně (rozmezí mezi účinnou a toxickou dávkou léčiva), byly by potřebné vysoké a opakované dávky, což však vede k problémům s toxicitou [16, 23]. Vysoké plazmatické hladiny některých GF navíc bývají spojovány s rizikem rozvoje některých druhů rakoviny nebo metastazováním již přítomných

malignit [64, 65]. K ochraně růstových faktorů před enzymatickou či tepelnou degradací a k udržení jejich účinné koncentrace v místě působení se inkorporují do systémů cíleného dodávání léčiv [9, 66].

Systémy cíleného dodávání léčiv zajišťují nejen kontrolované dávkování a ochranu těchto molekul, ale také zlepšení přenosu léčiva přes kůži a membrány, jehož by některá léčiva nebyla schopná, kvůli faktorům jako jsou velká molekulová hmotnost, špatná propustnost membrán a hydrofilní charakter látky [23, 44].

Většina vývoje současných systémů dodávání léků není schopna podporovat všechny fáze hojení ran [67]. Ideální systém dodávání růstových faktorů k hojení ran by měl zajišťovat časoprostorové dodávání více růstových faktorů v přirozených dávkách a reagovat na určité stimuly (např. změnu pH) a lépe tak simulovat jednotlivé fáze procesu hojení ran [26, 67].

Běžně používané materiály k tvorbě nosičů GF k hojení jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled běžných materiálů k tvorbě nosičů růstových faktorů

Kategorie materiálu	Příklad	Zdroj
Přírodní polymery	Chitosan, hyaluronan, alginát, kolagen, želatina, dextrin, fibrin	[7], [25], [30], [46], [68], [69], [70], [71]
Syntetické polymery	poly(mléčno-glykolová kyselina) (PLGA), polyethylenglykol (PEG), polykaprolakton (PCL)	[68], [69], [72]
Anorganické materiály	Oxid křemičitý, hydroxyapatit, kovy (zlato, stříbro)	[73], [74], [75]
Lipidy	Liposomy, transferosomy, pevné lipidové částice	[44], [76]

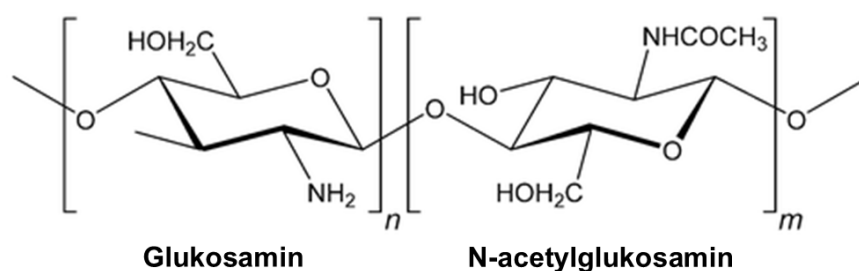
1.2. Nosičové systémy z chitosanu

Chitosan se díky svým vlastnostem hojně využívá v nanotechnologiích, zejména jako nosič pro dodání různých terapeutických látek [77]. Tento biopolymer lze snadno formovat do různých matric, jako jsou nano/mikročástice, filmy, hydrogely, vlákna či tzv. skafoldy [12, 77–79].

1.2.1. Chitosan

Chitosan je přírodní lineární polysacharid získávaný částečnou alkalickou N-deacetylací chitinu, který se běžně získává zejména z exoskeletu různých členovců [77, 80]. Strukturně se CS skládá z opakujících se jednotek N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glukosy (N-acetylglukosamin) a 2-amino-2-deoxy-D-glukosy (glukosamin), které jsou propojeny β -(1 \rightarrow 4) glykosidovými vazbami [13, 77]. Jeho struktura je znázorněna na obrázku 3. Důležitá je přítomnost jedné volné reaktivní aminoskupiny (-NH₂) a dvou hydroxylových skupin (-OH) v každé monomerní jednotce, což zprostředkovává řadu chemických reakcí a usnadňuje jeho modifikace [81, 82].

Proces deacetylace zahrnuje odstranění acetylové skupiny z N-acetylglukosaminových jednotek v molekulárním řetězci chitinu, čímž vzniká glukosamin obsahující aminoskupinu (-NH₂). Stupeň deacetylace (DD) je klíčovým parametrem CS, který udává molární procento glukosaminových monomerních jednotek a pohybuje se od 0 % (chitin) do 100 % (plně deacetylovaný chitosan) [80, 82].



Obrázek 3: Chemická struktura chitosanu, upraveno dle [80]

CS je charakterizován jako polymer s DD >50 % [82]. Komerčně dostupné chitosany vykazují DD obvykle okolo 70–90 % [83] a rozsah molekulových hmotností mezi 10 a 500 kDa [84]. Pro specifické aplikace lze připravit i CS s hodnotami DD >95 % [85]. Právě molekulová hmotnost (odvíjející se od stupně polymerace) a DD značně ovlivňují fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti CS [84, 86].

CS má amfolytický charakter, díky čemuž je jeho chování závislé na pH prostředí [79]. V kyselých vodných roztocích s pH nižším než 6,5 (pod jeho disociační konstantou pK_a) se volné aminoskupiny protonují a způsobují, že CS získává vysoký kladný náboj a rozpouští se. Při neutrálním nebo alkalickém pH však CS přechází do neutrální až záporně nabitě formy, což vede k jeho nerozpustnosti. Kladný náboj mu umožňuje interakci s negativně nabitými polyaniontovými molekulami (jako jsou DNA, RNA, proteiny nebo fosfolipidy), buněčnými membránami a zprostředkovává antibakteriální účinek [10, 79, 84, 87, 96]. Právě jeho citlivost

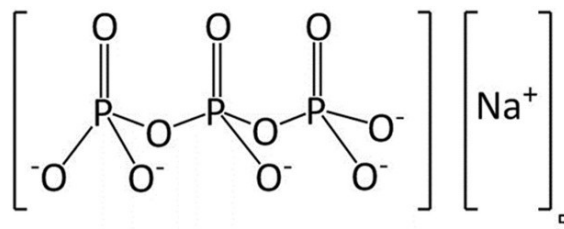
na změny pH je jednou z vlastností, která jej činí vhodný základ pro inteligentní stimulačně reagující nosičové materiály [88].

CS se využívá v celé řadě oblastí, včetně farmacie [77], biomedicíny [84], potravinářství [84], zemědělství [89], kosmetiky a dalších [80]. Je biokompatibilní, biodegradabilní, netoxický, neimunogenní a vykazuje antibakteriální, mukoadhezivní a hemostatické vlastnosti. Tyto schopnosti jej činí vynikající volbou pro systémy dodávání léčiv [13, 80, 89].

Antimikrobiální, antioxidační a protirakovinné vlastnosti jej činí cenným pro vývoj terapeutických systémů zaměřených na léčbu infekcí nebo nádorů [10, 13, 87]. CS také podporuje regeneraci tkání, urychluje hojení ran a zlepšuje granulační proces [16, 90]. Vzhledem k těmto vlastnostem se stále častěji využívá v bioaplikacích, včetně tkáňového inženýrství, biozobrazování, hojení ran a vývoji nanokompozitů pro různé další terapeutické účely [12, 77, 84].

1.2.2. Tripolyfosfát sodný

Tripolyfosfát sodný (TPP) s chemickým vzorcem $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ je anorganická sloučenina patřící mezi polyfosforečnany. Skládá se ze tří fosfátových skupin propojených do polyaniontové struktury (viz obrázek 4), která vykazuje výjimečné chelatační vlastnosti. Díky nim TPP efektivně váže kovové ionty a zvyšuje rozpustnost látek, což jej činí klíčovým v různých průmyslových a vědeckých aplikacích [91, 92].



Obrázek 4: Vzorec tripolyfosfátu sodného [93]

Ve vodném roztoku se TPP disociuje na sodné ionty (Na^+) a tripolyfosforečnanové anionty ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$). Tato vlastnost umožňuje vytváření vodíkových vazeb a elektrostatických interakcí, což jej předurčuje k použití jako síťovacího činidla, například v kombinaci s biopolymery, jako je právě chitosan [88, 94]. Vodný roztok TPP je navíc dlouhodobě stabilní, netěkavý při zvýšených teplotách, levný a dostupný [95].

TPP je dále široce používán jako aditivum s aplikacemi sahajícími od potravinářských konzervačních látek až po maziva používaná v keramickém průmyslu. V masném průmyslu se hojně využívá jako činidlo vázající vlhkost [91]. TPP se také používá v různých čisticích

prostředcích, dále jako zpomalovač a disperzní činidlo v cementových formulacích, či jako inhibitor koroze železa [93, 95, 97].

TPP je netoxická a dobře rozpustná sloučenina, která díky svým antimikrobiálním účinkům může sloužit jako antimikrobiální činidlo [91, 95].

1.2.3. Částice

Chitosanové částice je možné připravit v širokém rozsahu velikostí, od nanometrů po mikrometry. Částice s velikostí v rámci mikrometrů nazýváme mikročástice [98]. Submikročástice obvykle označují částice s velikostí 100 nm až 1 μ m [99]. Menší částice v rozsahu 1–100 nm se již označují jako nanočástice (NP) [100]. V biomedicínských aplikacích se však často všechny částice menší než 1 μ m nepřesně označují jako nanočástice [30, 77, 81, 87, 101, 102].

Jednoduché částice

Chitosanové částice s jednoduchou strukturou tvořené pouze z chitosanu nebo jeho derivátů, popřípadě jejich kombinací se síťovacím činidlem se tvoří různými metodami. Jedná se např. o metody, jako je emulzní zesíťování, koacervace a precipitace, sušení rozprašováním ionotropní gelace a další [13, 77].

Nejrozšířenější metodou přípravy je ionotropní gelace, protože její proces je jednoduchý, mírný, snadno ovladatelný, bez použití organických rozpouštědel a vysokých teplot [87]. Tato metoda využívá záporně nabitě sloučeniny jako síťovací činidla [77]. Typicky se jedná o malé vícenásobně nabitě aniontové molekuly, jako jsou sulfáty, citráty a fosfáty [102]. Nejčastěji používaným činidlem je však TPP díky své bezpečnosti a multivalentním vlastnostem [77]. Samotný proces spočívá ve spontánní reakci chitosanu se síťovacím činidlem TPP za vzniku polyelektrolytového komplexu CS/TPP [103]. Tento komplex je stabilizován elektrostatickou interakcí mezi kladně nabitými aminoskupinami CS a záporně nabitými skupinami TPP, což vede k trojrozměrnému propletení, které se z vodného roztoku vysráží ve formě gelovitých částic [77, 103]. Schéma přípravy těchto částic je znázorněno na obrázku 5.



Obrázek 5: Příprava částic CS/TPP, upraveno dle [104]

Částice CS/TPP jsou stabilní, mající velikost obvykle v řádu desítek až stovek nanometrů, umožňují širokou škálu modifikací, zachytávání různých bioaktivních látek a následné pokrytí jednou či více vrstvami jiných materiálů, což rozšiřuje jejich funkční vlastnosti [87, 101, 105].

Vrstvené částice

Vrstvené chitosanové částice mají složitější strukturu, která se skládá z několika vrstev. Tyto částice se nejčastěji syntetizují pomocí techniky vrstva na vrstvu (layer-by-layer), při níž se chitosanové vrstvy střídají s aniontovými polyelektrolyty, jako je např. alginát, heparin, chondroitin sulfát nebo kyselina hyaluronová (HA) [105–107]. Takto mohou být pokrývány vrstvami jednoduché chitosanové částice, ale tato technika může být také využita k pokrytí vrstev pevného jádra, například tvořeného oxidem křemičitým, liposomy nebo polystyrenem. Toto jádro může být poté odstraněno například působením změny pH nebo vhodného rozpouštědla, čímž vznikají duté kapsle [106–108].

Tvorba stabilních, funkčních vícevrstevných částic je založena primárně na elektrostatických interakcích, které jsou často doplněny vodíkovými vazbami a hydrofobními interakcemi [105, 108]. Pro zvýšení stability mezivrstvy se využívají strategie zesíťování, například s použitím glutaraldehydu nebo genipinu. Jednotlivé vrstvy lze připravit procesem nástřiku nebo namáčení, což umožňuje kontrolu nad tloušťkou a uniformitou vrstev [107, 109, 110].

Aplikace vrstvených CS částic se silně zaměřují na dodávání léčiv, přičemž studie ukazují systémy reagující na pH nebo podněty pro místně specifické uvolňování látek. Jejich složitější

struktura poskytuje vyšší kontrolu nad jejich funkcí, což je činí vhodnými pro pokročilé terapeutické strategie (např. při onkologické léčbě) [105, 106].

Obalované částice

Chitosanové částice mohou být pokryty ochranným obalem, který je chrání před degradací a imunitním systémem, modifikuje jejich povrchové vlastnosti nebo umožňuje cílené dodávání léčiv na konkrétní buňky [111, 112]. Nejčastějšími materiály pro tvorbu obalů jsou alginát, PEG, kyselina hyaluronová a lipidy [112–115]. Tvorba obalů probíhá většinou po samotné přípravě částic nejčastěji metodami založenými na iontových a elektrostatických interakcích [115].

Např. chitosanové částice potažené alginátem ochraňují částice a zachycená léčiva před kyselým pH v žaludku při perorálním podání [111]. Obaly z kyseliny hyaluronové se využívají pro cílení na buňky nadměrně exprimující CD44 (často prostředí rakoviny), což prokazuje zlepšenou akumulaci a dodávání léčiv [116]. Částice s obalem tvořeným PEG mohou zvýšit dobu cirkulace v organismu tím, že omezují adsorpci sérových proteinů na jejich povrchu [117].

Naopak chitosan je sám také hojně využíván jako materiál k obalení částic z jiných materiálů a tím může zlepšit jejich biokompatibilitu, povrchové vlastnosti či umožnit orální podání [118, 119].

1.2.4. Nanovlákna

Nanovlákna nebo mikroskopické formy vláken CS jsou fibrilární vlákna o průměru od několika desítek až několik stovek nanometrů. Metoda elektrostatického zvlákňování (elektrospinning) je běžnou metodou pro jejich přípravu, zejména díky výhodám, jako je laditelný průměr a velikost pórů nebo zajištění morfologické podobnosti vláken s ECM [78]. Během elektrostatického zvlákňování je roztok polymeru posouván injekční stříkačkou s jehlou na konci, kde se vytváří Taylorův kužel (kuželovitě tvarovaný objem tekutiny). Mezi jehlou a kolektorem vzniká úbytek napětí, který vytahuje polymerní roztok do jemných vláken, které se poté zpevňují [120, 121].

Chitosanová nanovlákna mají relativně vysoký poměr specifického povrchu k objemu, pórovitost a unikátní chemické a fyzikální vlastnosti, které vyplývají z jejich jedinečné struktury [78, 120]. Protože se však chitosan rozpouští pouze v kyselém vodném roztoku a jeho roztok je kationtový polyelektrolyt, dochází při elektrospinningu k velkým odpudivým silám mezi kladně nabitými skupinami, což brání tvorbě vláken [78]. Pro zlepšení elektrospinnovatelnosti chitosanu se využívají přístupy, jako je použití kyseliny trifluoroctové, smíchání s aniontovým polyelektrolytem (např. kyselinou hyaluronovou) nebo smíchání s

hostitelskými polymery, jako je polyvinylalkohol, poly(ethylenoxid) a želatina, které jsou atraktivní zejména pro biomedicínské aplikace. Nanovlákná mají široké využití např. pro řízené uvolňování léčiv, hojení ran či potravinářství a filtraci látek [78, 120]. Navíc díky zmíněné podobnosti s ECM rovněž slouží jako tzv. skafoldy, které usnadňují adhezi a proliferaci buněk a nacházejí uplatnění zejména v tkáňovém inženýrství [29].

1.2.5. Hydrogely

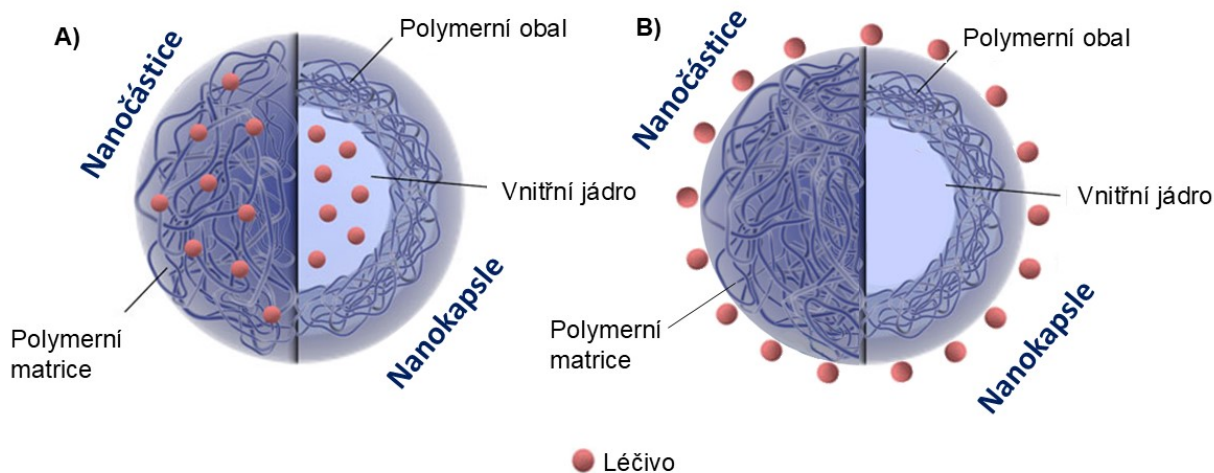
Hydrogel je trojrozměrná makromolekulární síť hydrofilních polymerních řetězců tvořící koloidní gel, který je schopný zadržovat velké množství vody, přičemž zůstává nerozpustný. Část této vody je pevně vázána na polymer a zbytek je přítomen jako volná voda, jejíž množství se pohybuje od 10 % do tisícinásobku jejich vlastního objemu [10, 122]. Chitosanové hydrogely, vytvořené fyzikálním nebo chemickým zesítním, vykazují řadu výhodných vlastností, včetně biokompatibility, antimikrobiální aktivity, nízké degradability a schopnosti reagovat na podněty prostředí (např. pH, teplota) [122–124].

CS má schopnost vytvářet gel buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými sloučeninami [125]. Tyto hydrogely nacházejí významné uplatnění jako obvazové materiály podporující hojení ran a popálenin, protože vytvářejí vlhké prostředí, mohou absorbovat exsudáty s vysokým přísunem kyslíku, poskytnout tepelnou izolaci a umožnit migraci a proliferaci buněk [10, 126]. Struktura hydrogelů s inkorporovanými bioaktivními látkami, zejména GF, navíc umožňují jejich řízené uvolňování a ochranu před degradací [122].

Do těchto hydrogelů je také možno začlenit připravené částice a získat tak kompozitní gely, které kombinují vlastnosti hydrogelu a přidaných částic a mohou zlepšit jeho mechanické vlastnosti [127]. Byly také vyvinuty *in situ* gelující injekční hydrogely, které nejen usnadňují zachycení terapeutických léčiv, ale také umožňují úplné vyplnění oblasti rány [10].

1.3. Vazba látek s nosiči

Chitosanové nosiče se využívají jako systémy pro řízené uvolňování léčiv, jelikož mají schopnost vázat různé hydrofilní i hydrofobní látky, včetně NK, proteinů a peptidů (jako jsou i GF), fosfolipidů a dalších molekul [77, 128]. Tyto nosiče umožňují inkorporovat účinné látky do své vnitřní struktury nebo je adsorbovat na jejich povrch. Např. v případě chitosanových částic lze na základě distribuce účinné látky rozlišovat kapsle nebo sférické částice [129].



Obrázek 6: Možnosti vazby látek s částicemi, převzato z [130] a upraveno dle [117]

1.3.1. Zachycení

Zachycení (entrapment) je proces při kterém je bioaktivní látka fyzicky uzavřena uvnitř polymerní matrice nosiče při jeho formaci. Tento princip se uplatňuje u různých typů nosičů. U nanovláken je zachycení zprostředkováno jednoduchým směsným elektrospinningem, které je založeno na smíchání molekul látek s polymerním roztokem před procesem elektrospinningu a tím vytvoření hybridního nanovlákná. Tento typ vazby vykazuje ve srovnání s fyzikální adsorpcí stabilnější profily uvolňování látek, avšak nevýhodou je, že roztok s léčivem musí zachovat schopnost zvláknování [120, 128].

U hydrogelů je samotný proces obdobně jednoduchý – bioaktivní látka se rozpustí v roztoku polymeru, který později vytvoří gel. Nicméně špatná rozpustnost některých látek ve vodném prostředí může vést k nízké míře zatížení hydrogelu léčivem (obvykle pod 10 %), což omezuje jejich praktické využití [131].

Dalším typem nosiče schopným zachytit do své struktury mnohé bioaktivní látky jsou CS částice připravené např. ionotropní gelací, které díky již zmíněným šetrným podmínkám přípravy zamezují možnosti denaturace a zachovávají stabilitu látek i po uvolnění [128, 132]. Léčivo je při přípravě rozpuštěno nebo dispergováno v roztoku polymeru a následně fyzikálně zachyceno v polymerní síti po přidávání TPP [132]. Takto vzniklé částice jsou znázorněny na levé straně obrázku 6A.

Tato metoda poskytuje vysokou účinnost vazby. Např. Hashemi et al. (2023) ve své práci uvádí, že účinnost zachycení EGF ve struktuře částic CS/TPP byla přibližně 70 % [13]. Yadav P. a Yadav A. B. (2021) prokázali účinnost navázání bovinního sérového albuminu (BSA) jako modelového proteinu dokonce >90 % [128]. Účinnost zachycení je závislá na mnoha faktorech jako je např. koncentrace chitosanu, koncentrace proteinu, hmotnostní poměr CS a TPP a pH

roztoku chitosanu [132]. Tento druh vazby sice může vykazovat mírné počáteční explozivní uvolňování, ale následně může poskytnout pomalé uvolňování bílkovin po delší dobu, což je výhodné např. pro podávání vakcín a bílkovinných léčiv používaných při chronických onemocněních [133].

1.3.2. Enkapsulace

Enkapsulace spočívá v izolaci a ochraně aktivních látek (pevných, kapalných nebo plyných) před okolním prostředím uvnitř obalů o velikosti nano- či mikrometrů tvořených např. z polymerních materiálů. Vznikají tak nosiče s vnitřním jádrem, ve kterém je tato látka obsažena. Vzhledem k ochranným účinkům materiálů obalu a zvětšeným povrchovým plochám se enkapsulace hojně využívá pro potenciální doručovací systémy ke zvýšení rozpustnosti, stability a absorpce bioaktivních látek pro řízené a cílené uvolňování [134, 135].

V případě nanovláken se enkapsulace látek provádí při tzv. koaxiálním elektrospinningu, kdy nanovláknata se strukturou jádro-plášť vznikají koaxiálním a současným elektrospinningem dvou roztoků (tj. roztoku polymeru a roztoku léčiva) v jedné jehle. Profil uvolňování látek z těchto vláken zahrnuje počáteční nárazové uvolňování a fázi trvalého uvolňování. V porovnání se směsným elektrospinningem je však uvolňování stabilnější a nižší. Vzhledem ke složitosti tohoto procesu se však v oblasti podávání léčiv používá velmi zřídka [120].

Enkapsulace v hydrogelech se uplatňuje spíše formou hydrogelových mikro/nanočástic, formou kompozitních gelů s kapslemi nebo částicemi v hydrogelové matici, případně tvorbou vícevrstevných hydrogelových struktur [131]. U samotných kapslí se látky zachycují metodami jako je ionotropní gelace, emulzní techniky, koacervace a další. Pro získání částic se složitějšími vlastnostmi se může využít i technika vrstva na vrstvu [105, 107, 134]. Zachycení látek v jádru kapsle je znázorněno na pravé straně obrázku 6B.

Takovéto kapsle mohou vykazovat vysokou účinnost enkapsulace. B. Koppolu a D. Zaharoff (2014), kteří používali jako modelový antigen ovalbumin a BSA a dosáhli účinnosti enkapsulace >90 % [136]. Uvolňování materiálu jádra bývá ovlivněno především degradací struktury částic, proto tento druh vazby nevykazuje vysoké počáteční explozivní uvolňování, což může být žádoucí pro aplikace vyžadující kontrolované a prodloužené uvolňování účinné látky a minimalizaci toxicity [117, 134].

1.3.3. Adsorpce

Adsorpce je povrchový exotermický proces, při kterém se molekuly sloučeniny v plynném nebo kapalném stavu hromadí na povrchu adsorbentu. Adsorpce molekul na povrch

může probíhat dvěma způsoby, kterými jsou fyzikální adsorpce a chemická sorpce, v závislosti na interakcích mezi molekulami a povrchem. Při fyzikální adsorpci se uplatňují slabé síly, jako jsou elektrostatické interakce a Van der Waalsovy síly. Při chemické adsorpci vznikají mezi povrchem a adsorbovanými molekulami silné chemické vazby, jako jsou kovalentní vazby [137].

Chitosanové částice mají díky svému pozitivnímu povrchovému náboji schopnost interagovat se záporně nabitými molekulami, kam patří např. většina proteinů, pomocí elektrostatických interakcí. To je nežádoucí v případě adsorpce sérových proteinů a tím tvorby proteinového obalu částic v organismu, ovšem v rámci tvorby nosičů se tohoto jevu využívá [117]. V tomto případě se protein či jiná molekula váže na povrch částic až po jejich přípravě při společné inkubaci látek s částicemi. Adsorpce je obvykle reverzibilní a k desorpci látky dochází hned po kontaktu s médiem a proto se jí využívá, když je potřeba rychlého uvolňování látky nebo když není žádoucí zásah do struktury částic [117, 133].

U elektrospínovaných vláken představuje fyzikální adsorpce nejjednodušší a nejčastěji využívaný způsob vazby různých látek. Tento přístup lze využít také pro vázání látek na připravené hydrogely. Tato strategie spočívá v ponoření vláken či gelů do vodné fáze obsahující danou látku (jako čistý roztok nebo emulze). Látka se na povrch váže prostřednictvím elektrostatických interakcí, přičemž ale tento přístup bývá spojen s nekontrolovaným profilem uvolňování. Mimo to je možné využít i chemických vazeb a látky k nosičům kovalentně imobilizovat [120, 138].

1.4. Charakterizace částic s proteiny

Vlastnosti částic jsou klíčové pro jejich využití v biomedicínských aplikacích, jako je cílené podávání proteinových či peptidových léčiv. Faktory jako velikost, náboj, distribuce velikosti, stabilita a povrch částic určují jejich biodistribuci v těle, interakce s buňkami a vytváření proteinových obalů, což ovlivňuje jejich funkci a toxicitu. Charakterizace částic je proto nezbytná nejen pro zajištění optimální účinnosti, ale i bezpečnosti [81, 139].

1.4.1. Hydrodynamická velikost a polydisperzní index

Hodnoty hydrodynamické velikosti a indexu polydisperzity (PDI) se běžně analyzují pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) [44]. DLS je široce používanou a preferovanou technikou při charakterizaci částic v jednoduchém rozpouštědle nebo biologickém prostředí. Tato metoda umožňuje neinvazivní a rychlou analýzu vzorků v přirozeném koloidním stavu,

což minimalizuje manipulaci a přispívá k reprodukovatelnosti a statistické významnosti výsledků [139].

Při DLS se suspenze částic osvětluje monochromatickým laserem a intenzita rozptýleného světla se zaznamenává pomocí detektoru fotonů při pevném nebo proměnném úhlu rozptylu (v úhlu 90°, 173° nebo 13°). Intenzita rozptylu je při pozorování v mikrosekundovém měřítku závislá na čase v důsledku Brownova pohybu částic. Brownův pohyb je náhodná rotace částic způsobená narážením molekul rozpouštědla v okolí částic. Čím větší částice, tím menší pohyb a naopak [140, 141].

Hydrodynamický průměr částic

Vypočítaný hydrodynamický průměr částic získaný pomocí DLS představuje průměr hypotetické koule [142]. Tento parametr označuje efektivní velikost částic, která zahrnuje hydratační vrstvy a povrchové obaly částic. V důsledku toho bývá hydrodynamický průměr obvykle vyšší než fyzická velikost částic měřená metodami, jako je elektronová mikroskopie, která se zaměřuje pouze na pevné jádro částic [143, 144].

Hydrodynamická velikost chitosanových částic se po začlenění proteinu většinou zvyšuje, což souvisí s jejich fyzikální inkorporací do polymerní sítě nebo adsorpcí na povrch částic. Výsledná velikost pak závisí na vlastnostech konkrétního proteinu, zejména na jeho koncentraci, velikosti, izoelektrickém bodě a způsobu zapouzdření [13, 128, 133]. Tento trend potvrzují i výsledky Yadav P. a Yadav A. B. (2021), kdy velikost částic bez proteinu činila $193,53 \pm 44,9$ nm a postupné zvyšování koncentrace BSA (0,5–1,5 mg) vedlo ke zvětšení velikosti částic na $234,2 \pm 50,27$ nm až $333,36 \pm 94,63$ nm. Další navýšení koncentrace BSA na 2 mg již nevykazovalo další nárůst velikosti [128].

V některých studiích však byl pozorován i opačný trend, tedy snížení velikosti částic po inkorporaci proteinu. Tento jev bývá vysvětlován zvýšením elektrostatických interakcí mezi negativně nabitým proteinem a kladně nabitým chitosanem, což vede ke vzniku kompaktnějších a menších částic [13, 132, 145].

Polydisperzní index

PDI je bezrozměrné číslo, které charakterizuje rozložení velikostí částic ve vzorku. Dává nám informaci o tom, zda je systém mono- či polydisperzní [141]. PDI se získává analýzou kumulantů a je definováno jako směrodatná odchylka rozdělení průměru částic dělená průměrným průměrem částic [146]. Ideální hodnota PDI by se měla co nejvíce blížit nule (0 znamená monodisperzní částice) [10].

Chitosanové částice se v závislosti na podmínkách přípravy dají připravit s relativně úzkou distribuční šířkou velikostí. Typické hodnoty PDI se pohybují v rozmezí 0,2–0,4 [87, 128, 145]. Při začlenění proteinu může dojít k nárustu i poklesu hodnoty PDI, jelikož toto číslo souvisí i se zmíněnými ději ovlivňujícími velikost částic [128, 145].

1.4.1. Zeta potenciál

Povrchový náboj částic vyjádřený jako zeta (ζ) potenciál rozhodujícím způsobem ovlivňuje interakci částic s okolím a může být použit k předpovědi dlouhodobé stability jejich disperzí a ke studiu jejich povrchových vlastností a souvisejících adsorpčních jevů [147].

Oblíbená metoda měření zeta potenciálu je založená na principu laserové dopplerovské elektroforézy a je známá také jako elektroforetický rozptyl světla (ELS). Jedná se o jednoduchou, snadnou a reprodukovatelnou techniku [147]. Při ELS se zeta potenciál odvozuje z elektroforetické pohyblivosti, která se měří rozptylem světla pohybujících se částic v elektrickém poli [148].

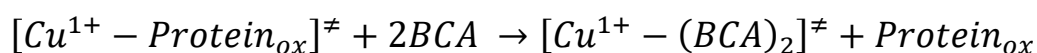
Chitosanové částice obvykle vykazují kladné hodnoty zeta potenciálu, které jsou způsobeny protonovanými aminoskupinami CS [132, 145]. Vysoký zeta potenciál je příznivý pro řízení rychlosti uvolňování léčiva, ovšem pro buňky může být toxický a je tak vhodný pro částice s jinak nízkou toxicitou, kterými CS částice obvykle bývají [132]. Inkorporace proteinu do těchto částic může ovlivnit jejich zeta potenciál v závislosti na povaze a náboji přidaného proteinu. Většina proteinů je negativně nabitá, což obvykle vede k poklesu zeta potenciálu částic, přičemž při nízkých koncentracích může být tento efekt minimální [13, 136, 145]. Například Hashemi et al. (2023) pozorovali pokles zeta potenciálu téměř o polovinu po přidání EGF do struktury částic [13]. Ovšem v některých případech mohou být zaznamenány i opačné efekty [128].

1.4.2. Stanovení množství proteinu

Metody stanovení množství proteinu jsou důležité z hlediska stanovení účinnosti zachycení proteinu v částicích a vazebné kapacity nosiče [145]. Pro tento účel lze využít různé analytické metody, které umožňují přesné měření množství proteinu v nanomateriálech. Mezi tyto metody patří spektrofotometrické testy, jako je Bradfordův test [132] a Bicinchoninový (BCA) test [145]. Kromě toho se využívá např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [9], enzymově spřažený imunosorbentní test (ELISA) [10], fluorescenční [145] nebo radioaktivní značky [12].

Jednou z nejpoužívanějších metod pro kvantifikaci obsahu proteinu v částicích je BCA test [149]. Jedná se o nepřímý test, kdy stanovujeme volný nenávaný protein v supernatantu [149, 150]. Princip testu vychází z biuretové reakce, při níž proteiny v alkalickém prostředí reagují s ionty mědi (Cu^{2+}), což vede k redukci Cu^{2+} na Cu^{1+} . V následujícím kroku ionty Cu^{1+} reagují s bicinchoninovou kyselinou za vzniku fialového komplexu [149]. Tento ve vodě rozpustný komplex vzniká konkrétně chelatací dvou molekul BCA s jedním měďnatým iontem (Cu^{1+}) (viz rovnice 1) a vykazuje silnou absorbanci při vlnové délce 562 nm, která je lineární se zvyšující se koncentrací proteinu [151].

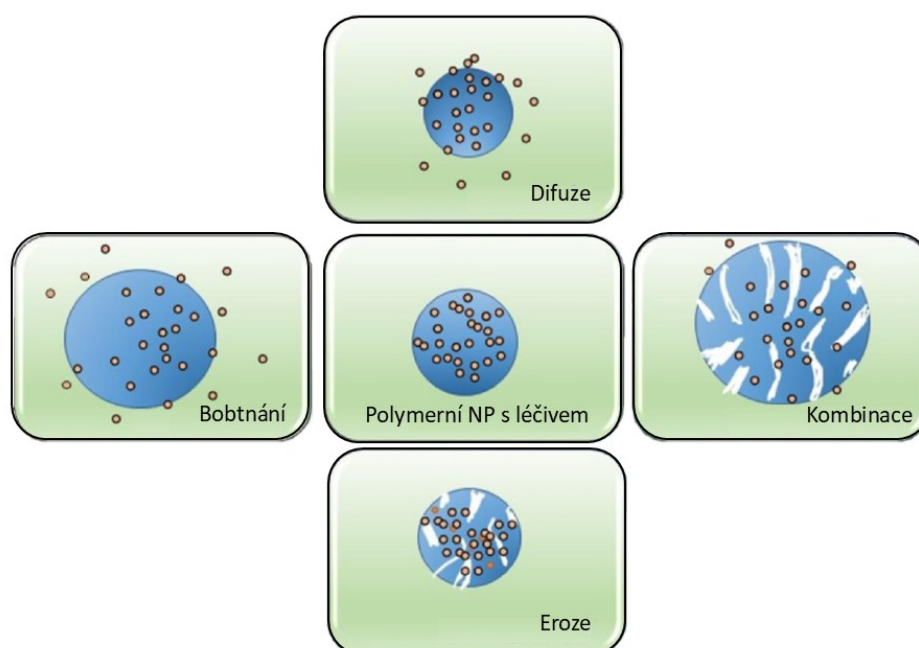
Tento test může být prováděn jak zkumavkou metodou, tak i v mikrotitrační destičce, což snižuje množství použitého vzorku a pracovních roztoků [149].



Rovnice 1: Reakce bicinchoninového testu, upraveno dle [149]

1.4.3. Kinetika uvolňování proteinů z částic a jiných forem

Kinetika uvolňování léčiv z částic je klíčovým parametrem, který ovlivňuje farmakologickou účinnost nosičového systému. Studium tohoto procesu umožňuje optimalizaci formulací, predikci chování léčiv *in vivo* a vývoj systémů s řízeným uvolňováním. Uvolňování léčiva z částic je ovlivněno bobtnáním polymeru, difuzí adsorbovaných materiálů, difuzí léčiva polymerní maticí, erozí nebo degradací polymeru a nebo jejich kombinací. Tyto mechanismy jsou znázorněny na obrázku 7 [117].



Obrázek 7: Mechanismy uvolňování látek z částic, upraveno dle [117]

Experimentální metody sledování uvolňování proteinů se typicky skládají z inkubace částic v modelovém prostředí (odpovídající podmínkám zamýšleného způsobu podání), odběru média v různých časových bodech a následné kvantifikace uvolněného proteinu [9, 13]. K oddělení částic od uvolněného proteinu se nejčastěji využívají dialyzační střívka [13] nebo centrifugace [145].

Chitosanové částice s proteiny mohou zahrnovat třífázový profil uvolňování, který se skládá z:

- 1) počátečního rychlého uvolňování (burst release) – způsobeného desorpcí léčiva z povrchu částic,
- 2) stabilního uvolňování – které je výsledkem difúze proteinu dispergovaného v polymerní matici,
- 3) konstantního prodlouženého uvolňování – způsobeného difúzí proteinu skrz polymerní matici a zároveň erozí polymeru [7, 152].

Ovšem většina chitosanových částic vykazuje dvoufázový profil uvolňování, který zahrnuje jen body 1) a 3) [9, 10, 133, 145]. Tento profil však může být upraven prostřednictvím celé řady způsobů, jako je změna podmínek přípravy a tím i fyzikálně-chemických parametrů (tvar, velikost, náboj morfologie a hustota částic), modifikacemi chitosanové struktury či kombinací s jinými polymery a pomocnými látkami [117]. Mezi běžně používané polymery pro úpravu uvolňovacího profilu patří například PCL, alginát a PLGA [107, 153, 154].

Roztok simulované rány

Povrch kůže má normálně kyselé pH mezi 4 a 6,5 v závislosti na věku a anatomické oblasti. Tyto hodnoty regulují bakteriální flóru a chrání před infekcemi. Po poranění kůže se však pH zvyšuje na neutrální hodnoty, kvůli obnažení podkožních struktur s vnitřním pH prostředí těla 7,4. U chronických ran se pH posouvá do alkalického prostředí někdy až nad hodnotu 8, což podporuje růst patogenních bakterií [155, 156]. Ovšem některé chronické rány mohou mít i kyselé pH, což je spojeno s poruchami mikrocirkulace a anaerobním metabolismem [155, 157].

Roztoky používané k napodobení prostředí rány ve studiích uvolňování proteinu (GF) jsou typicky navrženy tak, aby replikovaly složité biochemické a fyziologické stavy čerstvých (akutních) a chronických ran. Tyto tekutiny často obsahují složky, které simulují specifické prostředí pro ránu, jako je pH, viskozita, enzymatická aktivita a iontová síla [7, 10, 57, 158].

V následující tabulce 2 je uveden přehled různých typů nosičů (převážně z chitosanu) s EGF, včetně použitých roztoků a podmínek k sledování kinetiky uvolňování tohoto GF.

Příkladem snahy zohlednit enzymatickou degradaci je studie Picheth et al. (2014), která modeluje neinfikovanou ránu a následně ránu infikovanou bakteriemi, kdy je k roztoku přidán navíc enzym lysozym [159]. Modelaci enzymatického prostředí popisuje také Tallapaneni et al. (2023) s použitím enzymu savinázy [10].

Většina studií však podmínky pro sledování kinetiky uvolňování proteinů zjednodušují a mezi nejčastěji užívané roztoky patří fosfátový pufr nebo fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) s pH upraveným na hodnoty nejčastěji 5,5–7,4, přičemž fyziologická hodnota 7,4 je nejvíce využívanou. Tyto pufrы umožňují kontrolované pozorování profilů uvolňování GF, postrádají však složitost skutečného prostředí rány.

Tabulka 2: Přehled studií kinetiky uvolňování EGF do různých roztoků simulující rány

Typ nosiče	Roztok a podmínky	Zdroj
Bakteriální celulóza s chitosan-alginátovým filmem	0,1 mol/l PBS (pH 5,5), azid sodný (200 ppm), 37 °C	[159]
	0,1 mol/l PBS (pH 5,5), azid sodný (200 ppm) + lysozym (10 000 U/ml), 37 °C	
Chitosanové NP v hydrogelu	Fosfátový pufr (pH 7,4), savináza (50 µg/ml), 37 °C	[10]
NP sodného karboxymethylchitosanu v hydrogelu	Fosfátový pufr (pH 7,4), 32 °C	[11]
Chitosanové NP	Fosfátový pufr (pH 7,4), 32 ± 0,5 °C	[9]
Chitosan-želatinové filmy	10 mM fosfátový pufr (pH 7,5), 37 °C, 5 % CO ₂	[160]
Chitosanové NP	PBS (pH 7,4), 37 °C	[13]
Karboxymethylchitosanové NP	Acetátový pufr (pH 6,0)	[7]
PCL nanovláknenný „scaffold“	PBS, 37 °C	[69]

1.5. Hodnocení toxicity nosičových systémů

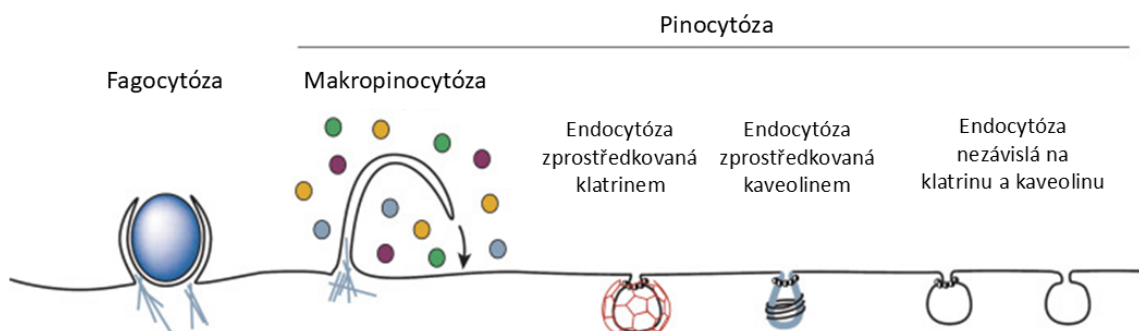
Příprava netoxických částic a dalších nanomateriálů hraje zásadní roli ve vývoji systémů podávání léků [161]. Ačkoliv je chitosan obecně považován za netoxický a biokompatibilní, je nutné posoudit cytotoxicitu konkrétních chitosanových částic, jelikož cytotoxicita závisí nejen na použitých materiálech, ale také na faktorech, jako je velikost, tvar, náboj a koncentrace částic a může se lišit mezi jednotlivými typy buněk [162, 163, 165].

1.5.1. Internalizace částic do buněk

Účinnost nanoterapie úzce souvisí s účinností buněčné internalizace. Buněčné membrány nesou negativní náboj, který je dán fosfolipidy v jejich struktuře. Díky pozitivnímu náboji chitosanu může docházet k elektrostatickým interakcím mezi částicemi a buněčným povrchem, což usnadňuje jejich vychytávání buňkami [162]. Navíc bylo prokázáno, že částice CS/TPP překonávají buněčnou membránu efektivněji než samotný chitosan [103].

Proces internalizace chitosanových částic ovlivňuje celá řada faktorů, včetně velikosti, tvaru, povrchového náboje, typu buněk, koncentrace částic, doby inkubace a teploty [163, 165]. Do buněk jsou CS částice transportovány především prostřednictvím aktivního transportního mechanismu endocytózy. Částice větší než 0,5 μm konkrétně dráhou fagocytózy, zatímco částice menší než 0,2 μm bývají internalizovány cestou pinocytózy. Pinocytózu lze rozdělit na endocytózu zprostředkovanou klatrinem, endocytózu zprostředkovanou kaveolinem, endocytózu nezávislou na klatrinu a kaveolinu a makropinocytózu, což je znázorněno na obrázku 8 [163, 166, 167]. Po endocytóze jsou částice typicky uzavřeny uvnitř intracelulárních vezikul, jako jsou endozomy, fagozomy nebo makropinozomy, a proto nemají přímý a okamžitý přístup k cytoplasmě nebo buněčným organelám [166].

Uvádí se, že samotný chitosan bývá internalizován prostřednictvím mannózového receptoru v makrofázích i dalších typech buněk [168]. Pro zvýšení selektivity lze však částice modifikovat navázáním specifických ligandů, které umožňují cílený vstup do buněk prostřednictvím konkrétních receptorů, čímž se usnadňuje zaměření na specifické buněčné populace či tkáň. Této strategie se využívá zejména v onkoterapii. Mezi běžně používané ligandy patří např. již zmíněná kyselina hyaluronová cílící na receptory CD44, alginát, různé proteiny a protilátky, transferrin umožňující navázání na transferrinový receptor a jiné bioaktivní látky [74, 168, 169, 170]. Dalším příkladem jsou v onkoterapii často skloňované částice konjugované s kyselinou listovou, které cílí na folátové receptory, nebo částice s EGF, které se vážou na EGFR, hojně exprimovaný nádorovými buňkami [171, 172].



Obrázek 8: Mechanismy buněčné internalizace částic, upraveno dle [173]

Mechanismy buněčné internalizace a nitrobuněčné lokalizace se sledují převážně pomocí mikroskopických metod, jako je fluorescenční mikroskopie, elektronová mikroskopie či konfokální mikroskopie [174]. Kromě mikroskopie se dále hojně využívá také průtoková cytometrie [163].

Fluorescenční značení částic

Fluorescenční značení částic se běžně využívá ve fluorescenční mikroskopii mimo jiné k hodnocení buněčného příjmu nano- a submikročástic a jejich intracelulární lokalizace [175, 176]. Značené částice umožňují rychlé, jednoduché a citlivé kvantifikování částic asociovaných s buňkami [175].

Fluorescein-5-isothiokyanát (FITC) je široce používán ve fluorescenčním značení, díky svým stabilním optickým a dobrým biologickým vlastnostem [177]. FITC absorbuje světlo v oblasti přibližně 495 nm a emituje fluorescence při vlnové délce kolem 520 nm [178]. Částice připravené z chitosanu značeného FITC vykazují podobné spektrální vlastnosti [179]. Fluorescenční vlastnosti FITC však mohou být ovlivněny změnami pH prostředí, přičemž maximální intenzita signálu je dosažena při alkalických hodnotách pH [179, 180]. FITC je navíc náchylný k fotodegradaci fluorescence (photobleaching), což může vést k postupnému poklesu fluorescenční intenzity při dlouhodobé expozici světlu. Z tohoto důvodu je doporučeno chránit ho před světelným zářením [181].

Fluorescenční markery mohou snadno disociovat, pokud jsou fyzicky adsorbovány na povrchu předem připravených částic, proto je vhodné je začlenit přímo do struktury CS před tvorbou částic [175]. Značení chitosanu FITC probíhá prostřednictvím kovalentní vazby mezi izothiokyanátovou skupinou FITC a primární aminoskupinou D-glukosaminu. Reakcí vzniká žlutý polymer se stabilním fluorescenčním signálem, přičemž nedochází k žádné disociaci FITC, která by jej mohla ovlivnit [182]. Takto značený CS si zachovává svou schopnost tvořit částice, například s TPP, přičemž si tyto částice zároveň uchovávají svou biokompatibilitu a netoxické vlastnosti [183].

1.5.2. Toxicita *in vitro*

K posouzení cytotoxicity CS částic se využívá mnoho testovacích metod, jejichž přehled na základě dostupné literatury je uveden v tabulce 2. Nejvíce zastoupenou metodou byl identifikován MTT test, který hodnotí buněčnou životaschopnost na základě redukce tetrazoliového barviva MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazoliumbromid) na nerozpustný formazan. Tato reakce probíhá pouze v metabolicky aktivních buňkách, přičemž

množství vzniklého formazanu odpovídá úrovni buněčného metabolismu a lze jej kvantifikovat spektrofotometricky [13, 10, 44, 172, 184].

Tabulka 3: Přehled využívaných testů pro hodnocení cytotoxicity CS částic

Typ testu	Specifický test/metoda	Zdroj
Životoschopnost a proliferace buněk	MTT, XTT, MTS, WST-8	[13], [10], [9], [185], [186], [187], [188]
	Test se sulforhodaminem B (SRB test)	[189]
	Redukční test s resazurinem	[190]
	Příjem neutrálního červeného barviva (NRU test)	[191] [192]
	Calcein AM/EthD-1 (Live/Dead Assay)	[193]
	Barvení trypanovou modří Test uvolnění laktátdehydrogenázy (LDH)	[185], [186], [191] [194]
Apoptóza a buněčná smrt	DNA fragmentace (gelová elektroforéza)	[188]
	JC-1	[184]
	Annexin V–FITC/Propidium jodid test	
	Rhodamin 123	[184]
Oxidační stres	Barvení akridinovou oranží/ethidium bromidem (AO/EB test)	[195] [191]
	Dichlorofluorescein diacetát (DCFH-DA test)	[184], [196]
	Test s 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátem (H ₂ DCFDA)	[195]
Analýza genové exprese	Sondy hydroethidin (HE), dihydroethidin (DHE)	[192]
	Western blot	[184]
	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)	[195]
	Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) – apoptotické geny	[188]

Studie popisují využití primárních buněk i buněčných linií včetně nádorových při testování cytotoxicity nanomateriálů z CS. Cytotoxicita částic byla popsána nejčastěji na běžných nádorových buněčných liniích jako jsou např. lidské plicní adenokarcinomové buňky A549 [172], lidské kolorektální adenokarcinomové buňky Caco-2 [193], lidské hepatokarcinomové buňky HepG2 [188], Hep3B [195] a SMMC-7721 [184], myší makrofágy RAW 264.7 [196], lidské cervikální karcinomové buňky HeLa [191] či buněčné linie odvozené od karcinomu prsu jako je MCF-7 a mnoho dalších [191].

Naopak pro testování cytotoxicity nanomateriálů s GF se používají nejčastěji buňky relevantní i pro následné studie související s hojením ran. Nejpoužívanější jsou dermální fibroblasty a to jak primární lidské fibroblasty (HDF, NHDF), které nejlépe modelují procesy v organismu, tak i buněčné linie (HFF-1) či myší fibroblasty (L929, NIH-3T3) [13, 14, 44, 22, 69, 16, 197]. Fibroblasty jsou ideální volbou jelikož hrají zásadní roli při produkci růstových faktorů, tvorbě ECM, produkci kolagenu a stimulaci keratinocytů. Všechny tyto složky přispívají k tvorbě strukturálního rámce kožní tkáně, který je nezbytný pro hojení ran [10]. Dalšími relevantními buňkami jsou lidské keratinocyty (imortalizované lidské keratinocyty – HaCaT a FEK4). HaCaT buňky pocházejí ze spontánní transformace lidských dospělých keratinocytů a jsou široce používány v dermatopatologických studiích [22, 69].

1.6. Skladování nosičových systémů

Vodné suspenze polymerních částic CS/TPP obvykle vykazují dobrou krátkodobou stabilitu [198]. Ovšem při dlouhodobém skladování jsou často nestabilní, jelikož dochází k agregaci a slučování částic, degradaci polymeru či úniku léčiva ze systému a možnému růstu mikroorganismů [145]. Pro zlepšení jejich stability při skladování se používají mnohé metody k převedení těchto koloidních suspenzí na suché pevné částice [199, 200].

Kromě hojně využívaných metod jako je lyofilizace a sušení rozprašováním, je možné také využít např. mikrovlnné sušení mrazem, které sice vyžaduje drahé vybavení, ale umožňuje kratší dobu sušení oproti zmíněným metodám [201]. Naopak nejjednodušší metodou je sušení částic na vzduchu. Postupným odpařováním rozpouštědla mají však částice tendenci agregovat [203].

1.6.1. Lyofilizace

Lyofilizace neboli sušení mrazem je široce využívaná metoda pro zlepšení fyzikální a chemické stability nanočásticových systémů dodávání léků [145, 199, 202–205]. Při lyofilizaci je ze zmrazené suspenze částic odstraněna voda procesem sublimace při nízké teplotě a tlaku [202]. Tento cyklus lze rozdělit do tří kroků: zmrazení (tuhnutí), primární sušení (sublimace ledu) a sekundární sušení (desorpce nezmrazené vody) [203].

V krocích zmrazení a sušení však mohou vznikající ledové krystaly vytvářet mechanický tlak a způsobovat agregaci a destabilizaci částic. Z toho důvodu se využívají kryoprotektiva, které mají za cíl ochránit částice a prodloužit trvanlivost vysušeného prášku. Kryoprotektiva chrání částice tím, že vytvářejí amorfní sklovitou matici, což je nekystalický stav látky, který zabraňuje agregaci a strukturálním změnám. Nejčastěji využívané jsou sacharidy (glukóza,

sacharóza a trehalóza) a cukerné alkoholy (mannitol a sorbitol). Mohou se však používat i další cukry, aminokyseliny (histidin) či polymerní látky [145, 168, 199, 204, 205]. Yan et al. [145] uvádí ve své studii, že většina NP bez kryoprotektiv agreguje, proto je pro proces lyofilizace jejich využití nezbytné.

Několik studií uvádí trehalózu a sacharózu jako kryoprotektivum poskytující nejlepší výsledky pro opětovnou disperzi v rozpouštědle, minimální agregaci a stabilitu částic z CS [145, 199, 205].

Optimální koncentrace kryoprotektiv jsou nezbytné nejen pro stabilizaci částic z CS, ale také nepřímo pro zlepšení jejich biologických aplikací a nízkou cytotoxicitu. Zajišťují uchování bioaktivních sloučenin (proteinů, NK,...), zlepšení buněčných interakcí či řízené uvolňování léčiva. Při nevhodné optimalizaci procesu však mohou být tyto interakce ovlivněny i opačným směrem [199, 204].

1.6.2. Sušení rozprašováním

Částice CS/TPP připravené ionotropní gelací se zachyceným léčivem/proteinem mohou být pro uskladnění také vysušeny rozprašováním (spray drying), nejčastěji pro podávání inhalačních léčiv nebo antimikrobiálních látek [200, 206].

Tento proces zahrnuje 3 fáze: atomizaci, sušení a sběr prášku. Suspenze částic je nejprve smíchaná s ochrannými látkami, jako je mannitol, laktóza, trehalóza s leucinem, které chrání částice před agregací a zlepšují opětovné rozptýlení v rozpouštědle. Následně je suspenze přeměněna na suchý prášek rozprašováním kapaliny na jemné kapičky a jejich sušením horkým vzduchem o teplotě <130 °C, aby nedošlo k degradaci CS [200, 206–208].

Sprejově vysušené částice mají v suché formě velikost běžně okolo 2–10 μm, která je však tvořena shlukými jednotlivými částicemi o velikosti stovek nanometrů, které se po redisperzi ve vodném médiu vrací na svou původní velikost, popřípadě vykazují jen mírné zvětšení oproti původní velikosti [200, 206–208].

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla příprava a charakterizace submikročástečového nosiče z chitosanu se zachyceným modelovým proteinem ovalbuminem (OVA) a epidermálním růstovým faktorem. Následně byly částice modifikovány kyselinou hyaluronovou se zachyceným proteinem. Součástí byla charakterizace částic, která zahrnovala stanovení hydrodynamické velikosti a polydisperzního indexu metodou DLS, dále stanovení zeta potenciálu pomocí ELS a porovnání účinnosti zachycení obou proteinů. Také byla sledována kinetika uvolňování obou proteinů z částic po lyofilizaci.

Dalším cílem bylo studovat pomocí fluorescenční mikroskopie míru interakce připravených chitosanových submikročásteč s vybranou buněčnou linií citlivou k proteinu EGF (A549).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Laboratorní přístroje a pomůcky

- analytické váhy ABT 220-5DM (Kern, Balingen, Německo)
- analytické váhy SBC 32 (Scaltec, Heiligenstadt, Německo)
- analyzátor SZ-100 nanopartica (HORIBA Scientific, Lyon, Francie)
- centrifuga 5702 (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- centrifuga ROTINA 420R, rotor 6-PLACE 4794 (Hettich®, Tuttlingen, Německo)
- centrifugační tuba 15 ml a 50 ml (Kartell S.p A., Noviglio, Itálie)
- dialyzační střívko Biotech CE Tubing, ester celulózy, průměr 10 mm, MWCO 300 kD (Spectrum Laboratories, USA)
- dialyzační střívko MEMBRA-CEL, regenerovaná celulóza, průměr 22 mm, MWCO 3500 (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Německo)
- digitální orbitální třepačka PSU-2T (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- dvoustěnná kyveta PS makro, optická dráha 10 mm, VIS 340–900 nm (Brand, Wertheim, Německo)
- elektrodová kyveta (uhlík, 6 mm), objem 0,1 ml (HORIBA, Kyoto, Japonsko)
- fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokyo, Japonsko)
- hydrofilní filtr 25 mm s celulózo-acetátovou membránou 0,45 μm (VWR International, USA)
- injekční jehla Sterican, průměr 0,80 x 40 mm, zelená (B.Braun, Penang, Malajsie)
- injekční stříkačka 10 ml Injekt Luer Solo (B.Braun, Melsungen, Německo)
- laboratorní sklo
- lyofilizační vialky, skleněné 5 ml s víčkem (infochroma ag, Goldau, Švýcarsko)
- lyofilizátor L4-110 PRO (GREGOR Instruments s.r.o., Sázava, ČR)
- magnetické míchadlo s ohřevem Stuart UC152 (Cole-Parmer, Staffordshire, UK)
- magnetické míchadlo TWISTER SET 2 s 9místným nastavcem (IKA-Werke, Staufen, Německo)
- mikroskopické sklíčko s kultivační komůrkou (SPL Life Sciences, Korea)
- mikrotitrační destička (96 jamková s plochým dnem) s víčkem (Anicrin, Scorzè, Itálie)
- mikrozkušavky o objemu 1,5 ml, 2 ml, 5 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- pultový hlubokomrazicí box MDF-C8V, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 84 litrů (PHCbi, Praha, ČR)
- pipety jednokanálové s nastavitelným objemem Research Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)

- přístroj na přípravu a purifikaci deionizované vody HALIOS, 0,2 μm (NEPTEC, Elbdal, Německo)
- rotátor Bios RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- skleněné lékovky s víčkem, čiré, objem 20 ml
- software Fiji (ImageJ 1.54p, open-source)
- software GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software, USA)
- software Microsoft Excel 365 (Microsoft, USA)
- software NIS-Elements AR 5.11.03 (Nikon, Japonsko)
- spektrofotometr Multiscan RC (Labsystems, Vantaa, Finsko)
- spektrofotometr PowerWave HT, software Gen5 (BioTek, Vermont, USA)
- stolní pH metr Lab 855 (SI Analytics, Mainz, Německo)
- termostat INCU-Line (VWR International, Pennsylvania, USA)
- topné hnízdo Genius Dry Bath Incubator, MD-02N (major science, New Taipei, Taiwan)
- vortex WX (VELP Scientifica, Miláno, Itálie)

3.2. Reagencie a chemikálie

- 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- D-(+)-trehalóza dihydrát, Mr 378.33 (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA)
- deionizovaná voda (0,055 μS/cm)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a., $M = 156,01 \text{ g/mol}$, kat. č. 30017-AP0 (Lach-ner, Neratovice, ČR)
- Epidermální růstový faktor (EGF), lidský rekombinantní, zdroj *E. coli*, lyofilizovaný, 6,2 kDa, kat. č. CYT-217 (ProSpec, Rehovot, Izrael)
- Fluorescein-5-isothiokyanát (FITC 'Isomer I'), kat. č. F143 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA)
- Formaldehyd 4% (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA)
- Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) p.a., $M = 358,14 \text{ g/mol}$, kat. č. 30061-AP0 (Lach-ner, Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný pecky p.a., Mr 40,00, kat. č. 15760-31000 (Penta, Praha, ČR)
- Chitosan, nízká Mr, 75–85% deacetylace, kat. č. 448869 (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA)
- Kyselina hyaluronová HYSILK, Mw ~150–350 kDa (Contipro, Dolní Dobrouč, ČR)

- Kyselina octová 99% p.a., Mr 60,05, kat. č. 20000-11000 (Penta, Praha, ČR)
- LysoTracker Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Methylalkohol p.a. (Methanol), Mr 32,04, kat. č. (Penta, Praha, ČR)
- Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit, kat. č. 23235 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Minimum essential medium Eagle (MEM Eagle) (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA)
- Octan sodný bezvodý (CH₃COONa) p.a., Mr 82,04, kat. č. 22750-30500 (Penta, Praha, ČR)
- Ovalbumin (albumin z kuřecího vaječného bílku), kat. č. A7641 (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA)
- ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Tripolyfosfát sodný, 85 %, kat. č. 238503 (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, USA)

3.3. Příprava částic z chitosanu a tripolyfosfátu sodného

Částice z chitosanu a tripolyfosfátu sodného byly připraveny metodou ionotropní gelace v objemovém poměru 5:1. Kladně nabitě CS aminoskupiny reagují se záporně nabitými skupinami TPP, což vede k tvorbě elektrostatických vazeb a trojrozměrnému propletení, které se z vodného roztoku vysráží ve formě gelovitých částic. Upraveno podle [102] a [209].

Příprava 1% roztoku chitosanu v kyselině octové (o koncentraci 2,5 mg/ml)

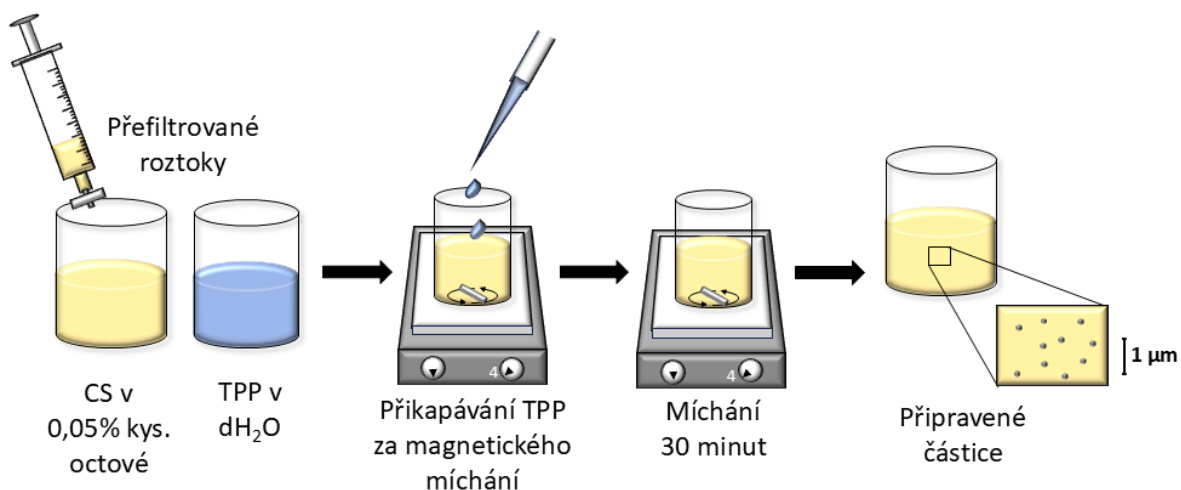
Pro přípravu 0,05% roztoku kyseliny octové bylo do skleněné uzavíratelné lahve odměřeno 100 ml deionizované vody a poté byla přidána 99% kyselina octová. Do tohoto roztoku byla za neustálého míchání přidána navážka 250 mg chitosanu. Na pH metru bylo změřeno a upraveno pH pod 4,8 (4,70–4,75). Pokud bylo moc vysoké, bylo upraveno přidáním 99% kyseliny octové. Roztok byl následně míchán na magnetickém míchadle Stuart UC152 (stupeň 1) přibližně 24 hodin při laboratorní teplotě. pH bylo přeměřeno po 5, 7 a 24 hodinách a vždy upraveno na hodnotu pH < 4,8. Připravený roztok byl skladován při 4 °C a používán po dobu 1–2 měsíců od přípravy.

Použité roztoky

- 1% roztok chitosanu v kyselině octové (2,5 mg/ml)
- roztok tripolyfosfátu sodného v deionizované vodě (0,25 mg/ml)

Pracovní postup

Částice byly připraveny v triplicátu v objemovém poměru CS:TPP (5:1). Roztok chitosanu o koncentraci 2,5 mg/ml byl naředěn deionizovanou vodou na koncentraci 0,25 mg/ml o objemu 15 ml. Poté byl připraven roztok TPP v deionizované vodě o koncentraci 0,25 mg/ml. Zředěný roztok CS a roztok TPP byly přefiltrovány injekční stříkačkou s filtrem s 0,45 μm celulózo-acetátovou membránou. Do lékovky s víčkem bylo napipetováno 5 ml roztoku chitosanu. Byl brán zřetel na výběr lékovek s plochým dnem, ve kterých se malé magnetické míchadlo točí pravidelně a uniformně, také v rámci tripletu. Do lékovky byl za stálého míchání na magnetickém míchadle IKA TWISTER na stupeň 4 (400 RPM) pomalu po kapkách pipetou přikapáván 1 ml roztoku TPP. Suspenze částic byla poté za stejných podmínek míchána při laboratorní teplotě ještě 30 minut. Takto připravená suspenze částic odpovídá hmotnosti 1,5 mg částic v objemu 6 ml. Schéma přípravy je na obrázku 9.



Obrázek 9: Schéma přípravy částic v této práci

3.4. Fluorescenční značení částic z chitosanu a tripolyfosfátu sodného

3.4.1. Příprava fluorescenčně značeného chitosanu

Fluorescenční značení chitosanu pomocí FITC probíhá prostřednictvím kovalentní vazby mezi izothiokyanátovou skupinou FITC a primární aminoskupinou D-glukosaminu chitosanu. Postup upraven podle [210] a [227].

Použité roztoky

- 0,1 M kyselina octová
- 0,2 M NaOH
- 1% chitosan v 0,1 M kyselině octové
- roztok 25 mg FITC v 35 ml methanolu
- methanol/deionizovaná voda (70/30, v/v)

Pracovní postup

Nejprve byla připravena 0,1 M kyselina octová zředěním 99% kyseliny octové deionizovanou vodou. Následně byl v této kyselině rozpuštěn chitosan, čímž vznikl 1% roztok chitosanu v 0,1 M kyselině octové. Do 50 ml centrifugační tuby bylo odebráno 8,75 ml roztoku FITC v methanolu a přidáno 6,25 ml 1% chitosanu v kyselině octové. Roztok byl inkubován 3 hodiny při laboratorní teplotě, mírném míchání (v rotátoru) v zatemnění. Dále byl roztok značeného chitosanu precipitován 0,2 M NaOH až do pH 10. Poté byl roztok centrifugován na centrifuze ROTINA 420R při RCF 4500 a teplotě 20 °C po dobu 30 minut. Peleta byla 3x promyta směsí methanol/deionizovaná voda (70/30, v/v) s centrifugací při RCF 4500, a teplotě 20 °C po dobu 30 minut. Poté byla peleta značeného chitosanu rozpuštěna v 15 ml 0,1 M kyseliny octové a míchána na magnetickém míchadle přes noc (16 hodin). Následující den byla provedena dialýza roztoku k odstranění methanolu. Bylo použito dialyzační střívko MEMBRACEL, regenerovaná celulóza s MWCO 3500 a dialýza probíhala v zatemnění v 2,5 l deionizované vody 3 dny s jednou výměnou vody po 24 hodinách. Fluorescenčně značený chitosan byl poté přepipetován do lyofilizačních vialek po 2,5 ml, zamražen na -80 °C a poté lyofilizován podle programu v tabulce 6. Lyofilizát byl skladován v temnu při 4 °C.

3.4.2. Příprava fluorescenčně značených chitosanových částic

Byly připraveny FITC značené částice z CS a TPP (5:1) podobně jako v kapitole 3.3. jen s menšími modifikacemi. Místo zásobního roztoku chitosanu byl použit lyofilizovaný chitosan značený FITC připravený v předchozí kapitole.

Použité roztoky

- lyofilizovaný chitosan značený FITC
- 0,05% kyselina octová
- roztok tripolyfosfátu sodného v deionizované vodě (0,25 mg/ml)

Pracovní postup

Lyofilizovaný fluorescenčně značený chitosan ve vialkách byl rozpuštěn v odpovídajícím množství 0,05% kyseliny octové, aby byl získán fluorescenčně značený chitosan o koncentraci 2,5 mg/ml. Bylo přeměřeno pH roztoku, který měl hodnotu < 4,8. Tento roztok byl následně míchán v zatemnění přes noc (16 hodin).

Následně byl připraven triplikát částic v objemovém poměru značený CS:TPP (5:1) stejně jako v kapitole 3.3., jen s tím rozdílem, že 30 minutové míchání na magnetickém míchadle probíhalo v zatemnění a připravené částice byly uchovávány ve tmě.

3.5. Zachycení proteinu ve struktuře částic

Zachycení modelového proteinu ovalbuminu a epidermálního růstového faktoru do struktury CS/TPP částic bylo provedeno v průběhu ionotropní gelace, při níž CS reagoval s TPP za vzniku polymerní sítě zachycující protein uvnitř částic. Metoda byla upravena podle [211].

Použité roztoky

- roztok ovalbuminu v deionizované vodě (2 mg/ml)
- roztok epidermálního růstového faktoru v deionizované vodě (1 mg/ml)
- 1% roztok chitosanu v kyselině octové (2,5 mg/ml)
- roztok tripolyfosfátu sodného v deionizované vodě (0,25 mg/ml)

Pracovní postup

Nejprve byl naředěn zásobní roztok OVA nebo EGF deionizovanou vodou na koncentraci 0,150 mg/ml a roztok chitosanu o koncentraci 2,5 mg/ml (připravený podle kapitoly 3.4.) na koncentraci 0,25 mg/ml. Následně byl zředěný roztok CS a roztok TPP o koncentraci 0,25 mg/ml přefiltrován přes filtr s 0,45 μ m acétát-celulózovou membránou.

Byl připraven triplet částic. Do skleněné lékovky bylo napipetováno 6,666 ml přefiltrovaného roztoku CS a k tomu byl přidán 1 ml zředěného roztoku OVA nebo EGF. Lékovka byla umístěna na magnetické míchadlo IKA TWISTER a při magnetickém míchání na stupeň 4 (400 RPM) byl po kapkách přidán 1,333 ml TPP. Následně byla lékovka míchána ještě 30 min. Takto bylo získáno 9 ml suspenze částic CS/TPP se zachyceným proteinem odpovídající hmotnosti částic 2 mg (bez proteinu) a 2,15 mg s proteinem.

3.5.1. Hodnocení účinnosti zachycení proteinu a vazebné kapacity částic

Účinnost zachycení proteinu byla vyhodnocena nepřímou metodou pomocí BCA testu v mikrotitrační destičce podle metody v 3.11.1. Byla stanovena účinnost zachycení proteinu a vazebná kapacita nosiče [154]. Procentuální účinnost zachycení byla vypočítána podle rovnice 2, která porovnává množství navázaného proteinu k vloženému celkovému množství proteinu. Procentuální vazebná kapacita nosiče byla vypočítána podle rovnice 3, která porovnává množství navázaného proteinu ku hmotnosti částic (nosiče) v suchém stavu.

Rovnice 2: Výpočet účinnosti zachycení proteinu

$$\text{Účinnost zachycení [\%]} = \frac{\text{celkový protein } [\mu\text{g/ml}] - \text{volný nenavázaný protein } [\mu\text{g/ml}]}{\text{celkový protein } [\mu\text{g/ml}]} \cdot 100$$

Rovnice 3: Výpočet vazebné kapacity nosiče

$$\text{Vazebná kapacita nosiče [\%]} = \frac{\text{celkový protein } [\mu\text{g/ml}] - \text{volný nenavázaný protein } [\mu\text{g/ml}]}{\text{hmotnost částic v suchém stavu } [\mu\text{g/ml}]} \cdot 100$$

3.6. Obalení částic do kyseliny hyaluronové

Tento proces probíhá na základě elektrostatických interakcí mezi kladně nabitými chitosanovými částicemi a záporně nabitou kyselinou hyaluronovou. Po přidání HA k suspenzi částic dochází k vazbě mezi aminoskupinami chitosanu a karboxylovými skupinami HA, což vede k tvorbě vnějšího obalu. Výsledná vrstva HA stabilizuje částice, snižuje jejich zeta potenciál do záporných hodnot a zlepšuje biokompatibilitu. Upraveno podle [168] a [227].

Příprava 0,1 M acetátového pufru (pH 5)

Pro přípravu 1 l acetátového pufru o pH 5 byly nejprve připraveny 2 roztoky. Pro přípravu 400 ml 0,2 M kyseliny octové bylo odměřeno 4,62 ml 99% kyseliny octové a doplněno deionizovanou vodou na celkový objem. Pro přípravu 400 ml 0,2 M octanu sodného bylo naváženo 6,56 g bezvodého octanu sodného a rozpuštěno v 400 ml deionizované vody. Následně bylo do 2 l kádinky odměřeno 148 ml roztoku kyseliny octové a 352 ml roztoku octanu sodného a doplněno deionizovanou vodou na objem 1 l. Po promíchání bylo přeměřeno pH a v případě potřeby upraveno přidáním jednoho či druhého roztoku. Pufr byl použit ihned k dialýze nebo uchováván při 4 °C po dobu 1 týdnu.

Použité roztoky

- 1% roztok chitosanu v kyselině octové (2,5 mg/ml)
- roztok tripolyfosfátu sodného v deionizované vodě (0,25 mg/ml)
- 0,1 M acetátový pufr (pH 5)
- roztok kyseliny hyaluronové v acetátovém pufru (1,5 mg/ml)

Pracovní postup

Částice CS/TPP (5:1) o celkovém objemu 6 ml byly připraveny podle kapitoly 3.3. a následně byl odebrán vzorek na měření velikosti a zeta potenciálu podle kapitoly 3.7. Poté byly částice přeneseny do dialyzačního střívka Biotech CE Tubing a dialyzovány v minimálně stonásobném objemu acetátového pufru 16 hodin. Po dialýze byl vzorek doplněn na původní objem acetátovým pufrům. Roztok kyseliny hyaluronové v acetátovém pufru o koncentraci 1,5 mg/ml byl přefiltrován injekční stříkačkou s filtrem s 0,45 µm celulózo-acetátovou membránou. Suspenze částic byla po kapkách přidávána do lékovky s přefiltrovaným roztokem kyseliny hyaluronové v objemovém poměru 1:1 za magnetického míchání na míchadle IKA TWISTER na stupeň 4 (400 RPM) při laboratorní teplotě. Poté byla suspenze míchána ještě 30 minut za stejných podmínek.

3.6.1. Chitosanové částice obalené kyselinou hyaluronovou s proteinem

Použité roztoky a reagensy

- 1% roztok chitosanu v kyselině octové (2,5 mg/ml)
- roztok tripolyfosfátu sodného v deionizované vodě (0,25 mg/ml)
- 0,1 M acetátový pufr (pH 5)
- roztok kyseliny hyaluronové v acetátovém pufru (1,5 mg/ml)
- roztok ovalbuminu v acetátovém pufru (2 mg/ml)

Pracovní postup

Částice CS/TPP (5:1) o celkovém objemu 6 ml byly připraveny podle kapitoly 3.3. a následně byl odebrán vzorek na měření velikosti a zeta potenciálu podle kapitoly 3.7. Poté byly částice přeneseny do dialyzačního střívka Biotech CE Tubing a dialyzovány v minimálně stonásobném objemu acetátového pufru 16 hodin. Po dialýze byl vzorek doplněn na původní objem acetátovým pufrům. Roztok kyseliny hyaluronové v acetátovém pufru o koncentraci 1,5 mg/ml byl přefiltrován injekční stříkačkou s filtrem s 0,45 µm celulózo-acetátovou membránou. Do 5 ml přefiltrovaného roztoku HA bylo přidáno 0,150 mg ovalbuminu, což odpovídá objemu 75 µl roztoku v acetátovém pufru. K tomu byla následně po kapkách

přidávána suspenze částic v objemovém poměru 1:1 za magnetického míchání na míchadle IKA TWISTER na stupeň 4 (400 RPM) při laboratorní teplotě. Poté byla suspenze míchána ještě 30 minut za stejných podmínek.

Vyhodnocení

Hodnocení účinnosti zachycení proteinu a vazebné kapacity částic bylo provedeno podle kapitoly 3.5.1.

3.7. Fyzikálně-chemická charakterizace částic

Fyzikálně-chemická charakterizace částic byla provedena pomocí přístroje SZ-100 nanopartica. Hydrodynamická velikost částic a polydisperzní index částic byly stanoveny metodou měření dynamického rozptylu světla. Zeta potenciál částic byl stanoven pomocí elektroforetického rozptylu světla.

3.7.1. Stanovení hydrodynamické velikosti a polydisperzního indexu

Pracovní postup

Na měření DLS byla připravena koncentrace 250 μg částic v objemu 1,5 ml. Tomuto množství odpovídá 1 ml připravené suspenze částic CS/TPP z celkového objemu 6 ml nebo 0,286 ml suspenze částic CS/TPP obalených HA. Do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky byl odpipetován odpovídající objem připravené suspenze částic a doplněn deionizovanou vodou na objem 1,5 ml. Poté byl obsah krátce promíchán na vortexu, přenesen do dvoustěnné kyvety a byla změřena hydrodynamická velikost a PDI. Měření bylo prováděno v monodisperzním režimu pod úhlem 173° s hodnotou indexu lomu pro chitosan 1,540 při teplotě 25°C . Každé měření proběhlo minimálně v 12 opakováních. Z nich byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Pro hydrodynamickou velikost částic byla zvolena hodnota z-average size (nm) a pro PDI hodnota PDI.

Hodnocení polydisperzity

Získané monodisperzní výsledky hydrodynamické velikosti a PDI částic v suspenzi byly následně rekalkulovány v softwaru přístroje na polydisperzní standardní formu distribuce. Polydisperzní výsledky ukazují, zda a popřípadě kolik měření vykazuje polydisperzitu (přítomnost 2 a více velikostí částic – píků).

Byly tak navíc získány hodnoty mean a modus dalších velikostí částic. Pro hodnocení velikosti částic 2. populace byla použita hodnota mean. Vzorky, které měly všechna měření v rámci pouze jedné velikosti nebo maximálně tři z měření odhalily více velikostí byly

hodnoceny jako monodisperzní. Naopak vzorky, u kterých více než tři měření prokázala přítomnost dvou či více velikostních populací, byly hodnoceny jako polydisperzní.

3.7.2. Stanovení zeta potenciálu

Pracovní postup

Kyveta s uhlíkovou elektrodou byla propláchnuta deionizovanou vodou. Na toto měření je opět potřeba 250 µg/1,5 ml suspenze částic. Po měření DLS byla suspenze částic přenesena pomocí injekční stříkačky do elektrodové kyvety bez vzduchových bublin a byl změřen zeta potenciál pod úhlem rozptylu světla 173° a teplotě 25 °C. Bylo získáno opět minimálně 12 opakování pro každý vzorek. Byla použita průměrná hodnota zeta potential (mean) v mV a její směrodatná odchylka.

3.8. Sledování charakteristik částic v čase

Krátkodobá stabilita částic CS/TPP a fluorescenčně značených částic CS/TPP byla hodnocena sledováním změn jejich charakteristik. Konkrétně byla analyzována hydrodynamická velikost, PDI a zeta potenciál v průběhu 2 týdnů skladování.

Pracovní postup

Částice CS/TPP byly připraveny podle kapitoly 3.3. a fluorescenčně značené částice CS/TPP byly připraveny podle kapitoly 3.4.2. Po přípravě byla stanovena hydrodynamická velikost a PDI pomocí DLS a zeta potenciál pomocí ELS. Charakterizace částic proběhla podle kapitoly 3.7. Suspenze částic o původní koncentraci 0,25 mg/ml byla následně uchovávána po celou dobu experimentu v uzavřené skleněné lékovce při 4 °C v ztemnění. Uvedené parametry byly následně stanoveny znovu po 3, 7 a 14 dnech od přípravy. Před samotným měřením byly vzorky krátce promíchány na vortexu. Po každém měření ubyl z lékovky vždy 1 ml suspenze, přičemž koncentrace byla zachována.

Vyhodnocení

Získané hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu z jednotlivých dnů byly graficky znázorněny a byl stanoven procentuální přírůstek velikosti částic podle následujícího rovnice:

Rovnice 4: Výpočet procentuálního nárůstu velikosti částic, upraveno dle [198]

$$\text{Nárůst velikosti [\%]} = \frac{\text{konečná velikost} - \text{počáteční velikost}}{\text{počáteční velikost}} \cdot 100$$

3.9. Hodnocení interakce částic s buněčnou linií A549

Hodnocení internalizace fluorescenčně značených částic CS/TPP byla sledována na buněčné linii A549, což je buněčná linie lidského adenokarcinomu plic. Tato buněčná linie pochází z Evropské sbírky buněčných kultur (ECACC) a byla použita do 20. pasáže. Po inkubaci buněk s částicemi byla míra jejich internalizace sledována pomocí fluorescenční mikroskopie. Postup vychází z doporučení výrobce LysoTracker DND99.

Použité roztoky a reagensie

- kultivační médium Minimum essential medium Eagle (MEM Eagle)
- LysoTracker Red DND-99
- 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI)
- PBS
- 4% formaldehyd
- ProLong Gold

Příprava vzorků

Podle kapitoly 3.4.2. byl připraven jeden vzorek fluorescenčně značených částic CS/TPP a podle kapitoly 3.3. byl připraven jeden vzorek neznačených částic CS/TPP sloužící jako negativní kontrola. Dále byl připraven vzorek částic se zachyceným EGF, který měl navíc jeden krok v postupu: před samotnou tvorbou částic byl do přefiltrovaných 5 ml roztoku FITC značeného chitosanu přidán roztok EGF o objemu 150 μ l a koncentraci 1 mg/ml (odpovídající 150 mg EGF).

Ze všech vzorků byl odebrán 1 ml ke charakterizaci částic (stanovení hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu) provedené podle kapitoly 3.7. Následně byly vzorky přeneseny do 5 ml Eppendorfových zkumavek a zakoncentrovány na koncentraci 4 mg/ml. To bylo provedeno centrifugací na centrifuze 5702 Eppendorf při 1700 RCF po dobu 5 minut a následným odebráním 4,6875 ml supernatantu.

Příprava preparátu a mikroskopie

Do kultivační komůrky (SPL) bylo nasazeno 100 000 buněk A549 na jamku. Kultivační médium bylo vyměněno za čerstvé a buňky byly ovlivněny koncentrací fluorescenčně značených částic s a bez EGF (50, 100, 150 a 200 μ g/ml) po dobu 3 hodin při teplotě 37 °C v inkubátoru. Buňky byly následně promyty PBS, jednou krátce a poté 3x po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Kultivační médium bylo vyměněno za čerstvé obsahující fluorescenční barvivo LysoTracker Red DND-99 o koncentraci 100 nM, následně byly kultivační komůrky

umístěny do inkubátoru a inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. Po inkubaci byly buňky promyty PBS vytemperovaným na 37 °C jednou krátce a poté 3x po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Po promytí byly přidány 2 ml 4% formaldehydu na komůrku na 10 minut při teplotě 22–25 °C. Po této době byla sklíčka opláchnuta od formaldehydu prvním krátkým oplachem PBS a poté oplachem 3x po dobu 5 minut. Jádra buněk byla dobarvena fluorescenčním barvivem DAPI o koncentraci 1 µg/ml a byla ponechána inkubovat ve tmě přibližně 10 minut. Po inkubaci proběhlo další promytí PBS: 1x krátce a poté 3x po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Následně byly preparáty zamontovány do montovacího média ProLong Gold a skladovány ve tmě do provedení mikroskopie. Takto vytvořené preparáty byly pozorovány pomocí badatelského fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse 80i vybaveného kamerou Nikon DS-Qi1. Fotografie byly pořízeny pomocí programu NIS-Elements AR 5.11.03.

Vyhodnocení

Procentuální internalizace značených částic buňkami byla pro jednotlivé koncentrace, a to jak s přítomností EGF, tak bez něj, vypočítána na základě počtu buněk s internalizovanými částicemi vztažených na celkový počet minimálně 100 buněk. K vlastnímu výpočtu byly použity jak snímky zahrnující jednotlivé fluorescenční kanály (FITC, DAPI, TRITC), tak snímky doplněné o fázový kontrast. Takto bylo možno identifikovat veškeré internalizované částice v buňkách. Z procentuální internalizace částic z jednotlivých snímků byl získán průměr, včetně směrodatných odchylek.

Kvantifikace částic byla provedena vyhodnocením FITC signálu ze získaných fluorescenčních snímků pomocí open-source softwaru Fiji (ImageJ 1.54p, Java 1.8.0_322, 64bit). Postup hodnocení vycházel z návodů uvedených na stránkách ImageJ [214]. Pro analýzu byl využit 8bitový obraz zeleného kanálu odpovídajícího signálu FITC. Pozadí bylo odstraněno pomocí funkce „Subtract Background“ s nastaveným rolling ball radius 50 pixelů. Prahování (threshold) bylo manuálně nastaveno na hodnotu 100–255 na základě negativní kontroly, přičemž stejné nastavení bylo aplikováno na všechny snímky pro zajištění srovnatelnosti. Pomocí funkce „Analyze Particles“ byly hodnoceny všechny částice bez omezení velikosti či tvaru. Pro každý snímek byla získána hodnota Integrated density, která byla přepočítána na 100 buněk podle skutečného počtu buněk ve snímku. Výsledné hodnoty byly zprůměrovány.

Rozdíly mezi skupinami (částice s EGF a bez EGF) byly statisticky vyhodnoceny pomocí softwaru GraphPad QuickCalcs. Experimenty, které byly statisticky hodnocené, byly použity v

n = 6. Pro porovnání jednotlivých skupin byl použit nepárový t-test, na hladině významnosti 5 %. Samotné výsledky jsou pak vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

3.10. Stanovení množství proteinu bicinchoninovou metodou

Bicinchoninová (BCA) kolorimetrická metoda slouží ke stanovení koncentrace proteinu v roztoku a byla použita pro nepřímé hodnocení stanovení proteinu zachyceného v částicích ze supernatantu. Samotná reakce je založena na redukci Cu^{2+} na Cu^+ v alkalickém prostředí a následné reakci s kyselinou bicinchoninovou za vzniku fialového komplexu mědi. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinu a je měřena spektrofotometricky při 570 nm. Byl použit Micro BCA™ Protein Assay Kit a test byl proveden podle návodu výrobce dvěma metodami podle rozsahu koncentrace [151].

3.10.1. Metoda v mikrotitrační destičce

Tato metoda má rozsah koncentrací proteinu 2–200 $\mu\text{g/ml}$ a provádí se v 96 jamkové mikrotitrační destičce s plochým dnem.

Použité roztoky

- roztok ovalbuminu v deionizované vodě/acetátovém pufru o pH 5 (2 mg/ml)
- reagentie soupravy Micro BCA™ Protein Assay Kit
 - MA: uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, vinan sodný v 0,2 M NaOH
 - MB: 4% 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina (BCA) v destilované vodě
 - MC: 4% pentahydrát síranu měďnatého v destilované vodě

Pracovní postup

Ze zásobního roztoku ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml byly připraveny kalibrační standardy v rozmezí koncentrací 0–200 $\mu\text{g/ml}$ postupným ředěním deionizovanou vodou (pro částice CS/TPP) a acetátovým pufrem o pH 5 (pro částice CS/TPP obalené HA) podle tabulky 4. Pracovní roztok byl připraven smícháním 25 dílů reagentie MA, 24 dílů reagentie MB a 1 dílu reagentie MC (25:24:1, reagentie MA:MB:MC).

Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno 150 μl standardu, slepého vzorku nebo neznámého vzorku (supernatantu) a k tomu bylo následně přidáno 150 μl připraveného pracovního roztoku. Takto připravená destička byla přibližně 30 s míchána na orbitální třepačce. Destička byla zakryta víčkem a inkubována v termostatu při 37 °C po dobu 2 hodin.

Po inkubaci byla destička vytemperována na laboratorní teplotu a do 10 minut od vyjmutí z termostatu byla ve spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 570 nm.

Tabulka 4: Příprava kalibračních standardů pro MicroBCA™ test v mikrotitrační destičce

Koncentrace standardu [$\mu\text{g/ml}$]	Objem a zdroj ovalbuminu	Objem ředícího roztoku
200	150 μl ze zásobního roztoku	1350 μl
150	975 μl z předchozího ředění	325 μl
100	800 μl z předchozího ředění	400 μl
40	500 μl z předchozího ředění	500 μl
20	500 μl z předchozího ředění	500 μl
10	500 μl z předchozího ředění	500 μl
5	500 μl z předchozího ředění	500 μl
2,5	500 μl z předchozího ředění	500 μl
0 (slepý vzorek)	0 μl z předchozího ředění	500 μl

Vyhodnocení

Ze získaných absorbancí kalibračních standardů byla odečtena hodnota absorbance slepého vzorku a z těchto hodnot byla poté sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci standardů. Pomocí získané regresní rovnice byla vypočítána koncentrace proteinu ve vzorcích.

3.10.2. Metoda v mikrozkušavkách

Test byl proveden v mikrozkušavkách Eppendorf a následně přenesen do 96 jamkové mikrotitrační destičky pro změření absorbance. Tato metoda je lineární pro rozsah koncentrací proteinu 0,5–40 $\mu\text{g/ml}$.

Použité roztoky

- roztok ovalbuminu ve fosfátovém pufru, pH 7,3 (2 mg/ml)
- reagentie soupravy Micro BCA™ Protein Assay Kit
 - MA: uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, vinnan sodný v 0,2 M NaOH
 - MB: 4% 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina (BCA) v destilované vodě
 - MC: 4% pentahydrát síranu měďnatého v destilované vodě

Pracovní postup

Nejprve byl připraven zásobní roztok ovalbuminu ve fosfátovém pufru s pH 7,3 o koncentraci 2 mg/ml. Z tohoto roztoku byly dle tabulky 5 připraveny kalibrační standardy v rozmezí koncentrací 0–200 $\mu\text{g/ml}$ postupným ředěním fosfátovým puftrem. Pracovní roztok

byl připraven smícháním 25 dílů reagentie MA, 24 dílů reagentie MB a 1 dílu reagentie MC (25:24:1, reagentie MA:MB:MC). Do mikrozkušavek Eppendorf byl napipetován 1 ml standardu, vzorku či slepého vzorku a byl přidán 1 ml pracovního roztoku. Směs byla inkubována 1 hodinu v topném hnízdě při teplotě 60 °C. Po inkubaci bylo napipetováno 300 µl standardu, vzorku či slepého vzorku do mikrotitrační destičky a proměřeno na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm.

Tabulka 5: Příprava kalibračních standardů pro MicroBCA™ test v mikrozkušavkách

Koncentrace standardu [µg/ml]	Objem a zdroj ovalbuminu	Objem ředícího roztoku (fosfátový pufr, pH 7,3)
200	0,5 ml ze zásobního roztoku	4,5 ml
40	2 ml z předchozího ředění	8 ml
20	4 ml z předchozího ředění	4 ml
10	4 ml z předchozího ředění	4 ml
5	4 ml z předchozího ředění	4 ml
2,5	4 ml z předchozího ředění	4 ml
1	3,2 ml z předchozího ředění	4,8 ml
0,5	4 ml z předchozího ředění	4 ml
0 (slepý vzorek)	0 ml z předchozího ředění	8 ml

Vyhodnocení

Ze získaných absorbancí kalibračních standardů byla odečtena hodnota absorbance slepého vzorku a z těchto hodnot byla poté sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci standardů. Pomocí získané regresní rovnice byla vypočítána koncentrace proteinu ve vzorcích.

3.11. Lyofilizace částic s proteiny

Lyofilizace, neboli sušení mrazem, je metoda k odstranění vody z materiálů procesem sublimace při nízké teplotě a tlaku k zajištění lepší stability vzorků pro dlouhodobé skladování. Tento proces lze rozdělit do tří kroků: zmrazení (tuhnutí), primární sušení (sublimace ledu) a sekundární sušení (desorpce nezmrazené vody). Optimalizované podmínky pro lyofilizaci částic CS/TPP 5:1 se zachyceným proteinem byly převzaty z [209].

Použité roztoky

- 55% roztok trehalózy v deionizované vodě

Pracovní postup

Částice CS/TPP se zachyceným OVA nebo EGF byly připraveny podle kapitoly 3.5. Částice CS/TPP obalené HA se zachyceným OVA v obalu byly připraveny podle kapitoly 3.6.1. Po přípravě byla suspenze částic převedena do 15 ml centrifugační tuby a byly zakoncentrovány centrifugací na centrifuce 5702 Eppendorf po dobu 5 min při 1700 RCF. Byl odebrán celý supernatant, který byl ponechán pro stanovení koncentrace proteinu v částicích pomocí BCA testu podle kapitoly 3.11.1. Peleta částic byla poté rozmíchána v 1,909 ml deionizované vody a přenesena do 5 ml lyofilizační vialky. K suspenzi částic bylo přidáno 91 μ l 55% roztoku trehalózy. Zavřené vialky bez gumové zátky byly zamrazeny na -80 °C na 24 hodin. Následně byly lyofilizovány bez víčka podle podmínek v tabulce 6 po dobu 24 hodin. Po lyofilizaci byly uzavřeny i s gumovou zátkou a byly uchovávány při 4 °C.

Tabulka 6: Lyofilizační program

Čas [min]	Tlak [hPa]	Teplota police [°C]
30	2,5	-25
120	3	-15
120	2	-10
120	1,5	-5
120	1	0
120	0,5	5
780	~ 0	20

3.12. Kinetika uvolňování proteinu z lyofilizovaných částic

Kinetika uvolňování proteinu z lyofilizovaných částic popisuje rychlost a mechanismus, jakým je protein uvolňován do okolního prostředí. Tento proces je ovlivněn faktory, jako je složení částic, interakce proteinu s nosičem a podmínky prostředí, například pH nebo iontová síla. Metoda byla upravena podle [209] a [212].

Příprava 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,3)

Pro přípravu 50 ml fosfátového pufru byl nejprve připraven roztok A navážením 1,79 g 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a za zahřívání rozpuštěno v 5 ml deionizované vody. Roztok B byl připraven navážením 0,78 g 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a za zahřívání rozpuštěno v 5 ml deionizované vody.

Do 50 ml uzavíratelné nádoby bylo odpipetováno 4,225 ml roztoku A a 0,775 ml roztoku B. Objem byl doplněn deionizovanou vodou a pH bylo ověřeno pomocí pH metru a případně upraveno přidáním jednoho či druhého roztoku (roztok A ke zvýšení pH pufru, roztok B ke snížení pH pufru). Takto připravený pufr byl skladován při 4 °C a používán po dobu 1 týdnu.

Pracovní postup

Bylo vytemperováno 30 ml připraveného fosfátového pufru na teplotu 37 °C. 2 mg lyofilizovaných částic CS/TPP ze zachyceným OVA nebo EGF a v lyofilizační vialce byly resuspendovány v 5 ml vytemperovaného pufru a za otáčení v rotátoru byly ponechány v termostatu při 37 °C, kde byla suspenze po celou dobu experimentu.

Po 25 minutách byla celá suspenze převedena do mikrozkušavky Eppendorf a byla centrifugována na centrifuze 5702 Eppendorf 5 minut při 1700 RCF a ihned po centrifugaci byly odebrány alikvoty 1 ml tak, aby byl alikvot odebrán po 30 minutách. Objem byl následně doplněn stejným množstvím vytemperovaného pufru. Tento proces byl znovu opakován i pro časy 60, 90, 120 minut, 24 hodin, 48 hodin a 1 týden.

Alikvoty byly postupně shromažďovány a skladovány při 4 °C a následně byla stanovena koncentrace proteinu pomocí soupravy MicroBCATM Protein Assay Reagent Kit mikrozkušavkovou metodou podle kapitoly 3.10.2.

Vyhodnocení

Kinetika uvolňování proteinu byla vyhodnocena kumulativní metodou, jejímž principem je postupné přičítání uvolněného proteinu. Dále bylo dle rovnice 5 vypočítáno množství uvolněného proteinu [195].

Rovnice 5: Výpočet uvolněného proteinu v procentech

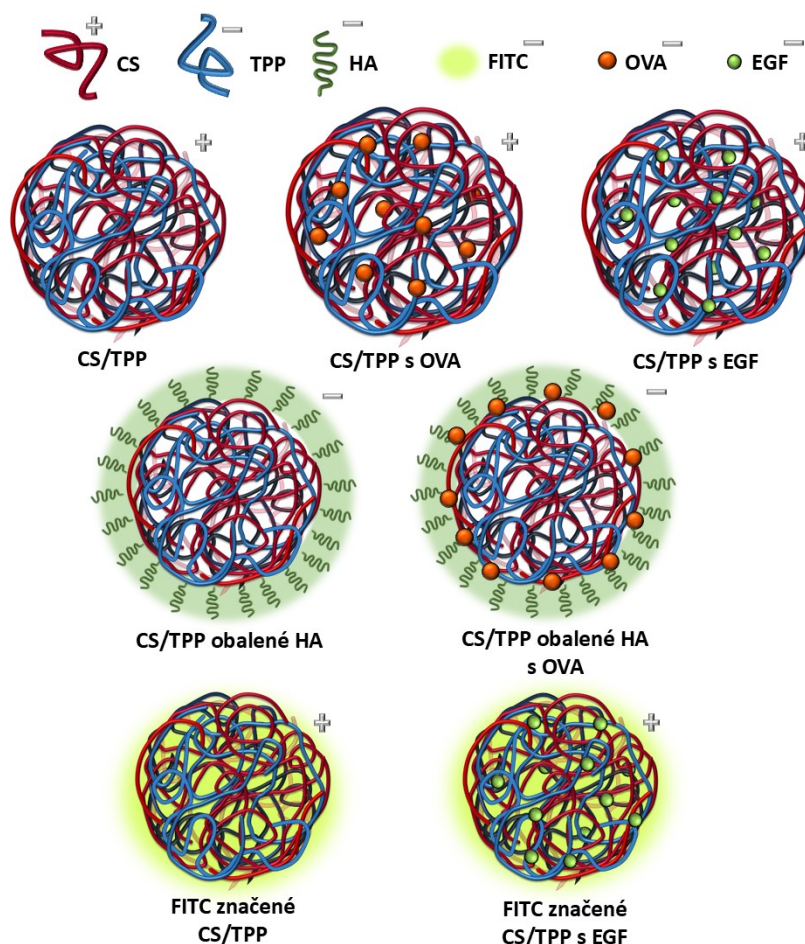
$$\text{Uvolněný protein [\%]} = \frac{\text{uvolněný protein } [\mu\text{g}]}{\text{zachycený protein } [\mu\text{g}]} \cdot 100$$

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce se zaměřuje na vývoj a charakterizaci chitosanových submikročastic s potenciálem pro cílenou aplikaci v oblasti hojení ran. Částice umožňují efektivní začlenění lidského rekombinantního epidermálního růstového faktoru (dále jen EGF), modelového proteinu ovalbuminu a případně i dalších růstových faktorů a molekul s podobnými vlastnostmi.

V rámci experimentální části bylo připraveno celkem sedm variant částic, které vznikly na bázi CS a síťovacího činidla TPP. Jednotlivé částice se lišily ne/přítomností zachycených proteinů, fluorescenčním značením CS pomocí FITC a/nebo obalem z kyseliny hyaluronové. Tyto úpravy umožnily studium jak fyzikálně-chemických vlastností částic, včetně stanovení profilu uvolňování proteinu po lyofilizaci, tak jejich interakce s buňkami, zejména z hlediska internalizace, která byla sledována pomocí fluorescenční mikroskopie.

Všechny připravené částice jsou znázorněny na schématu (obrázek 10), doplněné o vysvětlivky a vlastnosti jednotlivých komponent. Návrh schématu vychází z literárních zdrojů a byl dále upraven na základě vlastního pojetí [104, 117, 217].



Obrázek 10: Schématické znázornění všech připravených CS částic v této práci

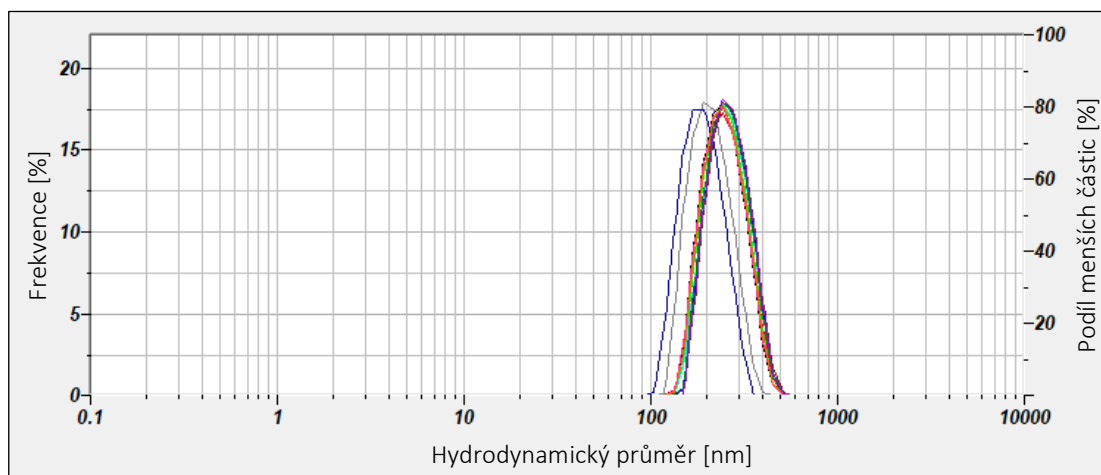
4.1. Příprava a charakterizace částic z chitosanu a tripolyfosfátu sodného

Částice z chitosanu a TPP byly zvoleny z celé řady důvodů, které byly podrobněji popsány v teoretické části práce. Pro shrnutí se jedná o jedny z nejčastěji využívaných CS částic pro nosičové systémy dodávání látek, protože je možné je připravit s požadovanými parametry a umožňují zachytit široké spektrum bioaktivních látek jak do své struktury, tak na svůj povrch. Jejich příprava navíc probíhá bez použití toxických chemikálií a za mírných podmínek bez nutnosti vysokých teplot.

Částice byly připraveny z chitosanu o nízké molekulové hmotnosti se stupněm deacetylace 75–85 % metodou ionotropní gelace podle kapitoly 3.3. Jako síťovací činidlo byl použit tripolyfosfát sodný, přičemž objemový poměr CS:TPP byl 5:1. Při této reakci došlo k iontovému zesíťování mezi kladně nabitým protonovaným aminem CS a záporně nabitými fosfátovými skupinami TPP, čímž se získaly gelovité částice [13].

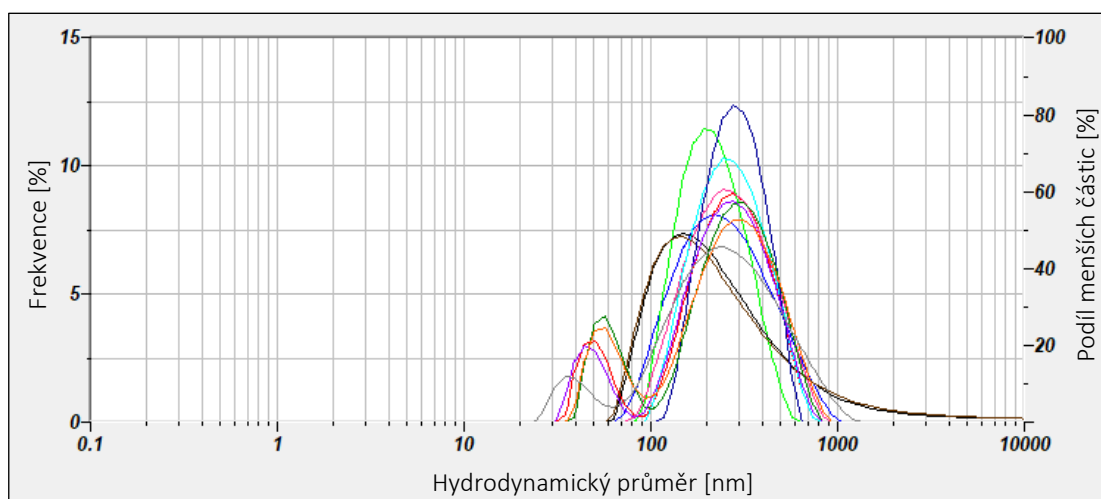
Fyzikálně-chemická charakterizace částic, zahrnující měření hydrodynamické velikosti, polydisperzního indexu a zeta potenciálu, byla provedena na přístroji SZ-100 nanopartica v prostředí deionizované vody podle kapitoly 3.7. Suspenze částic mohou vykazovat úzký rozsah velikostí a tvořit jednu velikostní populaci, pak je označujeme jako monodisperzní. Naopak polydisperzní suspenze vykazují širší distribuci velikostí a mohou obsahovat dvě či více odlišných velikostních populací částic. Toto se dá při měření ověřit pomocí měření v polydisperzním módu.

Cílem bylo připravit monodisperzní suspenze částic, přesto některá z opakování vykazovala více než jednu velikostní populaci. Rozdíl v monodisperzní a polydisperzní formě měření je znázorněn na obrázcích 11 a 12. Na obrázcích je znázorněn histogram distribuce velikosti částic, který zobrazuje závislost mezi hydrodynamickým průměrem částic a jejich relativní četností. Tato data byla získána analýzou autokorelační funkce intenzity rozptýleného světla v čase pomocí softwaru přístroje. Na obrázku 11 můžeme vidět 10 z měření velikosti kopírující jeden pík a pak 2 měření s píky mírně posunutými vlevo značící částice o menší velikosti.



Obrázek 11: Distribuce velikosti částic (12 měření) – monodisperzní forma

Naopak na obrázku 12 je znázorněno 5 měření s 2 velikostními populacemi a i ostatní píky nejsou tak uniformní jako v monodisperzním módu.



Obrázek 12: Distribuce velikosti částic (12 měření) – polydisperzní forma

Toto bylo zohledněno i při zpracování výsledků. Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti, PDI a zeta potenciálu částic ze tří opakování ($n = 3$) jsou uvedeny v tabulce 7, včetně směrodatných odchylek.

Tabulka 7: Fyzikálně-chemická charakterizace částic CS/TPP ($n = 3$)

Průměrná hodnota	Hydrodynamická velikost [nm]	Polydisperzní index	Zeta potenciál [mV]
CS/TPP	$178,6 \pm 4,9$	$0,384 \pm 0,045$	$65,0 \pm 0,6$

Přípravené částice měly vhodnou velikost, PDI a zeta potenciál pro provedení dalších experimentů, ale v případě potřeby by se tyto parametry daly upravit, jelikož jsou ovlivněny

řadou faktorů, jako je iontová síla, postup míchání, koncentrace a poměr CS a TPP, stupeň deacetylace a molekulová hmotnost chitosanu, teplota a pH [101].

Velikost částic získaná pomocí DLS se obvykle vyjadřuje pomocí parametru „z-průměrná velikost“, což je intenzitně vážený průměr hydrodynamické velikosti částic (nm) a zároveň hlavní a nejspolehlivější parametr používaný při analýze velikosti částic [140, 141]. Velikost připravených částic činila $178,6 \pm 4,9$ nm a částice lze tedy přesněji označit za malé submikročástice [99]. Polydisperzní měření velikosti částic odhalilo u části výsledků jednoho ze vzorků dvě velikostní populace. První populace částic měla hydrodynamickou velikost $48,8 \pm 7,9$ nm a druhá $291,5 \pm 12,7$ nm. Studie zdůrazňují, že pro dosažení úzké distribuce velikosti částic je mimo jiné zásadní postupné a rovnoměrné přidávání TPP do roztoku CS [81]. Pro zajištění opakovatelných a monodisperzních výsledků by proto bylo vhodné využít např. automatické dávkovací zařízení, nebo aby se alespoň magnetická míchadla v lékovkách, ve kterých příprava probíhala otáčela totožným způsobem, což se ne vždy povedlo zajistit. Průměrná velikost připravených částic však odpovídá typickým rozměrům chitosanových částic získaných metodou ionotropní gelace. Ty se obvykle pohybují v širokém rozmezí desítek až stovek nanometrů v závislosti na podmínkách přípravy [101].

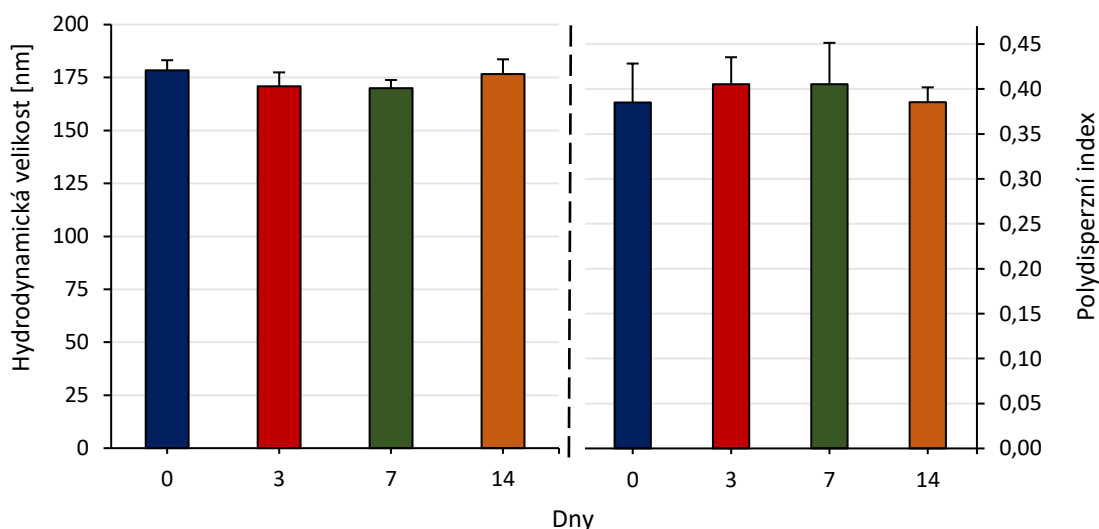
Polydisperzní index je bezrozměrné číslo, které slouží k hodnocení míry disperzity velikostí částic v suspenzi. Čím nižší je hodnota PDI, tím homogennější je suspenze. Za monodisperzní je považován vzorek, jehož hodnota PDI nepřesahuje 0,1 [146]. Obecně se jako optimální uznává $PDI < 0,3$, avšak hodnoty do 0,5 jsou stále přijatelné [218]. Naopak $PDI > 0,7$ signalizuje širokou distribuci velikostí a výraznou polydisperzitu systému, která pro následné experimenty a použití není obvykle vhodná [141]. V tomto případě byla naměřena hodnota PDI $0,384 \pm 0,045$, což značí relativně homogenní systém s přijatelnou úrovní disperzity.

Zeta potenciál měřený metodou ELS udává povrchový náboj částic. Tento náboj je zásadní pro elektrostatické interakce mezi částicemi, jejich stabilitu v suspenzi a také pro jejich schopnost se vzájemně přitahovat nebo odpuzovat. Stabilní suspenze částic musí mít zeta potenciál vyšší než ± 30 mV. Tyto hodnoty zajišťují dobrou koloidní stabilitu díky vysoké energetické bariéře mezi částicemi, které pak nemají tendenci se shlukovat [10, 218]. Chitosanové částice s TPP mají obvykle vysoký pozitivní náboj, což je dáno přítomností protonovaných aminových skupin chitosanu v kyselém pH [103]. Tomu odpovídá i náš výsledek zeta potenciálu, který byl $65,0 \pm 0,6$ mV. Připravené částice lze tedy považovat za stabilní a lze odhadovat, že mohou vhodně interagovat s negativně nabitou membránou buněk. Tyto vlastnosti byly také následně experimentálně ověřeny.

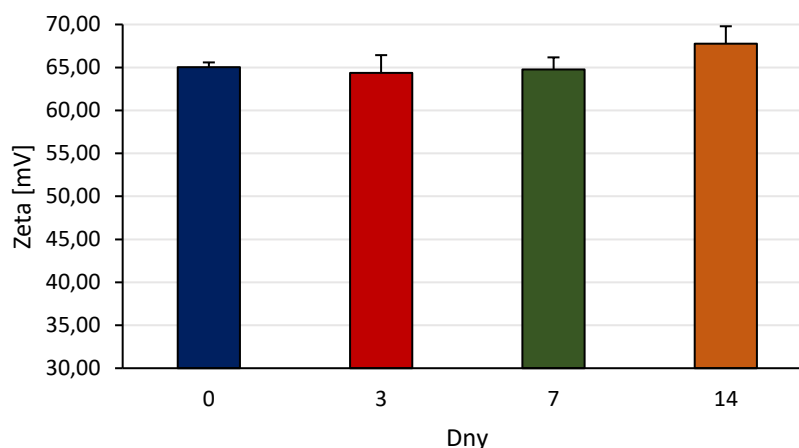
Ve srovnání s přípravou chitosanových částic s původním zdrojem [102] byla DLS velikost částic z nízkomolekulárního chitosanu (při objemovém poměru CS a TPP 5:1) 200 ± 24 nm, s hodnotou PDI 0,227 a zeta potenciálem 25 ± 3 mV. Naše částice jsou přibližně o 20 nm menší, avšak současně vykazují vyšší hodnotu PDI, která je v našem případě více než 0,150 vyšší, což značí širší distribuci velikosti částic. I v jejich případě však měření pomocí polydisperzního módu odhalilo dvě velikostní populace: menší o velikosti přibližně 40 nm a větší okolo 250 nm, což víceméně odpovídá i našim výsledkům polydisperzního vzorku. Naopak zeta potenciál našich částic byl výrazně vyšší, což naznačuje vysokou stabilitu částic.

4.1.1. Vyhodnocení krátkodobé stability částic

Krátkodobá stabilita připravených částic CS/TPP, která vypovídala o další charakteristice částic, byla sledována po dobu 14 dnů na základě změn jejich fyzikálně-chemických charakteristik v čase, jak je popsáno v kapitole 3.8. Měřena byla hydrodynamická velikost, PDI a zeta potenciál ihned po přípravě a následně po 3, 7 a 14 dnech. Výsledky velikosti a PDI jsou graficky znázorněny v grafu 1, zeta potenciál je znázorněn v grafu 2.



Graf 1: Stabilita částic CS/TPP – DLS a PDI (n = 3)



Graf 2: Stabilita částic CS/TPP – zeta potenciál (n = 3)

Díky naměřené vysoké hodnotě zeta potenciálu, který slouží jako prediktivní faktor stability se potvrdilo, že připravené koloidní suspenze částic jsou stabilní. U částic nebyl pozorován ani po 14 dnech nárůst velikosti, který by byl způsoben jejich agregací a shlukováním či kontrakcí nebo bobtnáním jednotlivých částic. Výsledky ukazují dokonce zmenšení částic po 14 dnech o 1,54 %, což je stále reprodukovatelné a je to v rámci běžné odchylky mezi jednotlivými měřeními. Nebyl tedy pozorován nárůst velikosti částic více než 10 % a částice lze charakterizovat jako stabilní [213, 210]. Můžeme vidět, že ani zeta potenciál se v rámci 14 dní nijak zásadně nezměnil. Dá se odhadovat, že tyto suspenze částic by vykazovaly ještě nějakou dobu stabilitu, avšak dlouhodobé skladování by nebylo vhodné, protože kromě rizika agregace či případného uvolňování naloženého léčiva hrozí také např. bakteriální kontaminace suspenze [145].

4.2. Příprava částic se zachyceným proteinem

Submikročástice z CS se zachyceným nejprve modelovým proteinem a poté EGF byly sestrojeny se zamýšleným použitím jakožto nosičový systém poskytující kontrolované uvolňování GF k hojení převážně chronických ran, jelikož je dokázáno, že dodávání exogenních GF hojení podporuje a urychluje [7, 8]. Vlastnosti CS, uvedené v teoretické části práce, z něj činí skvělý materiál k tomuto použití.

Metoda zachycení (entrapment) byla zvolena pro vazbu proteinů s částicemi, jelikož vykazuje stabilnější profil uvolňování proteinu bez výrazných počátečních explozivních uvolňování (tzv. burst release) v porovnání s adsorpčními metodami. Zároveň poskytuje ochranu GF před enzymatickou degradací, která představuje jednu z největších limitací léčby volnými GF. A v neposlední řadě se jedná o velice jednoduchý proces, kdy se pouze přidá vodný roztok proteinu do roztoku CS před přidáváním TPP [8, 16, 133].

Částice z chitosanu a tripolyfosfátu sodného v objemovém poměru 5:1 byly připraveny podle kapitoly 3.5., v jejichž struktuře byl při procesu ionotropní gelace zachycen ovalbumin nebo EGF. Během přípravy bylo přidáno vždy 150 µg příslušného proteinu v objemu 1 ml. V návaznosti na další experimenty byl celkový objem suspenze navýšen na 9 ml z důvodu získání 2 mg částic pro experiment sledování kinetiky uvolňování proteinu.

Po přípravě byla provedena fyzikálně-chemická charakterizace částic s cílem zjistit jak se vybrané parametry (velikost, PDI a zeta potenciál) částic se zachyceným proteinem změní oproti částicím bez proteinu. Případné změny bývají ovlivněny fyzikálně-chemickými vlastnostmi jednotlivých proteinů, zejména jejich molekulovými hmotnostmi a isoelektrickým bodem [117]. Epidermální růstový faktor je peptid o molekulové hmotnosti přibližně 6 kDa s isoelektrickým bodem 4,6. V hodnotách pH ve kterých se experiment pohyboval má tedy negativní náboj [9, 47]. Oproti tomu modelový protein ovalbumin z vaječného bílku, který se často využívá díky nízké pořizovací ceně, stabilitě a dobré charakterizaci pro různé studie zachycení a uvolňování léčiv z nosičových systémů, je větší protein o molekulové hmotnosti přibližně 45 kDa. Jeho isoelektrický bod okolo 4,6 mu opět v tomto případě propůjčuje negativní náboj [215, 216].

Průměrné hodnoty parametrů fyzikálně-chemické charakterizace jsou pro částice s OVA i EGF uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Fyzikálně-chemická charakterizace částic se zachyceným proteinem v polymerní matici (n = 3)

Průměrná hodnota	Hydrodynamická velikost [nm]	Polydisperzní index	Zeta potenciál [mV]
CS/TPP (OVA)	195,1 ± 6,5	0,352 ± 0,013	56,8 ± 1,1
CS/TPP (EGF)	204,1 ± 6,0	0,465 ± 0,053	44,1 ± 3,2

Polydisperzní měření velikosti částic odhalilo u dvou vzorků obou proteinů dvě velikostní populace. U částic s OVA byla hodnota průměrné hydrodynamické velikosti první populace 66,8 ± 3,3 nm a druhé 313,8 ± 13,4 nm. U částic s EGF měla první populace velikost 61 ± 12,5 nm a druhá 328,5 ± 15,0 nm. V obou případech můžeme pozorovat mírný nárůst velikosti částic s proteinem oproti částicím bez proteinu. Trend nárůstu velikosti po začlenění proteinu do struktury částic dokládají např. i výsledky studií [13, 128], přičemž studie [9, 128] zmiňují vliv koncentrace proteinu na velikost částic. Také bylo ovšem pozorováno, že s nárůstem objemu suspenze částic vzrůstá i jejich průměrná velikost. To dokládá například

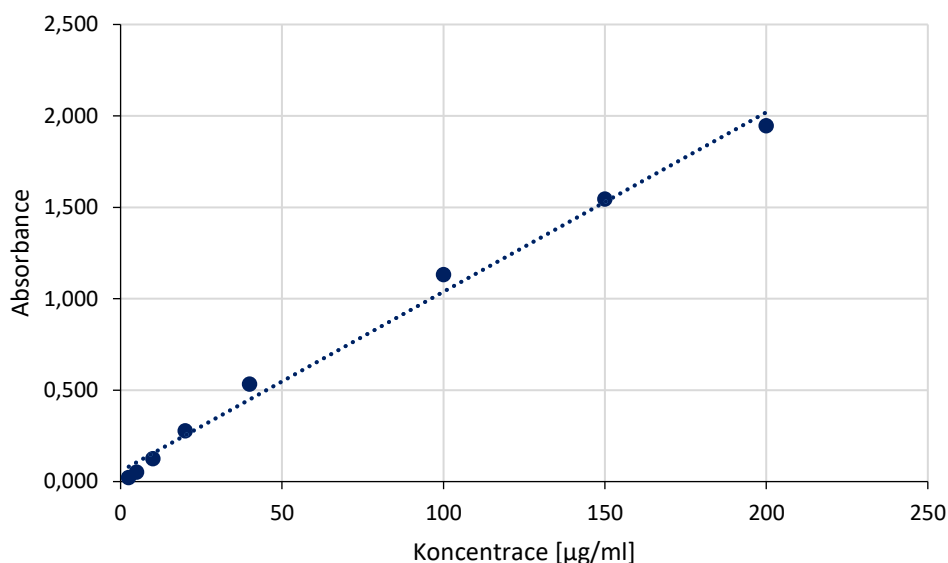
vzorek připravený s EGF pro fluorescenční mikroskopii podle kapitoly 3.9., kdy byl protein přidán v menším objemu a zároveň objem CS a TPP nebyl navýšen. Pozorovaná velikost částic s proteinem pak nebyla větší oproti částicím bez proteinu.

Hodnoty PDI naopak ukazují pro oba proteiny rozdílné výsledky. Částice se zachyceným OVA měly hodnotu PDI $0,352 \pm 0,013$, což značí pokles míry polydisperzity suspenze oproti částicím bez proteinu. Naproti tomu částice se zachyceným EGF vykazovaly hodnoty PDI $0,465 \pm 0,053$, což představuje už znatelný nárůst polydisperzity suspenze oproti částicím bez proteinu, ale i tak je to stále přijatelná hodnota polydisperzity, jelikož je $< 0,5$ [218].

Zeta potenciál částic se po zachycení proteinů do částic v obou případech snížil. Zachycení ovalbuminu vedlo ke snížení zeta potenciálu o necelých 10 mV oproti částicím bez proteinu. Po zachycení EGF byla hodnota zeta potenciálu dokonce o přibližně 20 mV nižší v porovnání s částicemi bez proteinu. Ve studii [13] lze pozorovat ještě výraznější snížení zeta potenciálu, přibližně o polovinu po zachycení EGF nebo pouze mírné snížení zeta potenciálu po zachycení BSA ve struktuře částic ve studii [145]. Tento jev lze vysvětlit negativním nábojem proteinů, který částečně neutralizuje kladně nabitě aminoskupiny CS, přičemž část proteinů bývá zachycena i na povrchu částic [13].

4.2.1. Účinnost vazby proteinu do struktury částic

U připravených částic se zachycenými proteiny byla pro stanovení skutečného množství proteinu, které se zachytilo ve struktuře částic, provedena nepřímá metoda stanovení proteinu v supernatantu pomocí BCA testu v mikrotitrační destičce (podle kapitoly 3.5.1.). Dvě hodnoty absorbance pro každé ze tří opakování byly vyhodnoceny pomocí lineární rovnice $y = 0,0098x + 0,0566$ ($R^2 = 0,9923$), získané z kalibrační křivky sestavené z roztoků OVA v koncentracích 0–200 $\mu\text{g/ml}$ v deionizované vodě, měřených na spektrofotometru Multiscan RC (viz graf 3).



Graf 3: Kalibrační závislost stanovení proteinu CS/TPP – metoda v mikrotitrační destičce

Ze získaných hodnot koncentrací byla vypočítána pro oba proteiny účinnost zachycení proteinu podle rovnice 2 a vazebná kapacita nosiče podle rovnice 3. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Účinnost zachycení proteinu v polymerní matici částic (n = 3)

Průměrná hodnota	Účinnost zachycení proteinu [%]	Vazebná kapacita nosiče [µg/2mg]
CS/TPP (OVA)	86,1 ± 0,52	64,46 ± 0,40
CS/TPP (EGF)	87,8 ± 0,39	65,87 ± 0,29

V obou případech bylo dosaženo vysoké účinnosti zachycení proteinu a podobné hodnoty vazebné kapacity nosiče. Z celkového množství vloženého ovalbuminu, které bylo 150 µg bylo v částicích zachyceno 86,1 ± 0,52 %, což odpovídá 129,16 ± 0,78 µg. V případě EGF byla účinnost zachycení proteinu 87,8 ± 0,39 %, což odpovídá 131,74 ± 0,58 µg z celkových vložených 150 µg EGF.

Chitosanové částice mají obecně poměrně vysokou vazebnou kapacitu proteinů, která je opět zprostředkována zejména elektrostatickými interakcemi, ale u jiných částic i možností chemické modifikace CS [7,9,13]. V diplomové práci [209] byly připraveny a charakterizovány stejné částice se zachyceným OVA a EGF a bylo dosaženo srovnatelných výsledků účinnosti zachycení – konkrétně 86,47 % pro OVA a 86,19 % pro EGF. Naše mírně vyšší hodnota u EGF může být způsobena např. větší velikostí připravených částic se zachyceným EGF, které tak

mohly pojmout nepatrně více proteinu do struktury. Ve studii [13] byla hodnota účinnosti zachycení EGF ve struktuře částic CS/TPP 70 % z původní vložené koncentrace EGF 1 mg/ml.

4.2.2. Kinetika uvolňování proteinů z lyofilizovaných částic

Uvolňování léčiva je důležitým faktorem pro zajištění vysoké reprodukovatelnosti, stability, kontroly kvality a vědeckého základu pro vývoj CS částic. Uvolňování léčiva ovlivňuje několik faktorů, včetně složení, poměru složení, interakcí složek a metod přípravy [117].

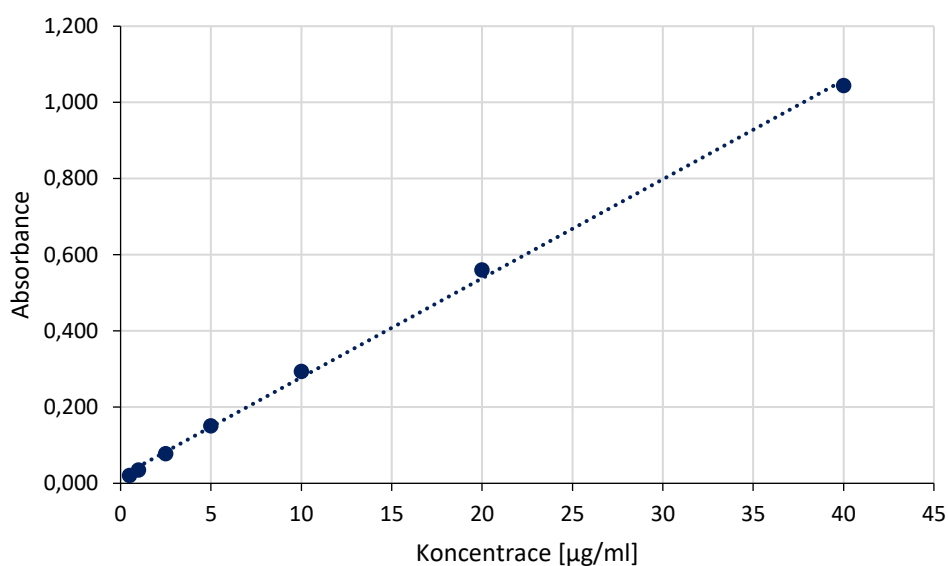
Lyofilizace je jednou z nejúčinnějších strategií pro dlouhodobé skladování částic v suchém stavu. Tato technika je obzvláště účinná u částic naložených proteiny a dalšími molekulami citlivými na vysoké teploty, jelikož na rozdíl od dalších využívaných metod, jako je např. sprejové vysušování, pracuje s nízkou teplotou. Při správně optimalizovaném procesu s využitím kryoprotektiv dochází k minimalizaci degradačních změn a k zachování biologické aktivity inkorporovaných složek [201, 204].

Sledování kinetiky uvolňování proteinů z částic CS/TPP bylo provedeno po jejich lyofilizaci, jelikož profily uvolňování proteinů z částic po přípravě bylo již zkoumáno v předchozí diplomové práci [209]. Připravené částice se zachyceným OVA nebo EGF byly lyofilizovány podle metody v kapitole 3.11. s přídavkem trehalózy, jakožto kryoprotektiva, aby se zabránilo agregaci částic, denaturaci či poškození proteinu a zároveň se zlepšila jejich následné redisperze v rozpouštědle. Opětovná dispergovatelnost je definována jako schopnost vysušených částic vrátit se do původního stavu ve vodném systému, hodnocená z hlediska velikosti částic, PDI a morfologie [145]. Trehalóza se několika autory uvádí jako jeden z nejlepších kryoprotektiv pro CS částice [145,199].

Cílem bylo stanovit profil uvolňování proteinů z částic po lyofilizaci a zjistit, zda je nějak ovlivněn lyofilizačním procesem. Uvolňování obou proteinů bylo sledováno v prostředí fosfátového pufru o pH 7,3, který modeluje vnitřní prostředí lidského těla s pH přibližně 7,4 [155]. Jak již bylo nastíněno, nejlepších výsledků modelování složitějšího prostředí rány, ať už akutní či chronické, by bylo dosaženo v případě sestrojení komplexního roztoku nejen s obdobnými hodnotami pH, ale také s obdobnou viskozitou, iontovou silou a přítomností enzymů, kterých se v tekutině rány vyskytuje celá řada. V průběhu procesu hojení se zároveň hodnota pH mění a v případě kolonizace bakteriemi je celé složení exsudátu ovlivněno [7, 10, 57]. Ovšem pro zjednodušení a dobrou porovnatelnost jak s výsledky řady studií, tak výsledků profilů uvolňování proteinů bez procesu lyofilizace byl zvolen právě fosfátový pufr o pH 7,3 a teplota 37 °C, což je přibližně teplota lidského těla. Uvolňování probíhalo za mírného otáčení

během 7 dní, kdy byla stanovena hodnota koncentrace uvolněného proteinu v supernatantu po 30, 60, 90, 120 minutách, 24, 48 hodinách a 1 týdnu odebráním alikvotů o objemu 1 ml a následným doplněním objemu čerstvým médiem.

Vzhledem k očekávaným nižším koncentracím uvolněného proteinu v supernatantu byla zvolena citlivější metoda BCA testu v mikrozkušavkách s nižším detekční limitem. Kalibrační křivka sestavená pomocí kalibračních roztoků OVA ve fosfátovém pufru o pH 7,3 byla změřena na spektrofotometru PowerWave HT při 570 nm (viz graf 4). Pomocí získané lineární rovnice: $y = 0,026x + 0,0181$ ($R^2 = 0,9986$) byly vypočteny koncentrace proteinů v alikvotech.



Graf 4: Kalibrační závislost stanovení uvolněného proteinu – metoda v mikrozkušavkách

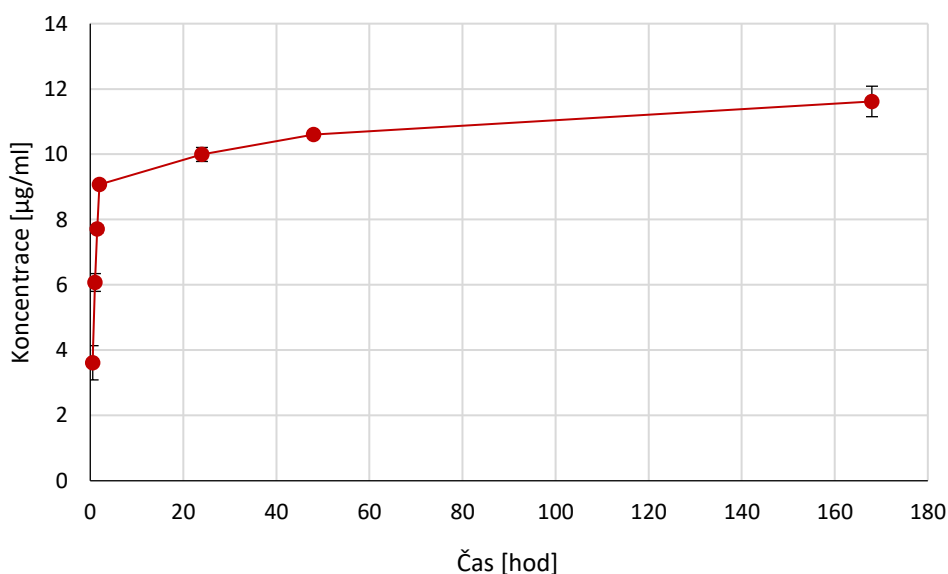
Kinetika uvolňování zachyceného ovalbuminu ze struktury částic

Průměrné koncentrace modelového proteinu OVA v alikvotech včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v tabulce 10 v jednotkách μg/ml a v procentech z celkového zachyceného množství proteinu vypočítaných podle rovnice 5.

Tabulka 10: Naměřené koncentrace uvolněného OVA ze struktury částic po lyofilizaci (n = 3)

Doba uvolňování	Naměřené koncentrace OVA [$\mu\text{g/ml}$]	Naměřené koncentrace OVA [%]
30 minut	$3,61 \pm 0,52$	$2,83 \pm 0,41$
60 minut	$2,46 \pm 0,27$	$1,92 \pm 0,21$
90 minut	$1,64 \pm 0,13$	$1,28 \pm 0,10$
120 minut	$1,37 \pm 0,04$	$1,07 \pm 0,03$
24 hodin	$0,92 \pm 0,21$	$0,72 \pm 0,17$
48 hodin	$0,61 \pm 0,05$	$0,48 \pm 0,04$
1 týden	$1,013 \pm 0,47$	$0,79 \pm 0,37$

Ze získaných hodnot koncentrací OVA byl následně kumulativní metodou, tedy postupným přičítáním uvolněného proteinu graficky znázorněn profil uvolňování proteinu, což je uvedeno v grafu 5.



Graf 5: Kinetika uvolňování zachyceného OVA z lyofilizovaných částic – kumulativní metoda (n = 3)

Získaný profil uvolňování zachyceného OVA ze struktury částic vykazuje charakteristické rysy, které jsou často popisovány u částic z CS – tzv. burst release, následovaný pomalejším stabilním uvolňováním [9, 10, 133, 145].

Tzv. burst release, kdy se hned v prvních 30 minutách uvolnilo nejvíce proteinu za celou dobu experimentu, konkrétně $3,61 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$, lze přičítat především uvolnění molekul

proteinu navázaných pouze slabými interakcemi na povrchu částic. Tento jev, ale s menšími přírůstky koncentrací uvolněného OVA dále pokračoval přibližně do doby 120 minut, kdy se uvolnilo poměrně velké množství proteinu. Konkrétně se v tomto časovém období uvolnilo přibližně 9,08 µg/ml (7,10 %) z $129,16 \pm 0,78$ µg zachycených v částicích [7, 152].

Po této fázi dochází k výraznému zpomalení uvolňování proteinu i když se jednotlivé časové období mezi odběry výrazně prodlužuje a naměřená koncentrace OVA v těchto alikvotech se pohybuje okolo 1 µg/ml. Stabilní konstantní uvolňování proteinu bývá způsobeno difúzí proteinu skrz polymerní matici a v pozdějších stádiích i postupným rozpadem samotné struktury částic a kombinací těchto dvou mechanismů [7, 152].

Celkové množství uvolněného OVA za celou dobu experimentu činilo 11,62 µg/ml, což představuje 9,09 % z celkového zachyceného množství proteinu a většina proteinu tak zůstala stále zachycena ve struktuře částic. V porovnání s dostupnou literaturou se jedná o poměrně nízkou míru uvolnění, což může být důsledkem silnějších interakcí mezi proteinem a maticí, vyšší mírou zesíťování nebo vysokou stabilitou částic [117]. Nasvědčuje tomu i fakt, že byly částice připraveny z CS s vysokým stupněm deacetylce (75–85 %), který bývá zodpovědný za formaci částic s hustější strukturou díky většímu množství dostupných kationtů a aniontů a zároveň s nízkou molekulovou hmotností, jež omezuje tvorbu výrazně porézních částic [145, 168].

Konkrétně studie s modelovým proteinem BSA vykazují mnohem vyšší míru uvolňování proteinu. Ve studii [128] se např. uvolnilo z CS částic v prvních 24 hodinách $6,10 \pm 0,55$ % zachyceného BSA. Poté se v průběhu 2 týdnů pozvolným uvolňováním uvolnilo kumulativní metodou dokonce $72,56 \pm 6,67$ % BSA. U lyofilizovaných CS/TPP částic připravených ve studii [145] bylo pozorováno počáteční explozivní uvolňování v průběhu prvních 12 hodin a poté se uvolnilo pozvolným uvolňováním celkových 44,3 % BSA za 6 dní, přičemž tato studie také uvádí, že podmínky přípravy a lyofilizace nezpůsobily žádnou nevratnou agregaci nebo štěpení proteinů.

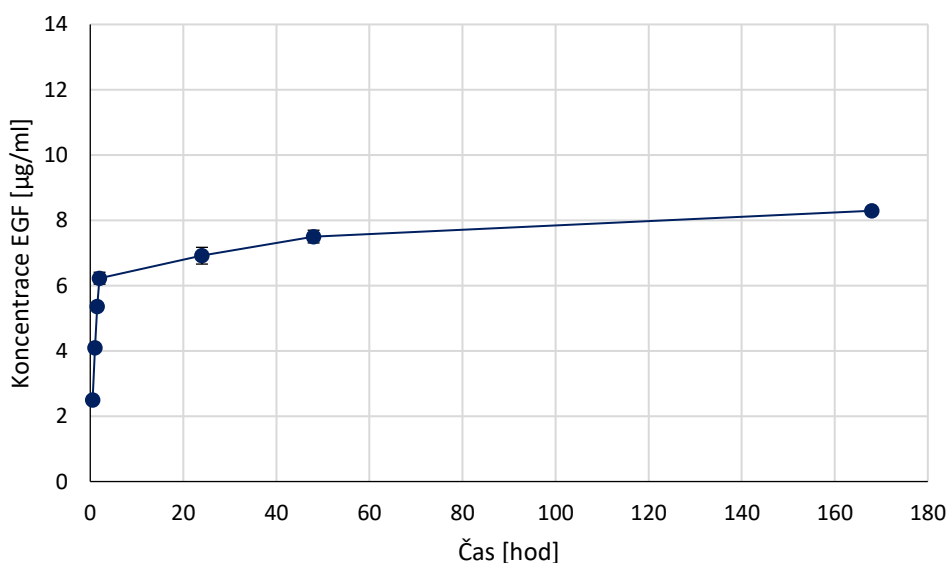
Kinetika uvolňování zachyceného epidermálního růstového faktoru ze struktury částic

Totožný experiment sledování kinetiky uvolňování proteinu byl proveden i pro částice CS/TPP se zachyceným EGF. Jednotlivé naměřené koncentrace uvolněného EGF z částic jsou pro všechny časové body uvedeny v tabulce 11 v µg/ml i v procentech z celkového zachyceného množství proteinu.

Tabulka 11: Naměřené koncentrace EGF v alikvotech po uvolnění ze struktury částic po lyofilizaci (n = 3)

Doba uvolňování	Naměřené koncentrace EGF [$\mu\text{g/ml}$]	Naměřené koncentrace EGF [%]
30 minut	$2,50 \pm 0,04$	$1,89 \pm 0,03$
60 minut	$1,61 \pm 0,07$	$1,22 \pm 0,05$
90 minut	$1,27 \pm 0,04$	$0,96 \pm 0,03$
120 minut	$0,86 \pm 0,18$	$0,65 \pm 0,14$
24 hodin	$0,69 \pm 0,26$	$0,52 \pm 0,19$
48 hodin	$0,59 \pm 0,20$	$0,44 \pm 0,15$
1 týden	$0,79 \pm 0,07$	$0,60 \pm 0,06$

Kumulativní metoda – přičítání koncentrací uvolněného EGF z částic je znázorněna v grafu 6.



Graf 6: Kinetika uvolňování zachyceného EGF z lyofilizovaných částic – kumulativní metoda (n = 3)

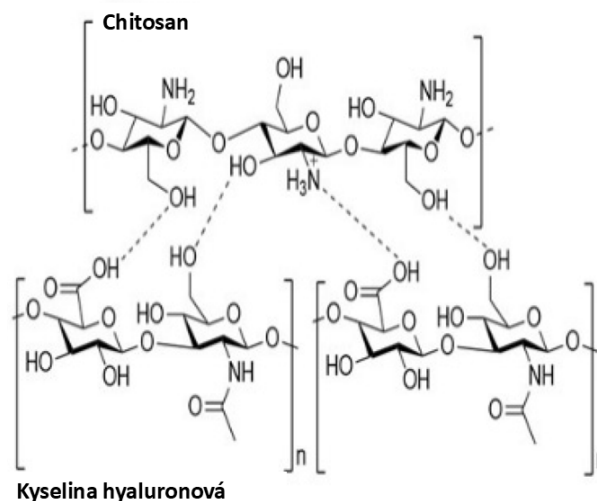
I v tomto případě lze pozorovat typický profil uvolňování proteinu z CS částic s počátečními vyššími koncentracemi uvolněného proteinu. Vzhledem k nízké míře uvolňování obou proteinů z těchto částic však tento jev není tak výrazný jako v jiných případech [7]. Tyto vyšší hodnoty by se daly charakterizovat do časového období 90–120 minut, kdy se uvolnilo dohromady $6,23 \mu\text{g/ml}$, což představuje $4,73 \%$ z celkových zachycených $131,74 \pm 0,58 \mu\text{g}$ EGF.

Stabilní konstantní uvolňování představovalo mírné přírůstky koncentrace EGF a celkové množství uvolněného EGF z částic za celý experiment činilo 8,29 $\mu\text{g/ml}$, představující 6,3 % z celkového zachyceného množství. V porovnání např. s výsledky v práci [10], kdy se z CS částic se zachyceným EGF do roztoku simulující rány o pH 7,4 při 37 °C uvolnilo rychlým uvolňováním 22,03 \pm 0,28 % EGF za prvních 24 hodin, a po 72 hodinách to bylo dokonce 67,57 \pm 0,38 %, v tekutině byl však také protein savináza, který napodobil prostředí rány. Studie [7] ukazuje dokonce uvolnění 68,84 \pm 1,53 % EGF z modifikovaných CS částic za 2 h a poté 85,50 \pm 3,08 % po 24 h, což představuje více než 16x větší množství uvolněného EGF než v našem případě po 24 hodinách.

Získaný výsledek však může být relevantní pro aplikace, kde je žádoucí dlouhodobé uvolňování s minimální počáteční ztrátou proteinu, kterou je právě hojení ran anebo tam kde je EGF klíčem k receptorem zprostředkovanému zachycení částic na vnímavé buňky [44]. EGF je efektivní již v malých dávkách. V případě vysokého nárazového počátečního uvolnění EGF, by mohlo docházet k toxicitě a jak je známo, vysoké dávky EGF mohou dokonce podporovat existující malignity [64, 65].

4.3. Příprava částic z chitosanu a kyseliny hyaluronové s proteiny

Kyselina hyaluronová je přírodní lineární mukopolysacharid složený ze střídavě se opakujícího N-acetylglukosaminu a glukuronového disacharidu a tvoří hlavní složku ECM. Je biologicky odbouratelná, biokompatibilní, netoxická a vysoce hydrofilní. Kromě schopnosti specificky cílit na receptory CD44 a zprostředkovávat endocytózu prostřednictvím nich, se HA často využívá pro modifikace lékových nosičů např. ke zvýšení biokompatibility, stability, ovlivnění povrchového náboje, zlepšení kontrolovaného uvolňování či pro její hydratační a regenerační vlastnosti. Její negativní náboj jí umožňuje jednoduchou elektrostatickou adsorpci na CS částice. Tato interakce CS a HA je znázorněna na obrázku 13 [116, 168, 221, 219]. HA se přirozeně vyskytuje v širokém rozmezí molekulových hmotností. V tomto případě byla použita hyaluronová kyselina HYSILK s molekulovou hmotností přibližně 150–350 kDa.



Obrázek 13: Elektrostatické interakce mezi CS a HA [221]

Nejprve byly připraveny jednoduché částice z CS a TPP v objemovém poměru 5:1 stejně jako v kapitole 3.3. Následovala fyzikálně-chemická charakterizace částic před provedením dialýzy v acetátovém pufru o pH 5.

Dialýza částic probíhala v dialyzačním střívku Biotech CE Tubing s MWCO 300 kD v acetátovém pufru o pH 5 k odstranění zbytkových nízkomolekulárních látek, především volného TPP a nezreagovaného chitosanu, a zároveň k úpravě pH prostředí před následným obalením kyselinou hyaluronovou rozpuštěnou ve stejném pufru.

Nejprve byl postup otestován připravením jednoduchých částic obalených HA bez proteinu a poté bylo cílem upravit postup pro začlenění proteinu do částic obalených HA. Většina studií využívající částice na bázi CS/TPP s proteinem/peptidem nebo léčivem obalené kyselinou hyaluronovou pracuje s částicemi, ve kterých je látka zachycena ve struktuře částic při jejich formaci [116, 217, 220]. V takových případech by však mohlo docházet k uvolňování proteinu z částic v průběhu následující dialýzy, tím snížení účinnosti zachycení proteinu a ke ztížení přesného stanovení zbylého proteinu v částicích. Dialýza totiž probíhá v minimálně stonásobku objemu částic a byla by tak potřeba velmi citlivá metoda stanovení. MicroBCA test by již pravděpodobně neposkytl dostatečně citlivé výsledky.

Z uvedených důvodu bylo 150 μg proteinu rozpuštěného v acetátovém pufru o celkovém objemu 75 μl přidáno do přefiltrovaného roztoku HA, do kterého byly následně za míchání přikapávány dialyzované částice CS/TPP v objemovém poměru 1:1 a tím byl protein zachycen v obalu částic. Formace částic se projevila opalescencí suspenze, která byla vizuálně patrná na rozdíl od čiré suspenze částic neobalených. Podle dostupné literatury se zdá, že tato strategie přípravy nebyla dosud popsána. Z důvodu ztráty proteinu nebyla provedena dialýza po obalení částic k odstranění nenavázané HA a v suspenzi se tak mohlo vyskytovat určité množství volné

HA. Tento nežádoucí zbytek by bylo možné do určité míry odstranit také pomocí centrifugace částic a jejich následné redispergace v čerstvém rozpouštědle, k čemuž došlo i při přípravě vzorku na lyofilizaci a následném experimentu uvolňování proteinu.

Obalené částice byly nejprve charakterizovány v prostředí, ve kterém byly připraveny, tedy v acetátovém pufru o pH 5. Toto prostředí se však ukázalo jako nevhodné pro měření zeta potenciálu částic, který vykazoval velmi nízké hodnoty okolo $-2,5 \pm 0,5$ mV a velice nestabilní částice [10]. Z tohoto důvodu bylo měření zopakováno s naředěním vzorku deionizovanou vodou, ve které byly měřeny i všechny předchozí neobalené částice. Zároveň je také známo, že změny pH vedou ke zdatelným změnám zeta potenciálu [81]. V tomto případě byl zeta potenciál výrazně negativnější a pohyboval se pod -20 mV. Velikost částic a hodnota PDI však zůstaly v obou prostředích srovnatelné. Konkrétní hodnoty fyzikálně-chemické charakterizace CS/TPP jsou uvedeny po přípravě před dialýzou a následně po obalení HA, jak pro částice bez proteinu, tak s modelovým proteinem OVA v tabulce 12.

Tabulka 12: Fyzikálně-chemická charakterizace částic obalených kyselinou hyaluronovou a s OVA (n = 3)

Průměrná hodnota		Hydrodynamická velikost [nm]	Polydisperzní index	Zeta potenciál [mV]
(CS/TPP)-HA	částice před obalením	$173,9 \pm 10,5$	$0,405 \pm 0,009$	$62,2 \pm 5,0$
	částice po obalení HA	$233,6 \pm 7,1$	$0,461 \pm 0,063$	$-25,9 \pm 4,1$
(CS/TPP)-OVA-HA	částice před obalením	$182,4 \pm 9,5$	$0,362 \pm 0,020$	$60,1 \pm 3,2$
	částice po obalení HA	$222,2 \pm 11,6$	$0,401 \pm 0,020$	$-22,8 \pm 1,0$

V případě částic (CS/TPP)-HA výsledky ukazují, že se DLS velikost zvedla z původních $173,9 \pm 10,5$ nm na $233,6 \pm 7,1$ nm. Můžeme tedy pozorovat zvětšení průměru částic po obalení HA přibližně o 60 nm, což naznačuje, že se částice pokryly vrstvou o velikosti přibližně 30 nm. Můžeme pozorovat, že obalením částic se zvyšuje i jejich PDI. Polydisperzní měření velikosti však ukázalo, že i když měla část měření částic před obalením dvě velikostní populace, tak po jejich obalení se sice zvýšila velikostní distribuční šíře (hodnocená pomocí PDI), ale částice byly v rámci jen jedné širší populace. Zeta potenciál se z původní vysoké kladné hodnoty změnil na $-25,9 \pm 4,1$ mV, což značí, že je obal dostatečně velký, aby zakryl a zneutralizoval pozitivní náboj CS. Studie však uvádí možnost přípravy CS částic s menším

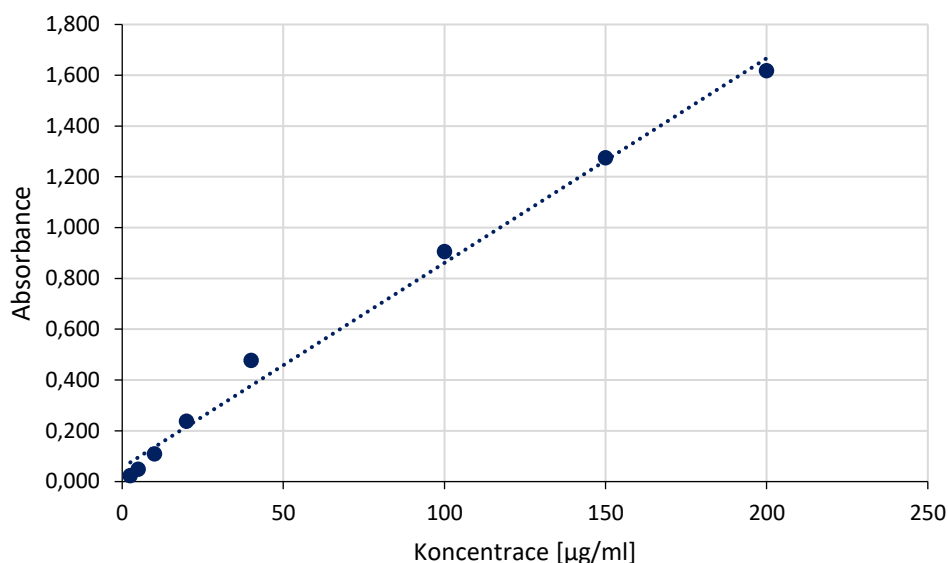
povlakem HA, které si zachovávají kladný zeta potenciál a tím pádem nedochází ke snižování nespecifického transportu skrz buněčnou membránu [116, 220].

Částice (CS/TPP)-HA se zachycených OVA vykazovaly podobné výsledky. Tím, že byl protein přidán v minimálním objemu (75 μ l) se nijak zásadně neovlivnil výsledný objem suspenze a odpadl tedy případný vliv nárůstu velikosti se zvýšením objemu suspenze. Velikost částic se po obalení zvýšila z původních $182,4 \pm 9,5$ nm na $222,2 \pm 11,6$ nm. HA v tomto případě vytvořilo povrchovou vrstvu o průměru přibližně 20 nm. PDI bylo zvýšeno na hodnotu $0,401 \pm 0,020$ a zeta potenciál se z původní vysoké kladné hodnoty změnil na $-22,8 \pm 1,0$ mV. Ovšem zeta potenciál částic jak s proteinem tak bez, nedosahuje hodnoty větší než ± 30 mV a částice je tak nutno hodnotit jako mírně nestabilní, přičemž hrozí riziko jejich agregace [10, 218].

V práci [168] vytvořili částice obalené HA z CS o různých molekulových hmotnostech bez vázaného proteinu. Částice připravené z CS o molekulové hmotnosti 325 kDa měly průměrnou hydrodynamickou velikost 263 ± 38 nm a PDI $0,25 \pm 0,02$. Po obalení se velikost zvýšila na 303 ± 59 nm, přičemž hodnota PDI se změnila jen nepatrně. Zeta potenciál se z původní kladné hodnoty 41 ± 3 mV změnil na -58 ± 2 mV. Obal z HA tak vytvořil vrstvu přibližně o průměru 20 nm, což odpovídá našim výsledkům obalených částic s proteinem. V jejich případě však částice vykazují daleko větších hodnot negativního zeta potenciálu a jsou stabilní.

4.3.1. Účinnost vazby proteinu do obalu částic

Účinnost zachycení OVA do obalu částic byla hodnocena obdobně jako u neobalených částic, podle kapitoly 3.5.1. Výsledky mají pilotní charakter, přičemž částice byly charakterizovány pouze s použitím modelového proteinu OVA. Charakterizace částic se zachyceným EGF nebyla provedena z časových důvodů. Byla připravena kalibrační řada roztoků OVA v acetátovém pufru o pH 5, které představovalo i prostředí připravených obalených částic. Kalibrační řada byla změřena na spektrofotometru Multiscan RC při 570 nm, byla sestrojena kalibrační křivka (graf 7) a získána rovnice linearit $y = 0,0081x + 0,0552$ ($R^2 = 0,9921$).



Graf 7: Kalibrační závislost stanovení proteinu v částicích CS/TPP obalených HA – metoda v mikrotitrační destičce

S pomocí získané rovnice linearity byly přepočítány hodnoty absorbance na hodnotu koncentrace a s využitím rovnice 2 byla stanovena účinnost zachycení proteinu. Vazebná kapacita částic vztažená na 2 mg nebyla hodnocena z důvodu neznámého množství nezreagované HA, a tedy i nemožnosti přesně stanovit hmotnost částic po jejich obalení. Účinnost zachycení OVA v částicích je uvedena v tabulce 13.

Tabulka 13: Účinnost zachycení ovalbuminu v obalu částic (n = 3)

Průměrná hodnota	Účinnost zachycení proteinu [%]
(CS/TPP)-OVA-HA	89,3 ± 0,23

Účinnost zachycení OVA do obalu částic představuje $89,7 \pm 0,23$ % a z celkového množství 150 µg tak bylo zachyceno $133,96 \pm 0,35$ µg. Tato hodnota představuje vysokou účinnost vazby a naznačuje, že strategie zachycení proteinu po formaci částic při jejich obalování vrstvou HA poskytuje účinnou metodu bez rizika uvolňování proteinu v předchozích krocích nebo při samotném obalování.

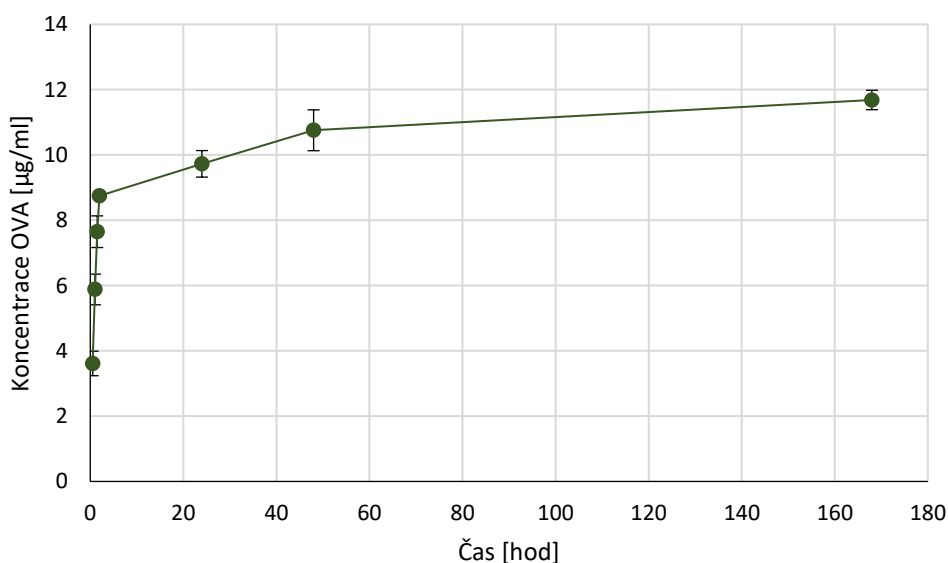
4.3.2. Kinetika uvolňování proteinu z obalu částic po lyofilizaci

Obalené částice byly lyofilizovány stejným způsobem jako částice neobalené, podle kapitoly 3.11. s přidavkem kryoprotektiva trehalózy. Prostředí pro uvolňování o pH 7,3 mělo v tomto případě vyšší hodnotu pH, oproti pH suspenze částic před lyofilizací (pH 5). Jednotlivé naměřené koncentrace alikvotů pro všechny časové body měření jsou v $\mu\text{g/ml}$ a v procentech z celkového zachyceného množství proteinu v tabulce 14.

Tabulka 14: Naměřené koncentrace OVA v alikvotech po uvolnění z obalu částic po lyofilizaci (n = 2)

Doba uvolňování	Naměřené koncentrace OVA [$\mu\text{g/ml}$]	Naměřené koncentrace OVA [%]
30 minut	$3,24 \pm 0,38$	$2,42 \pm 0,28$
60 minut	$2,27 \pm 0,47$	$1,69 \pm 0,35$
90 minut	$1,77 \pm 0,48$	$1,32 \pm 0,36$
120 minut	$1,09 \pm 0,09$	$0,82 \pm 0,07$
24 hodin	$0,98 \pm 0,41$	$0,73 \pm 0,30$
48 hodin	$1,03 \pm 0,63$	$0,77 \pm 0,47$
1 týden	$0,93 \pm 0,30$	$0,69 \pm 0,22$

Z jednotlivých hodnot byl postupným přičítáním koncentrací uvolněného OVA z částic sestaven graf znázorňující profil uvolňování v rámci 1 týdnu (graf 8).



Graf 8: Kinetika uvolňování zachyceného OVA z obalu lyofilizovaných částic – kumulativní metoda (n = 2)

Lze opět pozorovat dvoufázový profil uvolňování OVA z částic. Explosivnější fáze trvala asi do 90 minut, kdy se uvolnilo přibližně 7,28 µg/ml, odpovídající 5,43 % z $133,96 \pm 0,35$ µg celkového zachyceného množství v obalu částic. Poté následovaly přírůstky okolo 1 µg/ml. Celkové množství uvolněného proteinu za 1 týden činilo přibližně 11,31 µg/ml, představující 8,44 % ze zachyceného množství proteinu v obalu částic.

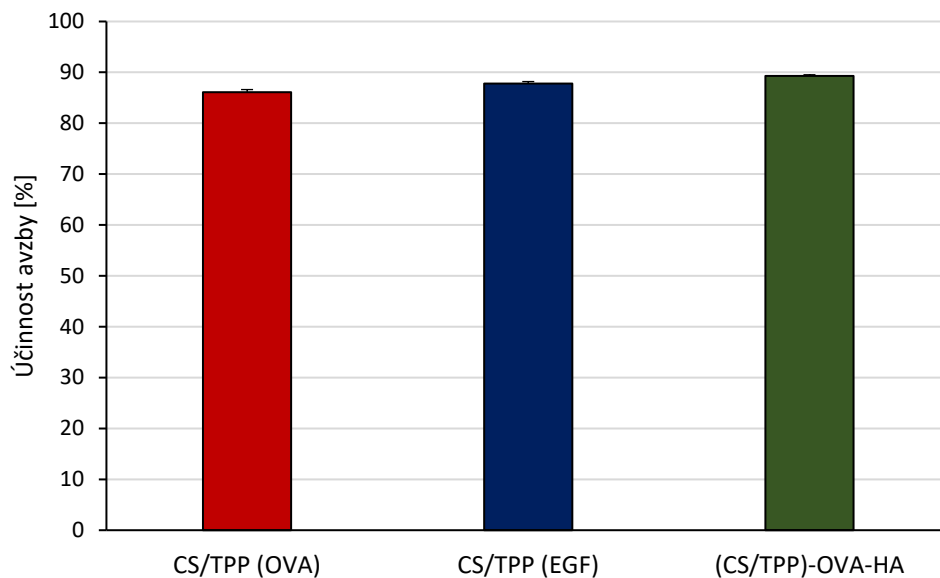
Obalení částic se zachycenými proteiny/léčivými pomocí HA zpravidla zvyšuje jejich strukturální stabilitu, zpomaluje uvolňování účinné látky a snižuje počáteční explozivní uvolňování, zejména v kyselém prostředí, kterým může být i prostředí rány [116, 155, 219]. Tento typ částic často vykazuje dvoufázový profil uvolňování, přičemž HA omezuje difúzi v důsledku zvýšených zesíťovacích interakcí mezi složkami [116, 217, 219].

Vzhledem k tomu, že v tomto případě byl protein zachycen pouze v obalové vrstvě částic a nikoliv v polymerní matici vytvořené během ionotropní gelace, bylo původně předpokládáno, že jeho uvolňování bude rychlejší než u částic, kde je protein zachycen v rámci celé matrice. Získané výsledky však naznačují, že se protein zachytil na povrch kladně nabitých částic a elektrostatické interakce byly dostatečně silné, aby se protein uvolňoval pozvolna a pomalu. K celkovému zpomalení mohlo přispět také to, že po lyofilizaci trvá delší dobu, než se HA obal v médiu plně rehydratuje. Navíc potažení HA také zvyšuje velikosti částic a médiu tak může trvat déle než pronikne k polymerní matici [116].

4.4. Porovnání účinnosti vazby a uvolňování proteinů z lyofilizovaných částic

Tato kapitola se zaměřuje na porovnání účinnosti vazby a profilů uvolňování proteinu z jednotlivých částic, včetně částic před lyofilizací. Cílem je posoudit, jak lyofilizace částic CS/TPP se zachyceným proteinem ovlivnila uvolňování v testovaných podmínkách.

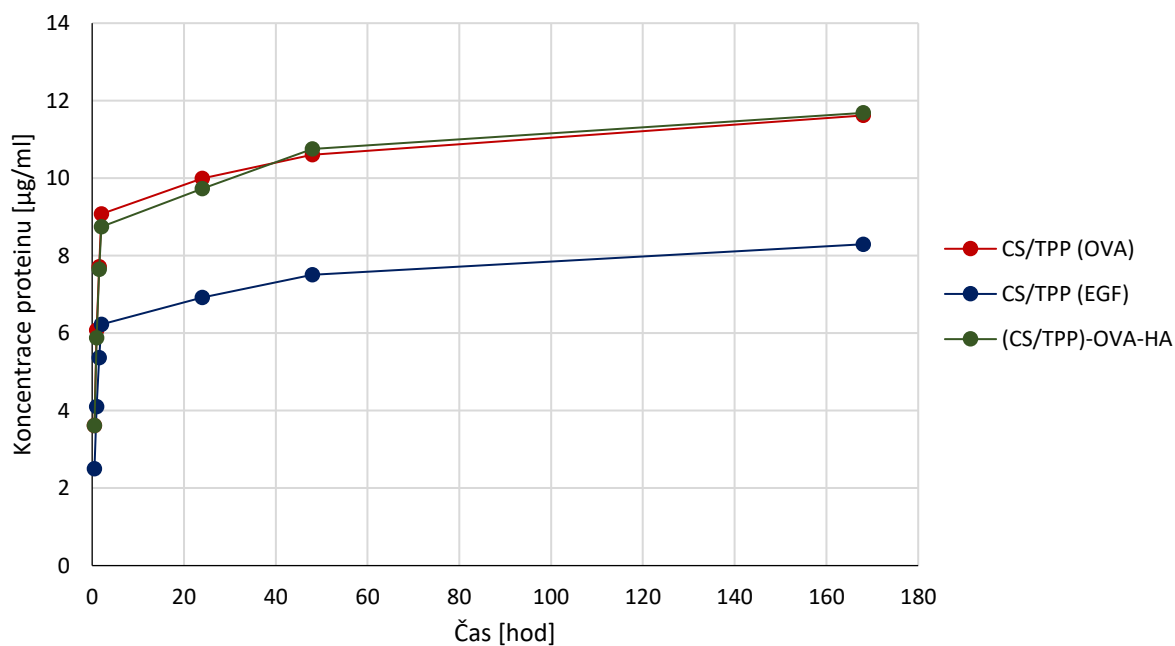
Porovnání účinnosti vazby OVA a EGF v částicích CS/TPP a vazby OVA v HA obalu částic CS/TPP je znázorněno v grafu 9.



Graf 9: Porovnání účinnosti vazby proteinu v částicích (n = 3)

Účinnost vazby proteinu v připravených částicích byla téměř totožná. Zachycení OVA v obalu částic bylo jen nepatrně vyšší, což lze pravděpodobně přičíst zdvojnásobení množství materiálu po přidání HA a zvětšení velikosti částic.

Profily uvolňování proteinů ve všech připravených částicích jsou souhrnně uvedeny v grafu 10, směrodatné odchylky jsou uvedeny v grafech v předchozích kapitolách uvolňování pro jednotlivé částice zvlášť.



Graf 10: Porovnání uvolňování proteinu z jednotlivých částic – kumulativní metoda (CS/TPP se zachyceným OVA a EGF: n = 3; (CS/TPP)-OVA-HA: n = 2)

Zachycený EGF v částicích CS/TPP po lyofilizaci se uvolňoval v nejnižší míře, přičemž lze pozorovat celý profil posunutý níže oproti uvolňování OVA. Ovalbumin vykazoval vyšší míru uvolňování a měl skoro shodný profil uvolňování jak z polymerní matrice částic CS/TPP, tak z hyaluronového obalu částic (CS/TPP)-OVA-HA. Největší celkové množství OVA se uvolnilo z polymerní matrice CS částic a činilo 11,62 µg/ml, poté následovaly obalené částice s uvolněným množstvím 11,31 µg/ml. Oproti tomu EGF se uvolnilo pouze 8,29 µg/ml.

Oproti studiu uvolňování proteinu z čerstvých částic po přípravě v diplomové práci [209] byl vynechán odběr alikvotu v časovém bodě 15 minut z důvodu, aby se lyofilizované částice stihly pořádně redispergovat a rehydrovat po přidání média. Výsledky uvolňování OVA z polymerní matrice částic po přípravě bez lyofilizace v diplomové práci [209] ukazují nejprve nižší přírůstky koncentrací OVA v prvních 120 minutách inkubace, poté okolo 1 µg/ml za den a největší přírůstek byl po týdnu inkubace. Celkově se uvolnilo 8,39 µg/ml ovalbuminu neboli 5,97 %, což je menší hodnota než po lyofilizaci (11,62 µg/ml). Uvolňování zachyceného EGF z částic po přípravě vykazovalo opačný trend. V prvních 30 minutách se uvolnila největší koncentrace EGF celkem 6,23 µg/ml, představující 4,33 % z celkového zachyceného množství. Poté koncentrace uvolněného EGF kolísaly, přičemž celkové množství uvolněného proteinu činilo 16,62 µg/ml neboli 11,54 %. Profil uvolňování proteinu z obalených částic HA před lyofilizací není znám, protože částice byly nově připraveny a experiment v tomto stavu se neprováděl.

Vyšší míra uvolňování EGF z částic po přípravě v [209] byla přičítána jeho nižší molekulové hmotnosti ve srovnání s OVA, což usnadnilo difuzi proteinu ven skrz polymerní matrici. Po lyofilizaci se však tento efekt obrátil a uvolňování EGF výrazně pokleslo. Jedním z možných vysvětlení mohou být strukturální změny polymerní matrice. Podle literatury může během lyofilizace dojít ke kolapsu vnitřní porézní sítě a ke vzniku souvislých filmovitých oblastí tvořících makroporézní struktury. Tato struktura může omezit difuzi menších molekul, jako je EGF. Naproti tomu větší molekuly, jako je ovalbumin, mohou být méně silně vázány nebo se během procesu dostat blíže k povrchu částic, což může vést k mírnému zvýšení jejich uvolňování [228].

4.5. Studium interakce částic s buněčnou linií A549

Aby mohla být léčiva či jiné bioaktivní molekuly terapeuticky účinné, musí nejprve překonat buněčnou bariéru. Z tohoto důvodu se studují interakce částic s buňkami, zejména z hlediska jejich internalizace, která významně ovlivňuje jak terapeutickou účinnost nanonosičů, tak i jejich cytotoxicitu [162]. I když většina studií zaměřených na vývoj CS částic s vázaným

EGF k hojení ran studuje migrace buněk, *in vivo* a *in vitro* hojení ran, obvykle nezohledňuje, zda inkorporovaný EGF zvyšuje buněčnou internalizaci částic [7, 9, 10, 13, 76]. Tento faktor by však mohl přinést cenné informace o jejich chování v terapeutickém kontextu. Z výzkumu nosičů pro cílenou terapii rakoviny totiž víme, že EGF může významně zvýšit buněčnou internalizaci částic prostřednictvím EGFR-zprostředkované endocytózy [74, 222].

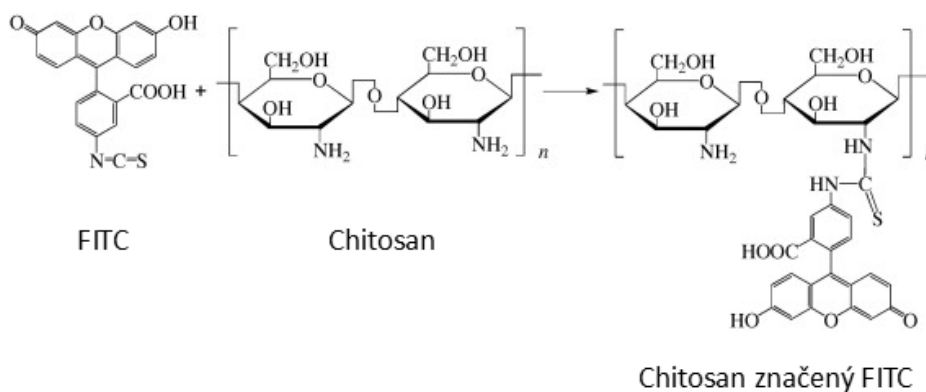
Z tohoto důvodu byla testována míra buněčné internalizace samotných částic CS/TPP a částic CS/TPP se zachyceným EGF. Pro sledování míry buněčné internalizace byly částice fluorescenčně značeny barvivem FITC. Ke studiu byla použita buněčná linie A549, která je odvozena z adenokarcinomu plicního bazálního epitelu a vykazuje charakteristické rysy alveolárních buněk typu II. Tato linie byla původně získána odebráním a kultivací rakovinné tkáně plic 58letého muže kavkazské rasy [175, 223].

Tato buněčná linie byla zvolena, jelikož buňky A549 vykazují vysokou expresi EGFR, což potvrzuje např. studie Tseng & Lin (2008), kde bylo 92,4 % buněk pozitivních na EGFR, oproti tomu např. normálních plicních fibroblastů (HFL1) bylo pozitivních pouze 34,2 %. Tato vysoká exprese může vést k výraznému vychytávání EGF-modifikovaných částic, což je činí citlivé k EGF a vhodné ke studiu EGFR-zprostředkované endocytózy [222]. Kromě toho má také nízký nukleocytoplazmatický poměr a často se tak využívá pro fluorescenční mikroskopii a různé testování cytotoxicity částic [116, 172, 223].

Interakce částic s buňkami byla studována pouze u neobalených chitosanových částic. Fluorescenční značení a interakce s buňkami nebyly testovány u částic po jejich obalení kyselinou hyaluronovou, přestože tento povrchový obal by mohl umožnit specifické cílení prostřednictvím receptorů CD44, které jsou také ve zvýšené míře exprimovány nádorovými buňkami linie A549 [116]. To by mohla být náplň dalších experimentů v této oblasti výzkumu. Vzhledem k negativnímu zeta potenciálu připravených částic by mohlo však docházet k elektrostatickému odpuzování od negativně nabitých buněčných membrán, což by mohlo výrazně snižovat jejich nespecifickou internalizaci. Hlavním faktorem bylo však, že v této práci neproběhla optimalizace podmínek přípravy, aby se podařilo dosáhnout dostatečné stability těchto částic, jelikož naměřená hodnota zeta potenciálu nebyla větší než -30 mV a mohlo by tak dojít k jejich agregaci během centrifugace či po přidání do kultivačního média. To by mohlo způsobit falešně nízké výsledky buněčné internalizace částic.

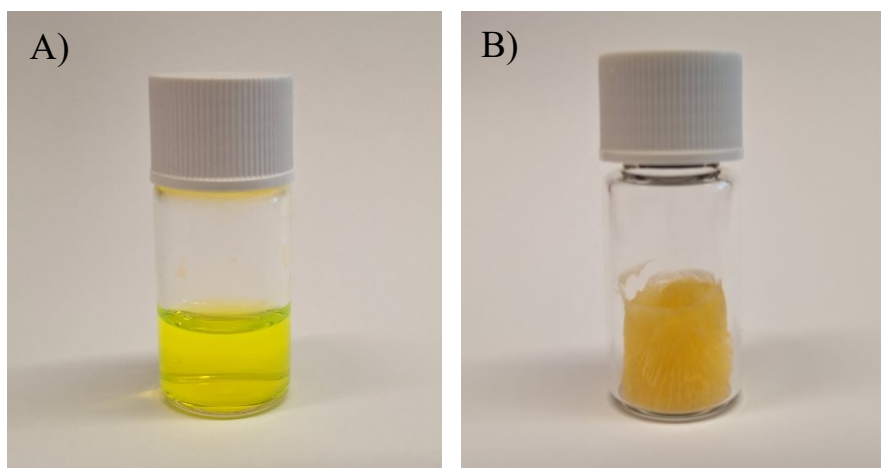
4.5.1. Příprava a charakterizace fluorescenčně značených částic

Chitosan byl značen molekulou FITC ještě před přípravou částic, aby se zabránilo možné disociaci barviva (podle kapitoly 3.4.) [175]. Samotná reakce značení chitosanu FITC proběhla prostřednictvím kovalentní vazby mezi izothiokyanátovou skupinou FITC a primární aminoskupinou D-glukosaminu, jak je znázorněno na obrázku 14 [182].



Obrázek 14: Reakce značení chitosanu pomocí FITC, upraveno dle [182]

Tím vznikl žlutý roztok chitosanu, zobrazený na obrázku 15A. Tento roztok byl následně lyofilizován za účelem zajištění jeho dlouhodobé stability. Lyofilizovaný vzorek tmavší barvy je ukázán na obrázku 15B. Ze značeného roztoku chitosanu byly připraveny nejprve částice bez proteinu, aby byla otestována míra jejich pohlcení buňkami bez cílení na konkrétní receptory.



Obrázek 15: Chitosan značený FITC po přípravě a po lyofilizaci

Proces internalizace chitosanových částic je ovlivněn, mimo jiné, velikostí a povrchovým nábojem, proto je značný zájem o kontrolu jejich průměrné velikost, polydisperzity a zeta potenciálu [101, 163]. Fyzikálně-chemické parametry fluorescenčně značených částic jsou uvedeny v tabulce 15.

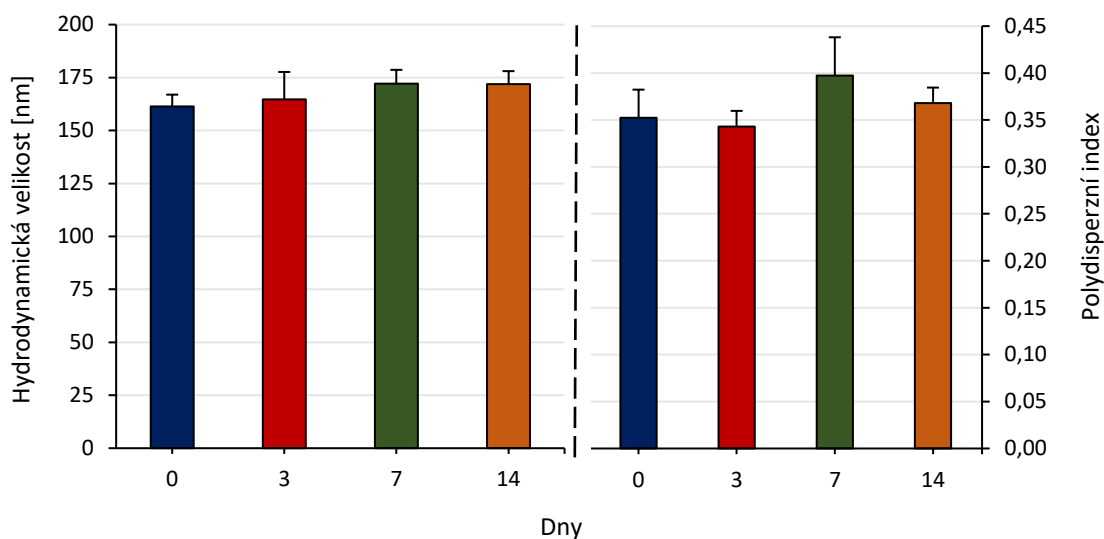
Tabulka 15: Fyzikálně-chemická charakterizace FITC značených částic CS/TPP (n = 3)

Průměrná hodnota	Hydrodynamická velikost [nm]	Polydisperzní index	Zeta potenciál [mV]
FITC-CS/TPP	166,0 ± 5,8	0,361 ± 0,001	69,7 ± 0,86

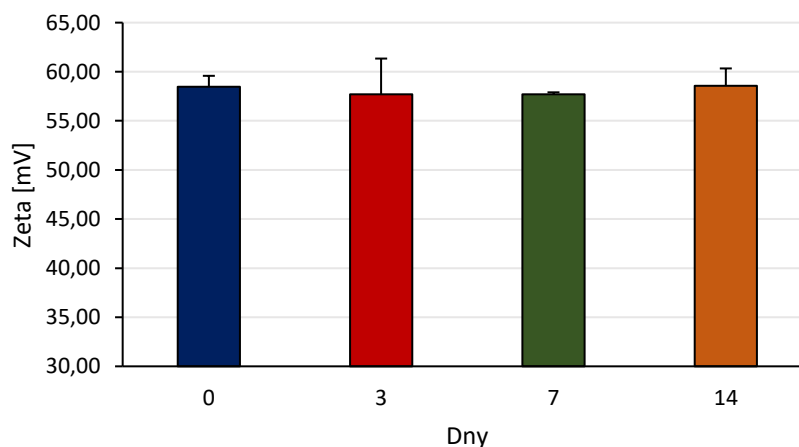
Hydrodynamická velikost těchto částic byla $166,0 \pm 5,8$ nm, což je o něco menší než velikost částic z chitosanu neznačeného. Polydisperzní měření odhalilo u části výsledků 2 velikostní populace: první o velikosti $41,4 \pm 3,1$ nm a druhá o velikosti $270,3 \pm 6,2$ nm. Uvedená hodnota PDI značí, že suspenze značených částic je dokonce více monodisperzní. Naopak zeta potenciál byl naměřen větší a to přibližně 69,7 mV, jedná se tedy o velice stabilní částice. Uvedené hodnoty naznačují, že označení chitosanu pomocí jeho vazby s FITC negativně neovlivňuje uvedené fyzikálně-chemické vlastnosti částic, naopak je dokonce mírně zlepšuje. Ovlivnění hodnot může být zapříčiněno tím, že chitosan prošel procesem lyofilizace, byl při procesu 2x rozpuštěn v kyselém vodném roztoku nebo samotnou přítomností a interakcemi s molekulou FITC.

4.5.2. Vyhodnocení krátkodobé stability částic

Vzhledem k případným prodlevám mezi přípravou částic a ovlivněním buněk byla stanovena jejich stabilita v čase, aby se ověřilo zda fluorescenční značení CS nemá vliv na jejich stabilitu. Postup proběhl podle kapitoly 3.8. stejně jako u neznačených částic. Fyzikálně-chemické parametry částic (hydrodynamická velikost, PDI a zeta potenciál) byly stanoveny po přípravě a následně po 3, 7 a 14 dnech. Mezi tím byly částice skladovány při 4 °C v temnu. Výsledky hydrodynamické velikosti a PDI jsou graficky znázorněny v grafu 11. Výsledky zeta potenciálu částic jsou pak uvedeny v grafu 12.



Graf 11: Stabilita částic FITC-CS/TPP - DLS a PDI (n = 3)



Graf 12: Stabilita částic FITC-CS/TPP – zeta potenciál (n = 3)

Po 14 dnech byl pozorován mírný nárůst velikosti o 6,53 %, což je stále méně než 10 % a částice lze označit jako stabilní a vhodné pro krátkodobé skladování [213]. Ani ostatní sledované parametry nebyly nijak významně ovlivněny.

4.5.3. Hodnocení interakce částic s EGF s buněčnou linií A549

Byl proveden pilotní experiment s přípravou jednoho vzorku částic CS/TPP bez proteinu a jednoho vzorku částic CS/TPP se zachyceným EGF, ty byly následně charakterizovány a poté použity k hodnocení interakce s buňkami A549. Jejich fyzikálně-chemické parametry jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Fyzikálně-chemická charakterizace FITC značených částic CS/TPP s a bez EGF použitých pro hodnocení interakce s buňkami (průměr z 12 měření)

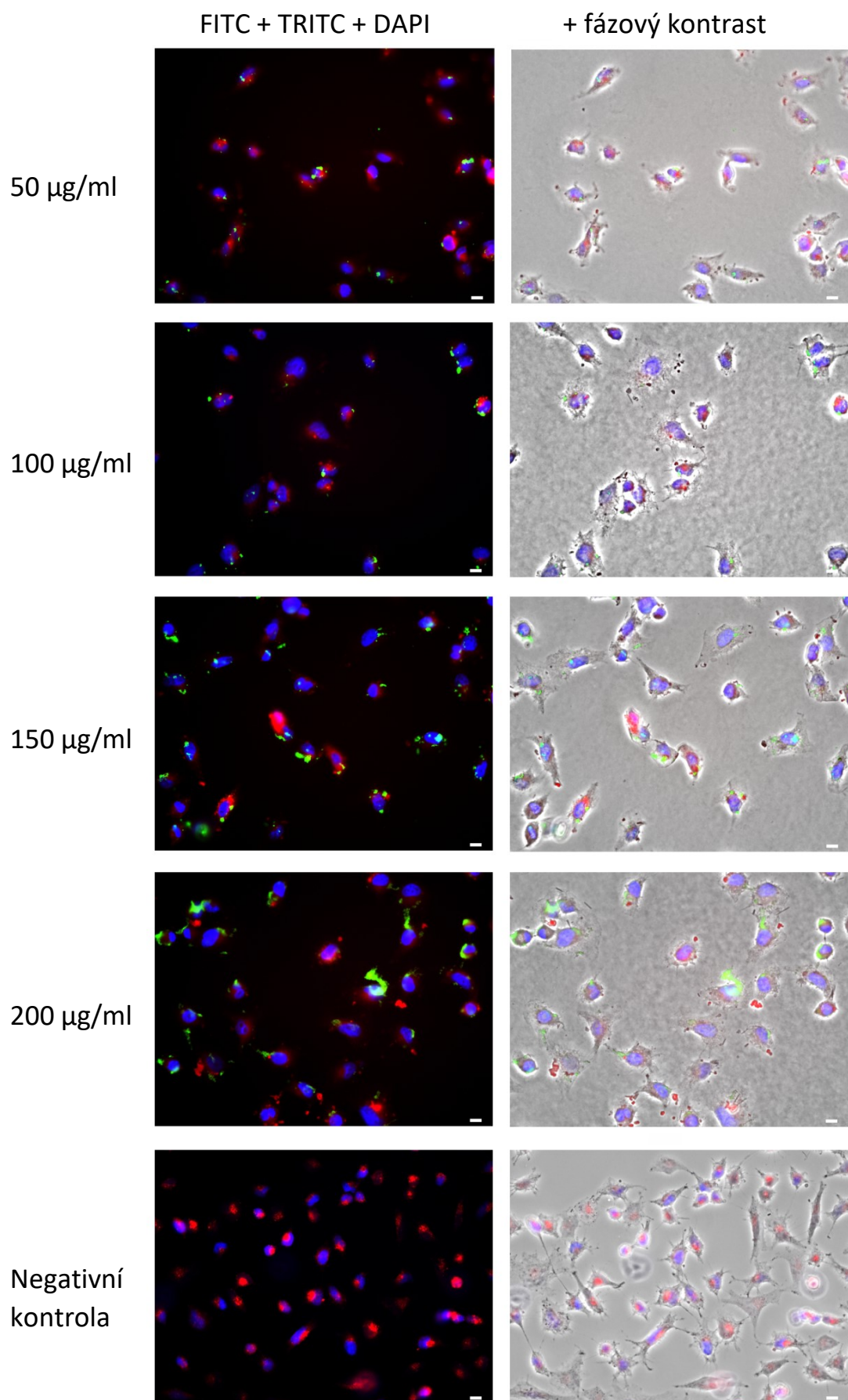
1 vzorek	Hydrodynamická velikost [nm]	Polydisperzní index	Zeta potenciál [mV]
FITC-CS/TPP	168,4 ± 7,3	0,369 ± 0,079	54,3 ± 2,3
FITC-CS/TPP (EGF)	169,0 ± 2,2	0,367 ± 0,031	44,7 ± 2,2

Velikost částic bez EGF byla menší než 200 nm, což naznačuje, že budou internalizovány pomocí mechanismů pinocytózy [163]. Tento připravený vzorek byl jen mírně polydisperzní a u části měření byly odhaleny 2 velikostní populace – první o velikosti $52,14 \pm 12,43$ nm a druhá o velikosti $268,7 \pm 15,22$ nm.

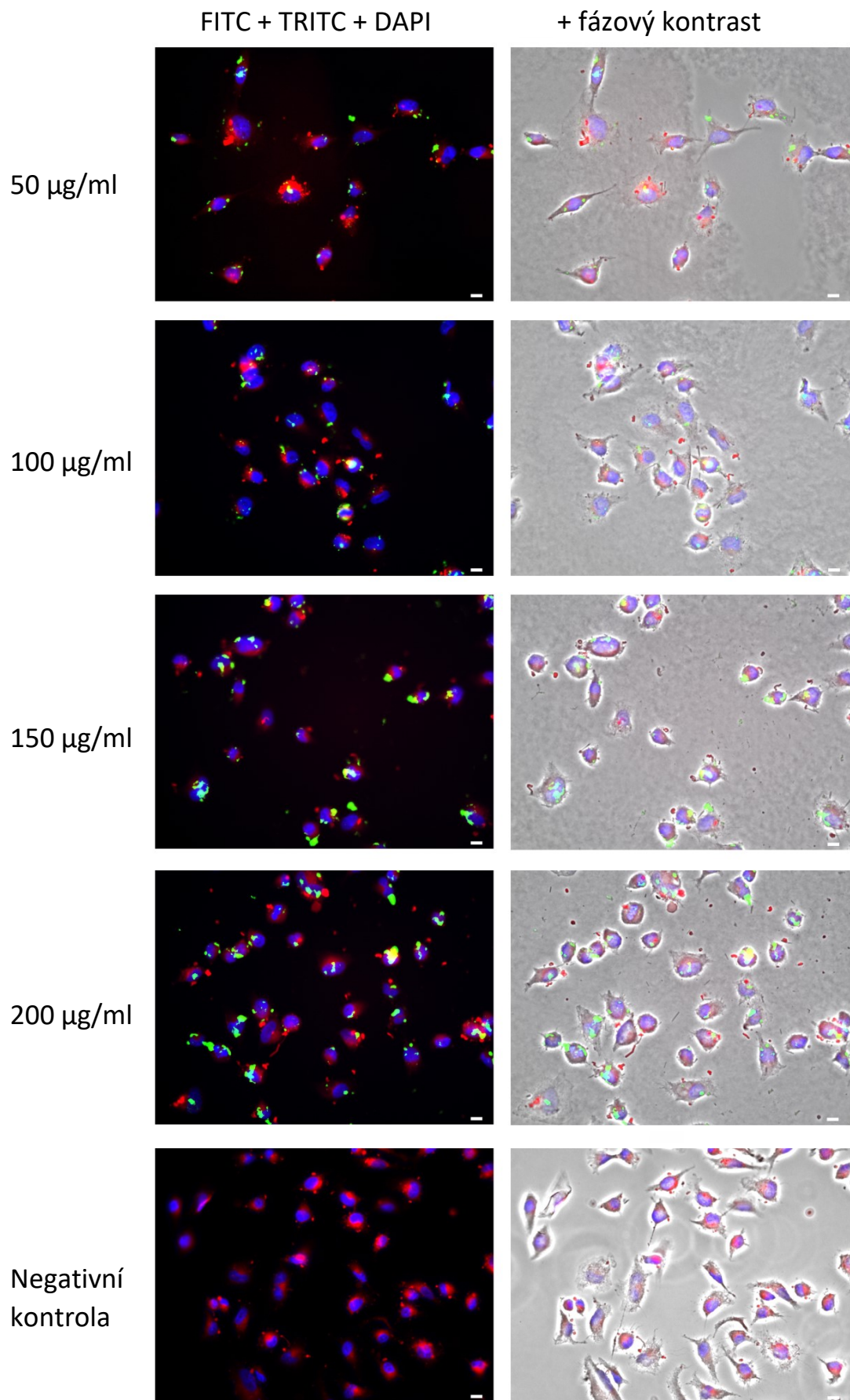
Vzorek částic se zachyceným EGF byl připraven o podobných hodnotách a byl hodnocen jako monodisperzní. Pouze hodnota zeta potenciálu byla nižší, což souvisí se začleněním proteinu s negativním nábojem [13].

Jejich vysoký pozitivní zeta potenciál by měl usnadňovat jejich vychytávání buňkami, díky elektrostatickému přitahování k negativně nabitým buněčným membránám. Samotný proces transportu nabitých částic skrz buněčnou membránu bývá zprostředkován prostřednictvím mechanismu aktivní endocytózy [162]. Znalost zeta potenciálu je navíc nezbytná, protože na povrchovém náboji závisí degradace nanočástic v důsledku jejich interakce s lysozomy, která je pro podávání léčiv klíčová [132].

Buňky byly ovlivněny v obou případech částicemi ve 4 koncentracích (50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$). Zároveň byla připravena fluorescenčně neznačená suspenze částic CS/TPP (koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$) sloužící jako negativní kontrola, aby se vyloučila případná fluorescence samotných částic CS/TPP. Buňky byly inkubovány s částicemi po dobu 3 hodin při 37 °C. Z fluorescenční mikroskopie byly získány obrazy ze tří fluorescenčních kanálů: modrého (barvení jader DAPI), červeného (barvení kyselých organel) a zeleného (signál FITC značených částic), které byly sloučeny do jednoho obrazu. Pro lepší vizualizaci lokalizace částic v buňkách byl přidán i obraz fázového kontrastu, na kterém je dobře patrná buněčná membrána. Tyto obrazy pro všechny koncentrace částic jsou uvedeny nejprve pro částice bez EGF v obrázku 16 a pro částice se zachyceným EGF v obrázku 17 s vloženým měřítkem značícím velikost 10 μm .

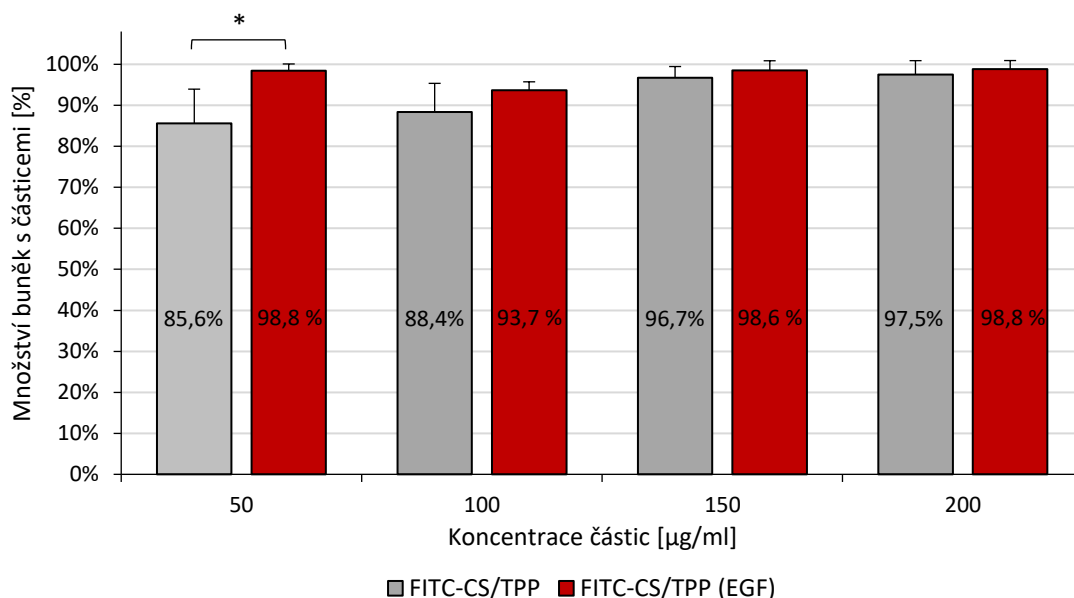


Obrázek 16: Zobrazení buněčné internalizace FITC značených částic CS/TPP



Obrázek 17: Zobrazení buněčné internalizace FITC značených částic CS/TPP s EGF

Na obou obrázcích jsou vidět modře obarvená jádra buněk, červeně značené kyselé organely a zeleně fluoreskující FITC značené částice. Negativní kontrola nevykazuje žádný FITC ani další jiný signál. Z těchto snímků byla vizuálně spočítána procentuální internalizace značených částic na 100 buněk, jejíž průměrné hodnoty jsou graficky znázorněny v grafu 13.



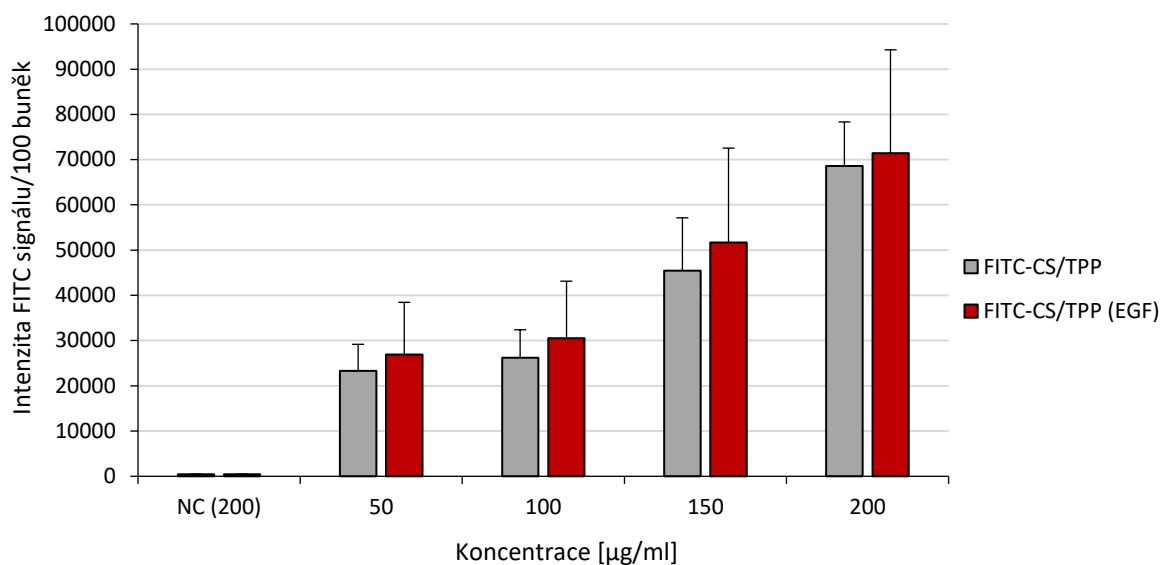
Graf 13: Procentuální míra internalizace FITC značených částic CS/TPP s/bez EGF (n = 6)

Z grafu je patrné, že internalizace CS částic je v obou případech velmi vysoká, dokonce převyšuje hodnoty očekávané na základě dostupných zdrojů [154, 224]. U částic bez EGF lze přesto pozorovat mírnou koncentrační závislost internalizace. Internalizace částic s EGF je ještě o něco vyšší, ale zde již patrný vliv koncentrace částic na míru jejich buněčné internalizace není. Možným důvodem může být, že se dosáhlo maximální míry buněčné internalizace částic, jelikož se hodnoty pohybují blízko 99 % pro většinu koncentrací a je nutno zohlednit biologickou variabilitu buněčného systému.

Statistická analýza navíc neprokázala statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami. Výjimkou byla koncentrace 50 µg/ml, u níž nepárový t-test odhalil statisticky významný rozdíl s P-hodnotou 0,0041 (* = $P < 0,05$).

Vzhledem k tomu, že jako pozitivní jsou hodnoceny i buňky s minimálním množstvím částic stejně jako buňky s jejich vysokou koncentrací, tak se toto hodnocení zdálo jako nekompletní. Z obrázků je navíc patrné, že se zvyšující se koncentrací částic narůstá i jejich internalizované množství v buňkách. Proto byla dále provedena kvantifikace částic pomocí analýzy fluorescečního signálu FITC v softwaru ImageJ. Získaný signál snímků ve formě Integrated density byl podle konkrétního počtu buněk přepočítán na signál na 100 buněk, který

byl ze snímků zprůměrován a graficky znázorněn v grafu 14, včetně výsledku negativní kontroly (NC).



Graf 14: Kvantitativní analýza částic pomocí FITC signálu (n = 6)

Vzhledem k variabilitě biologického systému a výrazným rozdílům mezi jednotlivými snímky vykazují získaná data velký rozptyl, což se projevilo také ve vysokých hodnotách směrodatné odchylky. Z tohoto důvodu je rozdíl mezi částicemi se zachyceným EGF a částicemi bez EGF statisticky nevýznamný, což bylo také potvrzeno provedením t-testu ($P > 0,05$). Nárůst buněčné internalizace částic po umožnění transportu pomocí EGFR se tedy nepodařilo prokázat. Přesto výsledky poskytují přehled o relativním množství internalizovaných částic mezi jednotlivými koncentracemi, přičemž je patrná poměrně silná koncentrační závislost u obou typů částic. První dvě koncentrace částic vykazovaly pro obě skupiny podobné hodnoty, což lze pozorovat např. i v práci [224]. Následně byly mezi koncentracemi pozorovány větší nárůsty množství internalizovaných částic.

Přesnější kvantitativní výsledky by se mohlo dosáhnout použitím metod jako je např. průtoková cytometrie nebo lýzou buněk a následným měřením pomocí fluorimetrie či fluorescenčního módu ELISA testu [128, 175, 222].

Vzhledem k tomu, že je internalizace částic buňkami ovlivněna celou řadou faktorů a zároveň většina studií používá odlišné metody jejího hodnocení, které často záleží na konkrétním nastavení přístroje a nebo své výsledky uvádí v relativních hodnotách, může být porovnání získaných výsledků s dostupnou literaturou obtížné.

Ve studii [224] popsali internalizaci CS/TPP částic o velikosti 221 nm s kladným zeta potenciálem (41,69 mV) až u 75 % buněk při koncentraci 250 µg/ml a 3hodinové inkubaci,

přičemž bylo potvrzeno, že míra internalizace roste s koncentrací částic. Podobné sledování bylo provedeno i v jiné studii [154], kde byly použity částice z CS a PCL o velikosti ~199,5 nm a zeta potenciálu přibližně -10,1 mV. Výsledky ukázaly vysokou míru internalizace u koncentrací 1000 a 500 µg/ml: 98,5 a 95,6 %. Naopak při koncentraci 250 µg/ml už internalizace výrazně poklesla. V porovnání s těmito studiemi vykazovaly připravené částice daleko větší míru buněčné internalizace i při menších koncentracích.

V případě částic s EGF se studie zaměřují spíše na povrchové modifikace částic navázáním ligandu EGF. Studie [222] ukázala zvýšení buněčné internalizace želatinových částic z původních přibližně 55 % na 85 % v případě částic s EGF. I u chitosanových částic s EGF byl prokázán podobný efekt [225]. Existují také studie, které zkoumají vliv samotné přítomnosti volného EGF přidaného spolu s částicemi k buňkám na jejich buněčnou internalizaci prostřednictvím EGFR. To může být relevantní i v našem případě, jelikož se EGF z částic uvolňuje. Přičemž bylo prokázáno, že vazba EGF na jeho buněčný receptor vedla ke zvýšení příjmu menších částic oxidu křemičitého (59 nm a 130 nm), ale ne větších částic (422 nm a 1 µm), což potvrzuje velikostní limit pro EGFR-zprostředkovanou endocytózu [74, 226].

5. ZÁVĚR

V této práci byly úspěšně připraveny a charakterizovány částice CS/TPP, sloužící jako nosiče proteinu ovalbuminu a EGF. Částice vykazovaly vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti – velikost pod 180 nm bez proteinu a přibližně 200 nm s proteinem, nízkou polydisperzitu, vysoký kladný zeta potenciál a výbornou krátkodobou stabilitu. Částice efektivně zachytily oba proteiny v polymerní matici s vysokou účinností (přibližně 86-87 %) a vazebnou kapacitou nosiče (přibližně 65 µg/2mg). Obalení kyselinou hyaluronovou zvětšilo hydrodynamickou velikost částic a změnilo jejich zeta potenciál do záporných hodnot vykazujících nižší stabilitu částic. Hyaluronový obal také zajistil srovnatelně účinné zachycení ovalbuminu v částicích (89 %).

Výsledky uvolňování proteinu z částic po lyofilizaci vykazovaly dvoufázové uvolňování typické pro CS částice, ovšem s mnohem nižší mírou uvolněného množství. Zároveň bylo pozorováno, že po lyofilizaci probíhalo uvolňování ovalbuminu téměř stejně jak z hyaluronového obalu, tak z polymerní matrice částic. Lyofilizace však vykazovala efekt na uvolňování proteinů, konkrétně uvolňování EGF se po lyofilizaci snížilo (přibližně na poloviční množství) a uvolňování ovalbuminu se mírně zvýšilo.

Fluorescenční značení CS mírně zlepšilo fyzikálně-chemické vlastnosti připravených částic, přičemž neovlivnilo jejich stabilitu. Byla pozorována vysoká míra nespecifické internalizace CS částic s mírnou závislostí na jejich koncentraci (přibližně 86-98 %). V případě umožnění i EGFR-zprostředkované endocytózy u částic ze zachyceným EGF byla pozorována mírně vyšší míra internalizace (přibližně 93-99 %), ale vzhledem k vysokým původním hodnotám se u většiny koncentrací nepovedla statisticky prokázat. Kvantifikace množství částic lépe zobrazuje vliv koncentrace částic na jejich buněčnou internalizaci, ale vzhledem k podobným hodnotám a zároveň k vysoké variabilitě dat se rozdíl mezi skupinami opět ukázal jako statisticky nevýznamný.

Získané výsledky tedy naznačují, že částice obalené kyselinou hyaluronovou by vyžadovaly optimalizaci hodnot zeta potenciálu k zajištění jejich stability. EGFR-zprostředkovanou buněčnou internalizaci by bylo vhodnější hodnotit s částicemi s nižší mírou nespecifické buněčné internalizace. Ovšem částice CS/TPP se zachyceným EGF vykazují potenciál nosičů růstových faktorů pro terapii chronických ran.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] RHEINSTEIN, Peter H. a Bardia AKBARI. Significant FDA approvals in 1997. *American Family Physician*, 1998, roč. 57, č. 11, s. 2865–2868. Dostupné z: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/1998/0601/p2865.html>
- [2] BERLANGA, Jorge, José FERNÁNDEZ, Ernesto LÓPEZ, et al. Heberprot-P: A Novel Product for Treating Advanced Diabetic Foot Ulcer. *MEDICC Review* [online]. 2013, 15(1) [cit. 2024-11-23]. ISSN 1555-7960. Dostupné z: doi:10.37757/MR2013V15.N1.4
- [3] AHN, Hye-na, Hee-sung KANG, Su-jung PARK, Mi-hee PARK, Wook CHUN a Eun CHO. Safety and efficacy of basic fibroblast growth factors for deep second-degree burn patients. *Burns* [online]. 2020, 46(8), 1857-1866 [cit. 2024-11-23]. ISSN 03054179. Dostupné z: doi:10.1016/j.burns.2020.06.019
- [4] NANDHINI, J., E. KARTHIKEYAN a S. RAJESHKUMAR. Nanomaterials for wound healing: Current status and futuristic frontier. *Biomedical Technology* [online]. 2024, 6, 26-45 [cit. 2025-04-14]. ISSN 2949723X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmt.2023.10.001
- [5] LU, Bingqing, Jiaqi WANG, A. Jan HENDRIKS a Tom M. NOLTE. Clearance of nanoparticles from blood: effects of hydrodynamic size and surface coatings. *Environmental Science: Nano* [online]. 2024, 2024-01-18, 11(1), 406-417 [cit. 2025-04-14]. ISSN 2051-8153. Dostupné z: doi:10.1039/D3EN00812F
- [6] MEKUYE, Bawoke a Birhanu ABERA. Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Select* [online]. 2023, 4(8), 486-501 [cit. 2025-04-14]. ISSN 2688-4011. Dostupné z: doi:10.1002/nano.202300038
- [7] ZHANG, Pei a Chenguang LIU. Enhancement of Skin Wound Healing by rhEGF-Loaded Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles. *Polymers* [online]. 2020, 12(7) [cit. 2024-11-23]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12071612
- [8] GUO, Gang, Xiaoling LI, Xianlong YE, et al. EGF and curcumin co-encapsulated nanoparticle/hydrogel system as potent skin regeneration agent. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2016, 11, 3993-4009 [cit. 2024-11-23]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S104350
- [9] MONTAZERI, Samaneh, Ali RASTEGARI, Zohreh MOHAMMADI, Mahboobeh NAZARI, Maryam YOUSEFI, Fatemeh Yazdi SAMADI, Somayeh NAJAFZADEH a Mehdi AGHSAMI. Chitosan nanoparticle loaded by epidermal growth factor as a potential protein carrier for wound healing: In vitro and in vivo studies. *IET Nanobiotechnology* [online]. 2023, 17(3), 204-211 [cit. 2024-11-23]. ISSN 1751-8741. Dostupné z: doi:10.1049/nbt.12116
- [10] TALLAPANENI, Vyshnavi, Lavanya MUDE, Divya PAMU, Vasanth Raj PALANIMUTHU, Sai Varshini MAGHAM, Veera Venkata Satyanarayana Reddy KARRI a Madhukiran PARVATHANENI. Growth Factor Loaded Thermo-Responsive Injectable Hydrogel for

- Enhancing Diabetic Wound Healing. *Gels* [online]. 2023, 9(1) [cit. 2024-11-23]. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels9010027
- [11] HAJIMIRI, Mirhamed, Sheida SHAHVERDI, Mohammad Amin ESFANDIARI, et al. Preparation of hydrogel embedded polymer-growth factor conjugated nanoparticles as a diabetic wound dressing. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2016, 2016-05-03, 42(5), 707-719 [cit. 2024-11-23]. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.3109/03639045.2015.1075030
- [12] BUTKO, Alison, Giovana BONAT CELLI, Allan PAULSON a Amyl GHANEM. Entrapment of basic fibroblast growth factor (bFGF) in a succinylated chitosan nanoparticle delivery system and release profile. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2016, 2016-04-23, 27(10), 1045-1057 [cit. 2025-04-14]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2016.1178519
- [13] HASHEMI, Saadeh, Elnaz MIHANDOOST a Sepideh KHALEGHI. Preparation of chitosan-embedded recombinant human epidermal growth factor nanoparticles as accelerating compounds for skin remodelling in chronic lesions [online]. 2023, 18(7) [cit. 2024-11-23]. ISSN 1750-0443. Dostupné z: doi:10.1049/mna2.12171
- [14] TIĞLI, R. Seda, N. Merve KAZAROĞLU, Bora MAVIŞ a Menemşe GÜMÜŞDERELIOĞLU. Cellular Behavior on Epidermal Growth Factor (EGF)-Immobilized PCL/Gelatin Nanofibrous Scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2012, 2012-04-02, 22(1-3), 207-223 [cit. 2024-11-23]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/092050609X12591500475424
- [15] LIU, Yi-Shan, Mei-Chou LAI, Tang-Yao HONG a I-Min LIU. Exploring the Wound Healing Potential of Hispidin. *Nutrients* [online]. 2024, 16(18) [cit. 2024-11-13]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu16183161
- [16] ALAN, Saadet, Emine ŞALVA, Berna KARAKOYUN, Fulya ÇAKALAĞAOĞLU, Suna ÖZBAŞ a Jülide AKBUĞA. Investigation of therapeutic effects in the wound healing of chitosan/pGM-CSF complexes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2022, 58 [cit. 2024-11-23]. ISSN 2175-9790. Dostupné z: doi:10.1590/s2175-97902022e19668
- [17] LI, Jin-Feng, Hai-Feng DUAN, Chu-Tse WU, et al. HGF Accelerates Wound Healing by Promoting the Dedifferentiation of Epidermal Cells through β 1 -Integrin/ILK Pathway. *BioMed Research International* [online]. 2013, 2013, 1-9 [cit. 2025-04-14]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/470418
- [18] TRINH, Xuan-Tung, Nguyen-Van LONG, Le Thi VAN ANH, Pham Thi NGA, Nguyen Ngan GIANG, Pham Ngoc CHIEN, Sun-Young NAM a Chan-Yeong HEO. A Comprehensive Review of Natural Compounds for Wound Healing: Targeting Bioactivity Perspective. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, 23(17) [cit. 2025-04-14]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23179573

- [19] PARK, Shin-Hye, Eun-Hye KIM, Hyung-Jae LEE, et al. Wound healing effect of visible light-curable chitosan with encapsulated EGF. *Macromolecular Research* [online]. 2016, 24(4), 336-341 [cit. 2024-11-30]. ISSN 1598-5032. Dostupné z: doi:10.1007/s13233-016-4050-4
- [20] ABDELHADY, Seham, Khaled M. HONSY a Mallesh KURAKULA. Electro Spun- Nanofibrous Mats: A Modern Wound Dressing Matrix with a Potential of Drug Delivery and Therapeutics. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* [online]. 2015, 10(4) [cit. 2024-11-09]. ISSN 1558-9250. Dostupné z: doi:10.1177/155892501501000411
- [21] HAO, Ruinan, Xilin YE, Xiaofeng CHEN, et al. *Integrating Bioactive Graded Hydrogel with Radially Aligned Nanofibers to Dynamically Manipulate Wound Healing Process* [online]. 2024, 2024-07-24, 16(29), 37770-37782 [cit. 2025-04-14]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.4c09204
- [22] ZHOU, Chan, Zhengwei HUANG, Ying HUANG, et al. In situ gelation of rhEGF-containing liquid crystalline precursor with good cargo stability and system mechanical properties: a novel delivery system for chronic wounds treatment. *Biomaterials Science* [online]. 2019, 2019-02-26, 7(3), 995-1010 [cit. 2024-11-23]. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/C8BM01196F
- [23] YUAN, Renqiang, Ning YANG, Yueru HUANG, et al. *Layer-by-Layer Microneedle-Mediated rhEGF Transdermal Delivery for Enhanced Wound Epidermal Regeneration and Angiogenesis* [online]. 2023, 2023-05-10, 15(18), 21929-21940 [cit. 2025-04-14]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.3c02254
- [24] DWIVEDI, Charu, Ishan PANDEY, Himanshu PANDEY, et al. In vivo diabetic wound healing with nanofibrous scaffolds modified with gentamicin and recombinant human epidermal growth factor. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2018, 106(3), 641-651 [cit. 2024-11-24]. ISSN 1549-3296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36268
- [25] VIJAYAN, Amritha, Nanditha C. K. a G. S. VINOD KUMAR. ECM-mimicking nanofibrous scaffold enriched with dual growth factor carrying nanoparticles for diabetic wound healing. *Nanoscale Advances* [online]. 2021, 2021-06-1, 3(11), 3085-3092 [cit. 2024-11-24]. ISSN 2516-0230. Dostupné z: doi:10.1039/D0NA00926A
- [26] FIROOZI, Negar a Yunqing KANG. Immobilization of FGF on Poly(xylitol dodecanedioic Acid) Polymer for Tissue Regeneration. *Scientific Reports* [online]. 2020, 10(1) [cit. 2024-12-25]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-67261-6
- [27] BAYSAL, Ipek, Goksu OZCELIKAY, Samiye YABANOGLU-CIFTCI, Bercis Imge UCAR, Ayse GENCER a Betul ARICA-YEGIN. Nanoparticles and Nanostructured Films with TGF- β 3: Preparation, Characterization, and Efficacy. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2021, 22(6) [cit. 2025-04-14]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-021-02097-5
- [28] KOIKE, Yuta, Mariko YOZAKI, Atsushi UTANI a Hiroyuki MUROTA. Fibroblast growth factor 2 accelerates the epithelial–mesenchymal transition in keratinocytes during wound healing

- process. *Scientific Reports* [online]. 2020, 10(1) [cit. 2024-12-25]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-75584-7
- [29] PIRAN, Mehrdad, Saeid VAKILIAN, Mehran PIRAN, Abdollah MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, Simzar HOSSEINZADEH a Abdolreza ARDESHIRYLAJIMI. In vitro fibroblast migration by sustained release of PDGF-BB loaded in chitosan nanoparticles incorporated in electrospun nanofibers for wound dressing applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2018, 2018-10-31, 46(sup1), 511-520 [cit. 2025-04-14]. ISSN 2169-1401. Dostupné z: doi:10.1080/21691401.2018.1430698
- [30] PARAJÓ, Yolanda, Ivana D'ANGELO, Alexander WELLE, Marcos GARCIA-FUENTES a María José ALONSO. Hyaluronic acid/Chitosan nanoparticles as delivery vehicles for VEGF and PDGF-BB. *Drug Delivery* [online]. 2010, 2010-08-26, 17(8), 596-604 [cit. 2025-04-14]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.3109/10717544.2010.509357
- [31] CHENG, Shaohang, Runxiao LV, Jing XU, Abdul Razaq HIRMAN a Lili DU. IGF-1-Expressing Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Scalding Wound Healing. *Journal of Surgical Research* [online]. 2021, 265, 100-113 [cit. 2025-04-14]. ISSN 00224804. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2021.02.057
- [32] ZHANG, Xin, Fei HU, Jie LI, et al. IGF-1 inhibits inflammation and accelerates angiogenesis via Ras/PI3K/IKK/NF- κ B signaling pathways to promote wound healing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2024, 200 [cit. 2025-04-15]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2024.106847
- [33] Regranex (becaplermin), lék schválený FDA pro léčbu diabetických vředů, byl schválen v roce 2008 pod číslem NDA 020368 [U.S. Food and Drug Administration, 2008].
- [34] CG Bio. *Easyef: Recombinant human epidermal growth factor (Ref. No. EGFS0100)*. Available at: <https://www.cgbio.co.kr/en/product/wound/easyef> [Accessed 23 November 2024].
- [35] DRUGBANK. Becaplermin [online]. 2024. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00102>.
- [36] EVROPSKÁ KOMISE. Kepivance, INN-palifermin – Příloha I: Souhrn údajů o přípravku. Úřední dokument. Brusel: Evropská komise, 2010 [cit. 2025-04-14]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2010/2010092386008/anx_86008_cs.pdf
- [37] DRUGBANK. Palifermin [online]. Edmonton (AB): DrugBank, 2024 [cit. 2025-04-14]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00020>
- [38] XU, Pengcheng, Yaguang WU, Lina ZHOU, et al. *Platelet-rich plasma accelerates skin wound healing by promoting re-epithelialization* [online]. 2020, 2020-01-01, 8 [cit. 2024-11-24]. ISSN 2321-3876. Dostupné z: doi:10.1093/burnst/tkaa028
- [39] RAO, Sneha S., Ashwini PRABHU, Jagadish KUDKULI, Suprith SURYA a P.D. REKHA. Hyaluronic acid sustains platelet stability with prolonged growth factor release and accelerates

- wound healing by enhancing proliferation and collagen deposition in diabetic mice. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2022, 67 [cit. 2025-04-15]. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2021.102898
- [40] SLANINKA, Igor, Leo KLEIN, František HOŠEK, Lucie HASENÖHRLOVÁ, Stanislav JÍŠKA a Milan KAŠKA. Využití plazmy bohaté na trombocyty v hojení ran – některé poznatky a první zkušenosti. *Hojení ran* [online]. 2013, 2013(2), 25-27 [cit. 2025-04-15]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/hojeni-ran/2013-2/vyuziti-plazmy-bohate-na-trombocyty-v-hojeni-ran-nektere-poznatky-a-prvni-zkusenosti-40744>
- [41] JEONG, Wooyoung, Jinyoung KIM, Fuller W. BAZER a Gwonhwa SONG. Epidermal growth factor stimulates proliferation and migration of porcine trophectoderm cells through protooncogenic protein kinase 1 and extracellular-signal-regulated kinases 1/2 mitogen-activated protein kinase signal transduction cascades during early pregnancy. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2013, 381(1-2), 302-311 [cit. 2024-11-09]. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2013.08.024
- [42] ROUSSELET, Estelle, Suzanne BENJANNET, Edwidge MARCINKIEWICZ, Marie-Claude ASSELIN, Claude LAZURE a Nabil G. SEIDAH. Proprotein Convertase PC7 Enhances the Activation of the EGF Receptor Pathway through Processing of the EGF Precursor. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, 286(11), 9185-9195 [cit. 2025-04-15]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.189936
- [43] BAVARO, Teodora, Sara TENGATTINI, Refaya REZWAN, et al. Design of epidermal growth factor immobilization on 3D biocompatible scaffolds to promote tissue repair and regeneration. *Scientific Reports* [online]. 2021, 11(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-81905-1
- [44] DOUSTVAGHE, Yasaman Kiani, Azadeh HAERI, Mahsa Mollapour SISAKHT, Mohammad Amir AMIRKHANI a Hossein VATANPOUR. Recombinant human epidermal growth factor-loaded liposomes and transferosomes for dermal delivery: Development, characterization, and cytotoxicity evaluation. *Drug Development Research* [online]. 2024, 85(5) [cit. 2024-11-23]. ISSN 0272-4391. Dostupné z: doi:10.1002/ddr.22234
- [45] POURANVARI, Sara, Firouz EBRAHIMI, Gholamreza JAVADI a Bozorgmehr MADDAH. Cloning, Expression, and Cost Effective Purification of Authentic Human Epidermal Growth Factor With High Activity. *Iranian Red Crescent Medical Journal* [online]. 2016, 2016-03-20, 18(3) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2074-1804. Dostupné z: doi:10.5812/ircmj.24966
- [46] LEE, Yerin, Saebin LIM, Ji An KIM, Yoon Hong CHUN a Hyun Jong LEE. Development of Thiol–Ene Reaction-Based HA Hydrogel with Sustained Release of EGF for Enhanced Skin Wound Healing. *Biomacromolecules* [online]. 2023, 2023-11-13, 24(11), 5342-5352 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.3c00810

- [47] KAO, Yu-Chiu, Meng-Hua HSIEH, Chung-Chun LIU, Huei-Jyuan PAN, Wei-Yu LIAO, Ji-Yen CHENG, Po-Ling KUO a Chau-Hwang LEE. Modulating chemotaxis of lung cancer cells by using electric fields in a microfluidic device. *Biomicrofluidics* [online]. 2014, 2014-03-01, 8(2) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1932-1058. Dostupné z: doi:10.1063/1.4870401
- [48] LIU, Zitao, Debra F SKAFAR, Brian KILBURN, Sanjoy K DAS a D Randall ARMANT. Extraembryonic heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor deficiency compromises placentation in mice†. *Biology of Reproduction* [online]. 2019, 2019-01-01, 100(1), 217-226 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1093/biolre/iory174
- [49] POGER, David a Alan E. MARK. Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor: A Series of Twists and Turns. *Biochemistry* [online]. 2014, 2014-04-29, 53(16), 2710-2721 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi401632z
- [50] CHIM, Shek Man, An QIN, Jennifer TICKNER, et al. EGFL6 Promotes Endothelial Cell Migration and Angiogenesis through the Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, 286(25), 22035-22046 [cit. 2025-04-15]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.187633
- [51] BAKR, Mahmoud, Mohamed SHAMEL, Sara Abd ELWAHED a Mahmoud AL ANKILY. A Rat Experimental Model for Investigation of the Effect of Diabetes on Submandibular Salivary Glands Treated with Epidermal Growth Factor. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* [online]. 2022, 2022-01-01, 10(D), 190-196 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1857-9655. Dostupné z: doi:10.3889/oamjms.2022.9209
- [52] PATEL, Tarun B. a Paul J. BERTICS. Epidermal Growth Factor Methods and Protocols. In: *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY™*. 327. Humana Press, 2006, s. 1-2. ISBN 1-588-29-421-8.
- [53] LIU, Ximing, Xinxin TIAN, Xinyan HAO, et al. A cross-reactive pH-dependent EGFR antibody with improved tumor selectivity and penetration obtained by structure-guided engineering. *Molecular Therapy - Oncolytics* [online]. 2022, 27, 256-269 [cit. 2025-04-15]. ISSN 23727705. Dostupné z: doi:10.1016/j.omto.2022.11.001
- [54] PURBA, Endang R., Ei-ichiro SAITA, Reetesh R. AKHOURI, Lars-Goran ÖFVERSTEDT, Gunnar WILKEN, Ulf SKOGLUND a Ichiro N. MARUYAMA. Allosteric activation of preformed EGF receptor dimers by a single ligand binding event. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2022, 2022-11-30, 13 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2022.1042787
- [55] VAN LINGERICH, Bettina, Christopher AGNEW, Elias M. PUCHNER, Bo HUANG a Natalia JURA. EGF and NRG induce phosphorylation of HER3/ERBB3 by EGFR using distinct oligomeric mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2017, 2017-04-04, 114(14) [cit. 2025-04-15]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1617994114

- [56] HUANG, Wei, Jing LI, Hongtao ZHU, et al. A novel EGFR variant EGFRx maintains glioblastoma stem cells through STAT5. *Neuro-Oncology* [online]. 2024, 2024-01-01, 26(1), 85-99 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1522-8517. Dostupné z: doi:10.1093/neuonc/noad153
- [57] KIM, Si-Eun, Parker W. LEE a Jonathan K. POKORSKI. Biologically Triggered Delivery of EGF from Polymer Fiber Patches. *ACS Macro Letters* [online]. 2017, 2017-06-20, 6(6), 593-597 [cit. 2024-12-03]. ISSN 2161-1653. Dostupné z: doi:10.1021/acsmacrolett.7b00212
- [58] CHU, Yuejie, Demin YU, Penghua WANG, Jun XU, Daiqing LI a Min DING. Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. *Wound Repair and Regeneration* [online]. 2010, 18(5), 499-505 [cit. 2025-04-15]. ISSN 10671927. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2010.00612.x
- [59] CHEN, Yue, Mei LENG, Yankun GAO, et al. A Cross-Linking-Aided Immunoprecipitation/Mass Spectrometry Workflow Reveals Extensive Intracellular Trafficking in Time-Resolved, Signal-Dependent Epidermal Growth Factor Receptor Proteome. *Journal of Proteome Research* [online]. 2019, 2019-10-04, 18(10), 3715-3730 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.9b00427
- [60] LEYVA, Alberto, Hector SANTANA, Milagros FONT, Barbara PÉREZ a Rodolfo VALDÉS. An ELISA for quantification of recombinant human EGF in production process samples, serum and urine. *Biologicals* [online]. 2018, 51, 12-17 [cit. 2025-04-15]. ISSN 10451056. Dostupné z: doi:10.1016/j.biologicals.2017.12.001
- [61] VENKATESAN, Meenakshi, Cameron SEMPER, Stig SKRIVERGAARD, et al. Recombinant production of growth factors for application in cell culture. *IScience* [online]. 2022, 25(10) [cit. 2025-04-15]. ISSN 25890042. Dostupné z: doi:10.1016/j.isci.2022.105054
- [62] KIM, Young Su, Hye-Jeong LEE, Man-ho HAN, Nam-kyung YOON, Yeu-chun KIM a Jungoh AHN. Effective production of human growth factors in *Escherichia coli* by fusing with small protein 6HFh8. *Microbial Cell Factories* [online]. 2021, 20(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-01502-1
- [63] FERREIRA, Arthur Schweitzer, Amanda LOPACINSKI, Michel BATISTA, Priscila Mazzocchi HIRAIWA, Beatriz Gomes GUIMARÃES a Nilson Ivo Tonin ZANCHIN. A toolkit for recombinant production of seven human EGF family growth factors in active conformation. *Scientific Reports* [online]. 2022, 12(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-09060-9
- [64] KNUPPEL, Anika, Georgina K. FENSOM, Eleanor L. WATTS, et al. Circulating Insulin-like Growth Factor-I Concentrations and Risk of 30 Cancers: Prospective Analyses in UK Biobank. *Cancer Research* [online]. 2020, 2020-09-15, 80(18), 4014-4021 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-1281
- [65] CHIANG, Kuo-Hwa, Jiunn-Min SHIEH, Chih-Jie SHEN, et al. Epidermal growth factor-induced COX-2 regulates metastasis of head and neck squamous cell carcinoma through upregulation of

- angiopoietin-like 4. *Cancer Science* [online]. 2020, 111(6), 2004-2015 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1347-9032. Dostupné z: doi:10.1111/cas.14400
- [66] KIM, Koo-Yeon, Eun-Hye KIM a Tae-Il SON. Preparation of Low-Molecular-Weight 6-Amino-6-Deoxychitosan (LM6A6DC) for Immobilization of Growth Factor. *International Journal of Mechanical and Mechatronics Engineering* [online]. 2015, 9(3), 296-299 [cit. 2024-11-23].
- [67] MA, Zhijie, Wei SONG, Yaohua HE a Haiyan LI. *Multilayer Injectable Hydrogel System Sequentially Delivers Bioactive Substances for Each Wound Healing Stage* [online]. [cit. 2025-04-15]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.0c06360
- [68] NOROUZI, Mohammad, Iman SHABANI, Hana H. AHVAZ a Masoud SOLEIMANI. PLGA/gelatin hybrid nanofibrous scaffolds encapsulating EGF for skin regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2015, 103(7), 2225-2235 [cit. 2024-11-23]. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.35355
- [69] WANG, Zhenbei, Yuna QIAN, Linhao LI, Lianhong PAN, Lucy W NJUNGE, Lili DONG a Li YANG. Evaluation of emulsion electrospun polycaprolactone/hyaluronan/epidermal growth factor nanofibrous scaffolds for wound healing. *Journal of Biomaterials Applications* [online]. 2016, 30(6), 686-698 [cit. 2024-11-23]. ISSN 0885-3282. Dostupné z: doi:10.1177/0885328215586907
- [70] HARDWICKE, Joseph, Ryan MOSELEY, Phil STEPHENS, Keith HARDING, Ruth DUNCAN a David W. THOMAS. Bioresponsive Dextrin–rhEGF Conjugates: In Vitro Evaluation in Models Relevant to Its Proposed Use as a Treatment for Chronic Wounds. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2010, 2010-06-07, 7(3), 699-707 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/mp9002656
- [71] YANG, Xi, Wenqian MO, Yan SHI, Xiang FANG, Yujian XU, Xiaoqing HE a Yongqing XU. Fumaria officinalis-loaded chitosan nanoparticles dispersed in an alginate hydrogel promote diabetic wounds healing by upregulating VEGF, TGF- β , and b-FGF genes: A preclinical investigation. *Heliyon* [online]. 2023, 9(7) [cit. 2025-04-15]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2023.e17704
- [72] YANG, Ye, Tian XIA, Fang CHEN, Wei WEI, Chaoyu LIU, Shuhui HE a Xiaohong LI. Electrospun Fibers with Plasmid bFGF Polyplex Loadings Promote Skin Wound Healing in Diabetic Rats. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2012, 2012-01-01, 9(1), 48-58 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/mp200246b
- [73] MASLINA, Musa Intan a Abdullah Amira RAUDHAH. Hydroxyapatite (HA) scaffold supplemented with VEGF and BMP-2 growth factors enhanced osteogenic proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells. *Pharmacy Education* [online]. 2023, 2023-10-10, 23(4), 105-109 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1477-2701. Dostupné z: doi:10.46542/pe.2023.234.105109
- [74] SUSNIK, Eva, Amelie BAZZONI, Patricia TALADRIZ-BLANCO, et al. Epidermal growth factor alters silica nanoparticle uptake and improves gold-nanoparticle-mediated gene silencing

- in A549 cells. *Frontiers in Nanotechnology* [online]. 2023, 2023-7-17, 5 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2673-3013. Dostupné z: doi:10.3389/fnano.2023.1220514
- [75] GONZALES MATUSHITA, Layla M., Luis PALOMINO a Juan Carlos F. RODRIGUEZ-REYES. Silver Nanoparticles Coated with Recombinant Human Epidermal Growth Factor: Synthesis, Characterization, Liberation and Anti-Escherichia coli Activity. *Reactions* [online]. 2023, 4(4), 713-724 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2624-781X. Dostupné z: doi:10.3390/reactions4040041
- [76] LEE, Hye-Jin, Moses JEONG, Young-Guk NA, Sung-Jin KIM, Hong-Ki LEE a Cheong-Weon CHO. An EGF- and Curcumin-Co-Encapsulated Nanostructured Lipid Carrier Accelerates Chronic-Wound Healing in Diabetic Rats. *Molecules* [online]. 2020, 25(20) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25204610
- [77] ALEHOSSEINI, Elham, Hoda SHAHIRI TABARESTANI, Mohammad Saeed KHARAZMI a Seid Mahdi JAFARI. Physicochemical, Thermal, and Morphological Properties of Chitosan Nanoparticles Produced by Ionic Gelation. *Foods* [online]. 2022, 11(23) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11233841
- [78] BAHTIYAR, Celal, Neslihan Turhan CAKIR, Muhammet U. KAHVECI, Gokhan ACIK a Cagatay ALTINKOK. Fabrication of gallic acid containing poly(vinyl alcohol)/chitosan electrospun nanofibers with antioxidant and drug delivery properties. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2024, 281 [cit. 2025-04-15]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.136055
- [79] GHOSH, Tanmoy, Deveswaran RAJAMANICKAM, Damodar NAYAK, Bharath SRINIVASAN a Basavaraj B.V. Physicochemical and in vivo evaluation of crosslinked carboxymethyl chitosan-gelatin scaffolds for wound healing application. *Materials Today Communications* [online]. 2023, 37 [cit. 2025-04-15]. ISSN 23524928. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtcomm.2023.107307
- [80] PÉREZ-ÁLVAREZ, Leyre, Leire RUIZ-RUBIO a Jose Luis VILAS-VILELA. Determining the Deacetylation Degree of Chitosan: Opportunities To Learn Instrumental Techniques. *Journal of Chemical Education* [online]. 2018, 2018-06-12, 95(6), 1022-1028 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jchemed.7b00902
- [81] DADASHI, Hamed, Somayeh VANDGHANOONI, Shahrbanoo KARAMNEJAD-FARAGHEH, Alireza KARIMIAN-SHADDEL, Morteza ESKANDANI a Rana JAHANBAN-ESFAHLAN. A rapid protocol for synthesis of chitosan nanoparticles with ideal physicochemical features. *Heliyon* [online]. 2024, 10(11) [cit. 2025-04-15]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2024.e32228
- [82] MATHABA, Machodi a Michael Olawale DARAMOLA. Effect of Chitosan's Degree of Deacetylation on the Performance of PES Membrane Infused with Chitosan during AMD Treatment. *Membranes* [online]. 2020, 10(3) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2077-0375. Dostupné z: doi:10.3390/membranes10030052

- [83] POTIVAS, Thipwimon a Thunnop LAOKULDILOK. Deacetylation of Chitin and the Properties of Chitosan Films with Various Deacetylation Degrees. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* [online]. 2014, 13(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 16851994. Dostupné z: doi:10.12982/CMUJNS.2014.0058
- [84] SREEKUMAR, Sruthi, Francisco M. GOYCOOLEA, Bruno M. MOERSCHBACHER a Gustavo R. RIVERA-RODRIGUEZ. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. *Scientific Reports* [online]. 2018, 8(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-23064-4
- [85] WEISSPFLOG, Janek, David VEHLow, Martin MÜLLER, Benjamin KOHN, Ulrich SCHELER, Susanne BOYE a Simona SCHWARZ. Characterization of chitosan with different degree of deacetylation and equal viscosity in dissolved and solid state – Insights by various complimentary methods. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, 171, 242-261 [cit. 2025-04-15]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.01.010
- [86] XUE, Ting, Wenqing WANG, Zhiyuan YANG, et al. Accurate Determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan Using UPLC–MS/MS. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, 23(15) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23158810
- [87] JIANG, Tianying, Yanhui WANG, Zhiyu YU a Liangwei DU. Synthesis, characterization of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with 4-chloro-2-methylphenoxyacetate sodium salt and its herbicidal activity against *Bidens pilosa* L. *Scientific Reports* [online]. 2024, 14(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-024-69438-9
- [88] MILENKOVA, Sofia, Rita AMBRUS, Mahwash MUKHTAR, Bissera PILICHEVA a Maria MARUDOVA. Spray-Dried Chitosan Hydrogel Particles as a Potential Delivery System for Benzydamine Hydrochloride. *Gels* [online]. 2024, 10(3) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels10030189
- [89] CHEN, Xia, Xiaoyan ZHU, Lei LI, Guangjun XIAN, Wei WANG, Dawei MA a Lin XIE. Investigation on novel chitosan nanoparticle–aptamer complexes targeting TGF- β receptor II. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, 456(2), 499-507 [cit. 2025-04-15]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.028
- [90] HASSANI, Maryam Sadat, Majid SALEHI, Arian EHTERAMI, Solmaz MAHAMI, Fateme Sadat BITARAF a Majid RAHMATI. Evaluation of collagen type I and III, TGF- β 1, and VEGF gene expression in rat skin wound healing treated by alginate/chitosan hydrogel containing crocetin. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2023, 195 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2023.108895

- [91] SADEGHI, F. a A. FAYAZI. *Analysis of Crystalline Structure of Sodium Tripolyphosphate: Effect of pH of Solution and Calcination Conditions* [online]. 2012, 2012-01-25, 51(3), 1093-1098 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0888-5885. Dostupné z: doi:10.1021/ie202064e
- [92] BANACH, Marcin a Agnieszka MAKARA. *Thermal Decomposition of Sodium Phosphates* [online]. 2011, 2011-07-14, 56(7), 3095-3099 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0021-9568. Dostupné z: doi:10.1021/je200381z
- [93] GURSES, M. Sadi, Can ERKEY, Seda KIZILEL a Alper UZUN. Characterization of sodium tripolyphosphate and sodium citrate dehydrate residues on surfaces. *Talanta* [online]. 2018, 176, 8-16 [cit. 2025-04-15]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.07.092
- [94] PARIZE, Alexandre Luis, Hellen Karine STULZER, Mauro César Marghetti LARANJEIRA, Inês Maria da Costa BRIGHENTE a Tereza Cristina Rozone de SOUZA. Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. *Química Nova* [online]. 2012, 35(6), 1127-1132 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0100-4042. Dostupné z: doi:10.1590/S0100-40422012000600011
- [95] KOVALENKO, Vadym a Valerii KOTOK. Optimization of the formation technology of tripolyphosphate coating on mild steel. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies* [online]. 2021, 2021-10-29, 5(6 (113), 73-78 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1729-4061. Dostupné z: doi:10.15587/1729-4061.2021.242409
- [96] ZHANG, Zhenning, Zhipeng NI, Yudi HUANG, et al. *Barnacle-Inspired Wet Tissue Adhesive Hydrogels with Inherent Antibacterial Properties for Infected Wound Treatment* [online]. 2023, 2023-08-09, 15(31), 37214-37231 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.3c06371
- [97] TAN, Hongbo, Jian HUANG, Baoguo MA a Xiangguo LI. Effect of superplasticiser and sodium tripolyphosphate on fluidity of cement paste. *Magazine of Concrete Research* [online]. 2014, 66(23), 1194-1200 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0024-9831. Dostupné z: doi:10.1680/macr.14.00091
- [98] CORREA, Rodolpho Fagundes, Giovana COLUCCI, Nouredine HALLA, João Alves PINTO, Arantzazu SANTAMARIA-ECHART, Silvia Priscila BLANCO, Isabel Patrícia FERNANDES a Maria Filomena BARREIRO. Development of Chitosan Microspheres through a Green Dual Crosslinking Strategy Based on Tripolyphosphate and Vanillin. *Molecules* [online]. 2021, 26(8) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26082325
- [99] SHI, Chaoyi, Zuwei ZHU, Gaofang YIN, Xianhe GAO, Zhongma WANG, Sheng ZHANG, Zehua ZHOU a Xueyou HU. Measurement of Submicron Particle Size Using Scattering Angle-Corrected Polarization Difference with High Angular Resolution. *Photonics* [online]. 2023, 10(11) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2304-6732. Dostupné z: doi:10.3390/photonics10111282
- [100] NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. *Nano.gov – What is nanoscale?* [online]. [cit. 2025-04-15]. Dostupné z: <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/nano-size>

- [101] SAWTARIE, Nader, Yuhang CAI a Yakov LAPITSKY. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2017, 157, 110-117 [cit. 2025-04-15]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.05.055
- [102] 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. 2025-04-15]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.034
- [103] DE CARVALHO, Fabiola Galbiatti, Taís Chaves MAGALHÃES, Natália Moreira TEIXEIRA, Brenna Louise Cavalcanti GONDIM, Hugo Lemes CARLO, Rogério Lacerda DOS SANTOS, Alan Reis DE OLIVEIRA a Ângelo Marcio Leite DENADAI. Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, 104 [cit. 2025-04-15]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.109885
- [104] PONTES, Montcharles S., Débora R. ANTUNES, Ivan P. OLIVEIRA, et al. Chitosan/tripolyphosphate nanoformulation carrying paraquat: insights on its enhanced herbicidal activity. *Environmental Science: Nano* [online]. 2021, 2021-05-20, 8(5), 1336-1351 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2051-8153. Dostupné z: doi:10.1039/D0EN01128B
- [105] CHEN, Xuelian, Lijia LIU, Chen SHEN, Fangyan LIU, Enyu XU, Yin CHEN a Wang JIE. Preparation and Properties of Natural Polysaccharide-Based Drug Delivery Nanoparticles. *Polymers* [online]. 2023, 15(11) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym15112510
- [106] RAICHUR, Ashok, THOMAS, RADHAKRISHNAN, GNANADHAS a Dipshikha CHAKRAVORTTY. Intracellular delivery of doxorubicin encapsulated in novel pH-responsive chitosan/heparin nanocapsules. *International Journal of Nanomedicine* [online]. [cit. 2025-04-15]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S37737
- [107] YE, Shiqu, Chaoyang WANG, Xinxing LIU a Zhen TONG. Multilayer nanocapsules of polysaccharide chitosan and alginate through layer-by-layer assembly directly on PS nanoparticles for release. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2012, 2012-04-02, 16(7), 909-923 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/1568562054255691
- [108] CUOMO, Francesca, Francesco LOPEZ, Andrea CEGLIE, Lucia MAIURO, Maria G. MIGUEL a Björn LINDMAN. PH-responsive liposome-templated polyelectrolyte nanocapsules. *Soft Matter* [online]. 2012, 8(16) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1744-683X. Dostupné z: doi:10.1039/c2sm07388a
- [109] SYDOW, Steffen, Armin ANIOL, Christoph HADLER a Henning MENZEL. Chitosan–Azide Nanoparticle Coating as a Degradation Barrier in Multilayered Polyelectrolyte Drug Delivery

- Systems. *Biomolecules* [online]. 2019, 9(10) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9100573
- [110] LIU, Zhe, Dong ZHOU a Lan LIAO. PH/Redox/Lysozyme-Sensitive Hybrid Nanocarriers With Transformable Size for Multistage Drug Delivery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2022, 2022-4-11, 10 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.882308
- [111] WAQAS, Muhammad Khurram, Shees SAFDAR, Manal BUABEID, Akram ASHAMES, Muhammad AKHTAR a Ghulam MURTAZA. Alginate-coated chitosan nanoparticles for pH-dependent release of tamoxifen citrate. *Journal of Experimental Nanoscience* [online]. 2022, 2022-12-31, 17(1), 522-534 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1745-8080. Dostupné z: doi:10.1080/17458080.2022.2112919
- [112] GENNARI, Arianna, Julio M RIOS DE LA ROSA, Erwin HOHN, Maria PELLICCIA, Enrique LALLANA, Roberto DONNO, Annalisa TIRELLA a Nicola TIRELLI. The different ways to chitosan/hyaluronic acid nanoparticles: templated vs direct complexation. Influence of particle preparation on morphology, cell uptake and silencing efficiency. *Beilstein Journal of Nanotechnology* [online]. 2019, 10, 2594-2608 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2190-4286. Dostupné z: doi:10.3762/bjnano.10.250
- [113] FAHMY, S.A., RAMZY, A., MANDOUR, A.A., NASR, S., ABDELNASER, A., BAKOWSKY, U. a H.M.E. AZZAZY. PEGylated chitosan nanoparticles encapsulating ascorbic acid and oxaliplatin exhibit dramatic apoptotic effects against breast cancer cells. *Pharmaceutics* [online]. 2022, 14(2), 407 [cit. 2025-04-15]. DOI: 10.3390/pharmaceutics14020407. PMID: 35214139; PMCID: PMC8874531.
- [114] BAGHDAN, Elias, Shashank Reddy PINNAPIREDDY, Boris STREHLOW, Konrad H. ENGELHARDT, Jens SCHÄFER a Udo BAKOWSKY. Lipid coated chitosan-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, 535(1-2), 473-479 [cit. 2025-04-15]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.11.045
- [115] TRAN, Phuong a Jeong-Sook PARK. Alginate-coated chitosan nanoparticles protect protein drugs from acid degradation in gastric media. *Journal of Pharmaceutical Investigation* [online]. 2022, 52(4), 465-476 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2093-5552. Dostupné z: doi:10.1007/s40005-022-00574-y
- [116] WANG, Tao, Jiahui HOU, Chang SU, Liang ZHAO a Yijie SHI. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles induce ROS-mediated tumor cell apoptosis and enhance antitumor efficiency by targeted drug delivery via CD44. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2017, 15(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1477-3155. Dostupné z: doi:10.1186/s12951-016-0245-2

- [117] HERDIANA, Yedi, Nasrul WATHONI, Shaharum SHAMSUDDIN a Muchtaridi MUCHTARIDI. Drug release study of the chitosan-based nanoparticles. *Heliyon* [online]. 2022, 8(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08674
- [118] WILSON, Brian K. a Robert K. PRUD'HOMME. Processing Chitosan for Preparing Chitosan-Functionalized Nanoparticles by Polyelectrolyte Adsorption. *Langmuir* [online]. 2021, 2021-07-20, 37(28), 8517-8524 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.1c00990
- [119] PINEDA, María, Silvia TORRES, Luis LÓPEZ, Francisco ENRÍQUEZ-MEDRANO, Ramón DE LEÓN, Salvador FERNÁNDEZ, Hened SAADE a Raúl LÓPEZ. Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles Prepared in One-Step by Precipitation in a High-Aqueous Phase Content Reverse Microemulsion. *Molecules* [online]. 2014, 19(7), 9273-9287 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules19079273
- [120] NOROUZI, Zahra a Majid ABDOUSS. Electrospun nanofibers using β -cyclodextrin grafted chitosan macromolecules loaded with indomethacin as an innovative drug delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2023, 233 [cit. 2025-04-15]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.123518
- [121] SCHIFFMAN, Jessica D. a Caroline L. SCHAUER. Cross-Linking Chitosan Nanofibers. *Biomacromolecules* [online]. 2007, 2007-02-01, 8(2), 594-601 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm060804s
- [122] OU, Akakuru a Isiuku BO. *Chitosan Hydrogels and their Glutaraldehyde-Crosslinked Counterparts as Potential Drug Release and Tissue Engineering Systems - Synthesis, Characterization, Swelling Kinetics and Mechanism* [online]. 2017, 07(03) [cit. 2025-04-15]. ISSN 21610398. Dostupné z: doi:10.4172/2161-0398.1000256
- [123] UDDIN, Md Salah, Suyash KHAND a Chao DONG. Effect of Crosslinking Agents on Chitosan Hydrogel Carriers for Drug Loading and Release for Targeted Drug Delivery. *Gels* [online]. 2024, 10(7) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels10070421
- [124] DIMIDA, Simona, Christian DEMITRI, Vincenzo M. DE BENEDICTIS, Francesca SCALERA, Francesca GERVASO a Alessandro SANNINO. Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2015, 2015-07-20, 132(28) [cit. 2025-04-15]. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.42256
- [125] HADDAD, Athir M, Zainab J SWEAH a Hadi S Al LAMI. Preparation and Release Study of Biodegradable L-lactide IPN's Insulin Delivery. *Polymer science* [online]. 2017, 03(01) [cit. 2025-04-15]. ISSN 24719935. Dostupné z: doi:10.4172/2471-9935.100019
- [126] SHANMUGAPRIYA, Karuppusamy, Hyejin KIM a Hyun Wook KANG. EGFR-conjugated hydrogel accelerates wound healing on ulcer-induced burn wounds by targeting collagen and inflammatory cells using photoimmunomodulatory inhibition. *Materials Science and*

- Engineering: C* [online]. 2021, 118 [cit. 2025-04-15]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.111541
- [127] ARNO, Maria C., Maria INAM, Andrew C. WEEMS, et al. Exploiting the role of nanoparticle shape in enhancing hydrogel adhesive and mechanical properties. *Nature Communications* [online]. 2020, 11(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-15206-y
- [128] YADAV, Preeti a Awadh Bihari YADAV. Preparation and characterization of BSA as a model protein loaded chitosan nanoparticles for the development of protein-/peptide-based drug delivery system. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2021, 7(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2314-7253. Dostupné z: doi:10.1186/s43094-021-00345-w
- [129] DES BOUILLONS-GAMBOA, Rosvin E., Gabriela MONTES DE OCA, Jose Roberto Vega BAUDRIT, et al. Synthesis of chitosan nanoparticles (CSNP): effect of CH-CH-TPP ratio on size and stability of NPs. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2024, 2024-11-15, 12 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2024.1469271
- [130] GAGLIARDI, Agnese, Elena GIULIANO, Eeda VENKATESWARARAO, Massimo FRESTA, Stefania BULOTTA, Vibhudutta AWASTHI a Donato COSCO. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2021, 2021-2-3, 12 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2021.601626
- [131] LIU, Cong, Mingyang SU, Zhongbin XU a Xing HUANG. Multi-layered powder-in-hydrogel capsules by magnetism-assisted bubbling method. *Materials Letters* [online]. 2022, 318 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2022.132144
- [132] KIAIE, Nasim, Rouhollah M. AGHDAM, Seyed H.A. TAFTI a Shahriar H. EMAMI. *Statistical Optimization of Chitosan Nanoparticles as Protein Vehicles, Using Response Surface Methodology* [online]. 2016, 2016-10-02, 14(4), 413-422 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2280-8000. Dostupné z: doi:10.5301/jabfm.5000278
- [133] ELGINDY, Nazik, Kadria ELKHODAIRY, Abdallah MOLOKHIA a Ahmed ELZOGHBY. *Biopolymeric Nanoparticles for Oral Protein Delivery: Design and In Vitro Evaluation* [online]. 2011, 02(03) [cit. 2025-04-15]. ISSN 21577439. Dostupné z: doi:10.4172/2157-7439.1000110
- [134] KIM, Eun Suh, Youjin BAEK, Hyun-Jae YOO, Ji-Soo LEE a Hyeon Gyu LEE. Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles Prepared by Ionic Gelation Improve the Antioxidant Activities of Astaxanthin in the In Vitro and In Vivo Model. *Antioxidants* [online]. 2022, 11(3) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox11030479
- [135] CORREA, Rodolpho Fagundes, Giovana COLUCCI, Nouredine HALLA, João Alves PINTO, Arantzazu SANTAMARIA-ECHART, Silvia Priscila BLANCO, Isabel Patrícia FERNANDES a Maria Filomena BARREIRO. Development of Chitosan Microspheres through a Green Dual

- Crosslinking Strategy Based on Tripolyphosphate and Vanillin. *Molecules* [online]. 2021, 26(8) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26082325
- [136] KOPPOLU, Bhanuprasanth a David A. ZAHAROFF. The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells. *Biomaterials* [online]. 2013, 34(9), 2359-2369 [cit. 2025-04-15]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2012.11.066
- [137] KECILI, Rustem a Chaudhery Mustansar HUSSAIN. Mechanism of Adsorption on Nanomaterials. *Nanomaterials in Chromatography* [online]. Elsevier, 2018, 89-115 [cit. 2025-04-15]. ISBN 9780128127926. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812792-6.00004-2
- [138] XU, Shouping, Hao LI, Huan DING, Zhouxiang FAN, Pihui PI, Jiang CHENG a Xiufang WEN. Allylated chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel based on a functionalized double network for controlled drug release. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, 214, 8-14 [cit. 2025-04-15]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.03.008
- [139] KAASALAINEN, Martti, Vladimir ASEYEV, Eva VON HAARTMAN, Didem Şen KARAMAN, Ermei MÄKILÄ, Heikki TENHU, Jessica ROSENHOLM a Jarno SALONEN. Size, Stability, and Porosity of Mesoporous Nanoparticles Characterized with Light Scattering. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2017, 12(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1931-7573. Dostupné z: doi:10.1186/s11671-017-1853-y
- [140] HACKLEY, Vincent A. a Jeffrey D. CLOGSTON. Measuring the Hydrodynamic Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 2011-10-19, 35-52 [cit. 2025-04-15]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-60327-197-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60327-198-1_4
- [141] KUMAR KURIL, Akhilesh a K SARAVANAN. Particle Matter determination in Biosimilar Parenteral Product by the Application of Dynamic Light Scattering (DLS) Followed by Statistical Evaluation. *EJPPS EUROPEAN JOURNAL OF PARENTERAL AND PHARMACEUTICAL SCIENCES* [online]. [cit. 2025-04-15]. ISSN 2633-6588. Dostupné z: doi:10.37521/29201
- [142] KIM, Ahram, Wei Beng NG, William BERNT a Nam-Joon CHO. Validation of Size Estimation of Nanoparticle Tracking Analysis on Polydisperse Macromolecule Assembly. *Scientific Reports* [online]. 2019, 9(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-38915-x
- [143] ANTAL, Iryna, Oliver STRBAK, Vlasta ZAVISOVA, et al. Development of Positively Charged Poly-L-Lysine Magnetic Nanoparticles as Potential MRI Contrast Agent. *Nanomaterials* [online]. 2023, 13(12) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano13121831
- [144] ROGERS, Kim R., Jana NAVRATILOVA, Aleksandr STEFANIAK, et al. Characterization of engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products advertised to

- contain colloidal silver. *Science of The Total Environment* [online]. 2018, 619-620, 1375-1384 [cit. 2025-04-15]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.11.195
- [145] YAN, Qinying, Jiaqi WENG, Xieqi WU, et al. Characteristics, Cryoprotection Evaluation and In Vitro Release of BSA-Loaded Chitosan Nanoparticles. *Marine Drugs* [online]. 2020, 18(6) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md18060315
- [146] CLAYTON, Katherine N., Janelle W. SALAMEH, Steven T. WERELEY a Tamara L. KINZER-URSEM. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics* [online]. 2016, 2016-09-01, 10(5) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1932-1058. Dostupné z: doi:10.1063/1.4962992
- [147] GORDILLO-GALEANO, Aldemar a Claudia Elizabeth MORA-HUERTAS. Hydrodynamic diameter and zeta potential of nanostructured lipid carriers: Emphasizing some parameters for correct measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2021, 620 [cit. 2025-04-15]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2021.126610
- [148] LIN, Jui-Yen, Ingyu LEE, Cuijuan FENG, Hyunook KIM a Chin-Pao HUANG. Electrophoresis Characterization of Nanoplastic Particle Surface Charge in Dilute Aqueous Electrolytes. *Environmental Engineering Science* [online]. 2024, 2024-11-01, 41(11), 467-476 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1557-9018. Dostupné z: doi:10.1089/ees.2024.0076
- [149] CORTÉS-RÍOS, Javiera, Ana María ZÁRATE, Juan David FIGUEROA, Joaquín MEDINA, Eduardo FUENTES-LEMUS, María RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, Margarita ALIAGA a Camilo LÓPEZ-ALARCÓN. Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Analytical Biochemistry* [online]. 2020, 608 [cit. 2025-04-15]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2020.113904
- [150] KHRAMTSOV, Pavel, Tatyana KALASHNIKOVA, Maria BOCHKOVA, Maria KROPANEVA, Valeria TIMGANOVA, Svetlana ZAMORINA a Mikhail RAYEV. Measuring the concentration of protein nanoparticles synthesized by desolvation method: Comparison of Bradford assay, BCA assay, hydrolysis/UV spectroscopy and gravimetric analysis. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2021, 599 [cit. 2025-04-15]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120422
- [151] THERMO SCIENTIFIC. Micro BCA™ Protein Assay Kit – Instruction Manual. [online]. Rockford, IL: Thermo Fisher Scientific, [cit. 2025-04-15]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23235>
- [152] ZHANG, Hong-liang, Si-hui WU, Yi TAO, Lin-quan ZANG, Zheng-quan SU a Gaurav MAGO. Preparation and Characterization of Water-Soluble Chitosan Nanoparticles as Protein Delivery System. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2010, 2010(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1687-4110. Dostupné z: doi:10.1155/2010/898910

- [153] GAUR, Manish, Sarita MAURYA, Mohd. Sohail AKHTAR a Awadh Bihari YADAV. Synthesis and Evaluation of BSA-Loaded PLGA–Chitosan Composite Nanoparticles for the Protein-Based Drug Delivery System. *ACS Omega* [online]. 2023, 2023-05-30, 8(21), 18751-18759 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.3c00738
- [154] JESUS, Sandra, Gerrit BORCHARD a Olga BORGES. Freeze Dried Chitosan/ Poly-ε-Caprolactone and Poly-ε-Caprolactone Nanoparticles: Evaluation of their Potential as DNA and Antigen Delivery Systems. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy* [online]. 2013, 4(7) [cit. 2025-04-15]. ISSN 21577412. Dostupné z: doi:10.4172/2157-7412.1000164
- [155] MAVER, Tina, Lidija GRADIŠNIK, Dragica Maja SMRKE, Karin STANA KLEINSCHEK a Uroš MAVER. Systematic Evaluation of a Diclofenac-Loaded Carboxymethyl Cellulose-Based Wound Dressing and Its Release Performance with Changing pH and Temperature. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2019, 20(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-018-1236-4
- [156] SHARPE, J.R., K.L. HARRIS, K. JUBIN, N.J. BAINBRIDGE a N.R. JORDAN. The effect of pH in modulating skin cell behaviour. *British Journal of Dermatology* [online]. 2009, 161(3), 671-673 [cit. 2025-04-15]. ISSN 00070963. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09168.x
- [157] ZHANG, Rong, Yongchang TIAN, Long PANG, Taimin XU, Bing YU, Hailin CONG a Youqing SHEN. *Wound Microenvironment-Responsive Protein Hydrogel Drug-Loaded System with Accelerating Healing and Antibacterial Property* [online]. 2022, 2022-03-02, 14(8), 10187-10199 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acscami.2c00373
- [158] BANERJEE, Indranil, Debasish MISHRA, Tamal DAS a Tapas K. MAITI. Wound pH-Responsive Sustained Release of Therapeutics from a Poly(NIPAAm-co-AAc) Hydrogel. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2012, 2012-01-01, 23(1-4), 111-132 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/092050610X545049
- [159] PICHETH, Guilherme Fadel, Maria Rita SIERAKOWSKI, Marco Aurelio WOEHL, Lucy ONO, Axel Rulf COFRÉ, Luana Pasetti VANIN, Roberto PONTAROLO a Rilton Alves DE FREITAS. Lysozyme-Triggered Epidermal Growth Factor Release from Bacterial Cellulose Membranes Controlled by Smart Nanostructured Films. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, 103(12), 3958-3965 [cit. 2025-04-15]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.24205
- [160] ALTUNTAS, Sevde, Harkiranpreet Kaur DHALIWAL, Ahmed EID RADWAN, Mansoor AMIJI a Fatih BUYUKSERIN. Local epidermal growth factor delivery using nanopillared chitosan–gelatin films for melanogenesis and wound healing. *Biomaterials Science* [online]. 2022, 2022-12-20, 11(1), 181-194 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/D2BM00836J
- [161] SINANI, Genada, Melike SESSEVMEZ, M. Koray GÖK, Saadet ÖZGÜMÜŞ, H. Oya ALPAR a Erdal CEVHER. Modified chitosan-based nanoadjuvants enhance immunogenicity of protein

- antigens after mucosal vaccination. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2019, 569 [cit. 2025-04-15]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118592
- [162] AIBANI, Noorjahan, Raj RAI, Parth PATEL, Grace CUDDIHY a Ellen K. WASAN. Chitosan Nanoparticles at the Biological Interface: Implications for Drug Delivery. *Pharmaceutics* [online]. 2021, 13(10) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics13101686
- [163] JE, Hyun Jeong, Eun Suh KIM, Ji-Soo LEE a Hyeon Gyu LEE. Release Properties and Cellular Uptake in Caco-2 Cells of Size-Controlled Chitosan Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2017, 2017-12-20, 65(50), 10899-10906 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.7b03627
- [164] ZHANG, Jing, Xi Guang CHEN, Wei Bing PENG a Cheng Sheng LIU. Uptake of oleoyl-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2008, 4(3), 208-214 [cit. 2025-04-15]. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2008.03.006
- [165] DONAHUE, Nathan D., Handan ACAR a Stefan WILHELM. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2019, 143, 68-96 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2019.04.008
- [166] DONAHUE, Nathan D., Handan ACAR a Stefan WILHELM. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2019, 143, 68-96 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2019.04.008
- [167] FOROOZANDEH, Parisa a Azlan Abdul AZIZ. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2018, 13(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 1931-7573. Dostupné z: doi:10.1186/s11671-018-2728-6
- [168] ALMALIK, Abdulaziz, Shima KARIMI, Sihem OUSTI, Roberto DONNO, Christine WANDREY, Philip J. DAY a Nicola TIRELLI. Hyaluronic acid (HA) presentation as a tool to modulate and control the receptor-mediated uptake of HA-coated nanoparticles. *Biomaterials* [online]. 2013, 34(21), 5369-5380 [cit. 2025-04-15]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.065
- [169] SUSNIK, Eva, Amelie BAZZONI, Patricia TALADRIZ-BLANCO, et al. Epidermal growth factor alters silica nanoparticle uptake and improves gold-nanoparticle-mediated gene silencing in A549 cells. *Frontiers in Nanotechnology* [online]. 2023, 2023-7-17, 5 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2673-3013. Dostupné z: doi:10.3389/fnano.2023.1220514
- [170] GABOLD, Bettina, Friederike ADAMS, Sophie BRAMEYER, Kirsten JUNG, Christian L. RIED, Thomas MERDAN a Olivia M. MERKEL. Transferrin-modified chitosan nanoparticles for targeted nose-to-brain delivery of proteins. *Drug Delivery and Translational*

- Research* [online]. 2023, 13(3), 822-838 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2190-393X. Dostupné z: doi:10.1007/s13346-022-01245-z
- [171] SONG, Huijuan, Chang SU, Wenyu CUI, Bingya ZHU, Liwei LIU, Zhenhua CHEN a Liang ZHAO. Folic Acid-Chitosan Conjugated Nanoparticles for Improving Tumor-Targeted Drug Delivery. *BioMed Research International* [online]. 2013, 2013, 1-6 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/723158
- [172] NASCIMENTO, Ana Vanessa, Amit SINGH, Hassan BOUSBAA, Domingos FERREIRA, Bruno SARMENTO a Mansoor M. AMIJI. Mad2 Checkpoint Gene Silencing Using Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Chitosan Nanoparticles in Non-Small Cell Lung Cancer Model. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2014, 2014-10-06, 11(10), 3515-3527 [cit. 2025-04-16]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/mp5002894
- [173] MILLER, Kristen P., Lei WANG, Brian C. BENICEWICZ a Alan W. DECHO. Inorganic nanoparticles engineered to attack bacteria. *Chemical Society Reviews* [online]. 2015, 2015-10-19, 44(21), 7787-7807 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C5CS00041F
- [174] MALATESTA, M., S. GRECCHI, E. CHIESA, B. CISTERNA, M. COSTANZO a C. ZANCANARO. Internalized chitosan nanoparticles persist for long time in cultured cells. *European Journal of Histochemistry* [online]. 2015, 2015-02-03, 59(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2038-8306. Dostupné z: doi:10.4081/ejh.2015.2492
- [175] HUANG, Min, Zengshuan MA, Eugene KHOR a Lee-Yong LIM. Uptake of FITC-Chitosan Nanoparticles by A549 Cells. *Pharmaceutical Research* [online]. 2002, 19(10), 1488-1494 [cit. 2025-04-27]. ISSN 07248741. Dostupné z: doi:10.1023/A:1020404615898
- [176] SOUTO, Gabriele Dadalt, Zeineb FARHANE, Alan CASEY, Esen EFEOGLU, Jennifer MCINTYRE a Hugh James BYRNE. Evaluation of cytotoxicity profile and intracellular localisation of doxorubicin-loaded chitosan nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2016, 408(20), 5443-5455 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-016-9641-6
- [177] HE, Xiaohang, Linqing HU, Liangsong ZOU, Jiachun ZHONG, Hong LUO a Zejun PU. Enhanced fluorescence properties of flexible waterborne polyurethane films by blocking fluorescein isothiocyanate (FITC). *Materials Letters* [online]. 2021, 293 [cit. 2025-04-15]. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2021.129668
- [178] LIU, Chuang, Liping XIE a Rongqing ZHANG. Heterogeneous distribution of dye-labelled biomaterialization proteins in calcite crystals. *Scientific Reports* [online]. 2016, 2016-11-22, 5(1) [cit. 2025-04-15]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep18338
- [179] KODIRKHONOV, Murodkhon R. Obtaining the Fluorescent Chitosan for Investigations in the Analytical Ultracentrifuge. *Advances in Biological Chemistry* [online]. 2019, 09(01), 23-30 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2162-2183. Dostupné z: doi:10.4236/abc.2019.91002

- [180] MCHEDLOV-PETROSSYAN, N.O., ISAENKO, Y.V., VODOLAZKAYA, N.A. a GOGA, S.T. Acid-base behavior of fluorescein isothiocyanate in aqueous media and in micellar surfactant solutions. Вісник Харківського національного університету. Серія: Хімія, 2006, č. 731, vyd. 14(37), s. 188–194. [online]. [cit. 2025-04-15]. Dostupné z: <https://ekhnur.karazin.ua/items/fa6a993f-458c-41de-94b9-8e30697e6f81>
- [181] VICENTE, Nathalie B, Javier E Diaz ZAMBONI, Javier F ADUR, Enrique V PARAVANI a Victor H CASCO. Photobleaching correction in fluorescence microscopy images. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2007, 2007-11-01, 90 [cit. 2025-04-15]. ISSN 1742-6596. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/90/1/012068
- [182] JIA, Xiaoyan, Xue CHEN, Yinglei XU, Xinyan HAN a Zirong XU. Tracing transport of chitosan nanoparticles and molecules in Caco-2 cells by fluorescent labeling. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2009, 78(2), 323-329 [cit. 2025-04-15]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2009.04.020
- [183] ZHAO, Jiayin a Jianmin WU. Preparation and Characterization of the Fluorescent Chitosan Nanoparticle Probe. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2006, 34(11), 1555-1559 [cit. 2025-04-15]. ISSN 18722040. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-2040(07)60015-2
- [184] JIANG, Yibing, Xiwei YU, Chang SU, Liang ZHAO a Yijie SHI. Chitosan nanoparticles induced the antitumor effect in hepatocellular carcinoma cells by regulating ROS-mediated mitochondrial damage and endoplasmic reticulum stress. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2019, 2019-12-04, 47(1), 747-756 [cit. 2025-04-15]. ISSN 2169-1401. Dostupné z: doi:10.1080/21691401.2019.1577876
- [185] COSTA, Eduardo M., Sara SILVA a Manuela PINTADO. Chitosan Nanoparticles Production: Optimization of Physical Parameters, Biochemical Characterization, and Stability upon Storage. *Applied Sciences* [online]. 2023, 13(3) [cit. 2025-04-16]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app13031900
- [186] VLLASALIU, Driton, Ruth EXPOSITO-HARRIS, Angeles HERAS, Luca CASETTARI, Martin GARNETT, Lisbeth ILLUM a Snow STOLNIK. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2010, 400(1-2), 183-193 [cit. 2025-04-16]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2010.08.020
- [187] YU, Zhenjing, Lina MA, Shujuan YE, Ganggang LI a Mengmeng ZHANG. Construction of an environmentally friendly octenylsuccinic anhydride modified pH-sensitive chitosan nanoparticle drug delivery system to alleviate inflammation and oxidative stress. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, 236 [cit. 2025-04-16]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2020.115972
- [188] LOUTFY, Samah A, Hanaa M ALAM EL-DIN, Mostafa H ELBERRY, Nanis G ALLAM, M T M HASANIN a Ahmed M ABDELLAH. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of

- chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2016, 2016-09-01, 7(3) [cit. 2025-04-16]. ISSN 2043-6262. Dostupné z: doi:10.1088/2043-6262/7/3/035008
- [189] RAMADAN, Marwa A., Amna H. FAID a Amna H. FAID. "Ionic Gelation Synthesis, Characterization and Cytotoxic Evaluation of Chitosan Nanoparticles on Different Types of Human Cancer Cell Models." *Egyptian Journal of Chemistry* [online]. 2021, 2021-08-22, 67(2), 153-159 [cit. 2025-04-16]. ISSN 2357-0245. Dostupné z: doi:10.21608/ejchem.2021.82733.4070
- [190] VALADES-AGUILAR, Bruno Alejandro, Teodoro Iván RIVERA-GONZÁLEZ, Raúl RANGEL-LÓPEZ, Gabriel LUNA-BARCENAS, Moisés Ármides FRANCO-MOLINA, Cristina RODRIGUEZ-PADILLA a Diana Ginette ZÁRATE-TRIVIÑO. Influence of Chitosan Purification on the Immunomodulator Potential of Chitosan Nanoparticles on Human Monocytes. *Polymers* [online]. 2024, 16(23) [cit. 2025-04-16]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym16233390
- [191] NOGUEIRA, Daniele Rubert, Lorena TAVANO, Montserrat MITJANS, Lourdes PÉREZ, M. Rosa INFANTE a M. Pilar VINARDELL. In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. *Biomaterials* [online]. 2013, 34(11), 2758-2772 [cit. 2025-04-16]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.005
- [192] OMAR ZAKI, Siti Sarah, Haliza KATAS a Zariyantey Abd HAMID. Lineage-related and particle size-dependent cytotoxicity of chitosan nanoparticles on mouse bone marrow-derived hematopoietic stem and progenitor cells. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2015, 85, 31-44 [cit. 2025-04-16]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2015.05.017
- [193] CHOU, Chih-Ming, Fwu-Long MI, Jiun-Lin HORNG, et al. Characterization and toxicology evaluation of low molecular weight chitosan on zebrafish. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, 240 [cit. 2025-04-16]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2020.116164
- [194] LORETZ, Brigitta a Andreas BERNKOP-SCHNÜRCH. In vitro cytotoxicity testing of non-thiolated and thiolated chitosan nanoparticles for oral gene delivery. *Nanotoxicology* [online]. 2009, 2009-07-10, 1(2), 139-148 [cit. 2025-04-16]. ISSN 1743-5390. Dostupné z: doi:10.1080/17435390701554200
- [195] WU, Peng, Xiaoyong WANG, Min YIN, et al. ULK1 Mediated Autophagy-Promoting Effects of Rutin-Loaded Chitosan Nanoparticles Contribute to the Activation of NF-κB Signaling Besides Inhibiting EMT in Hep3B Hepatoma Cells. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2024, 19, 4465-4493 [cit. 2025-04-16]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S443117
- [196] JESUS, Sandra, Ana Patrícia MARQUES, Alana DUARTE, et al. Chitosan Nanoparticles: Shedding Light on Immunotoxicity and Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2020, 2020-2-21, 8 [cit. 2025-04-16]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00100

- [197] RAJAM, A Merlin, P JITHENDRA, C ROSE a Asit B MANDAL. In vitro evaluation of dual growth factor-incorporated chitosan nanoparticle impregnated collagen–chitosan scaffold for tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* [online]. 2012, 27(3), 265-277 [cit. 2025-04-16]. ISSN 0883-9115. Dostupné z: doi:10.1177/0883911512442123
- [198] AL-NEMRAWI, N. K., S. S. M. ALSHARIF a R. H. DAVE. PREPARATION OF CHITOSAN-TPP NANOPARTICLES: THE INFLUENCE OF CHITOSAN POLYMERIC PROPERTIES AND FORMULATION VARIABLES. *International Journal of Applied Pharmaceutics* [online]. 2018, 2018-09-08, 10(5), 60-65 [cit. 2025-04-16]. ISSN 0975-7058. Dostupné z: doi:10.22159/ijap.2018v10i5.26375
- [199] KATAS, H, Z HUSSAIN a SA RAHMAN. Storage Stabilisation of Albumin-Loaded Chitosan Nanoparticles by Lyoprotectants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2013, 2013-05-09, 12(2), 135-142 [cit. 2025-04-16]. ISSN 1596-9827. Dostupné z: doi:10.4314/tjpr.v12i2.1
- [200] KULVANICH, Poj, Chutima SINSUEBPOL a Jittima CHATCHAWALSAISIN. Preparation and in vivo absorption evaluation of spray dried powders containing salmon calcitonin loaded chitosan nanoparticles for pulmonary delivery. *Drug Design, Development and Therapy* [online]. [cit. 2025-04-16]. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S47681
- [201] ZHAO, Lujie, Xu DUAN, Weiwei CAO, Xing REN, Guangyue REN, Panpan LIU a Junliang CHEN. Effects of Different Drying Methods on the Characterization, Dissolution Rate and Antioxidant Activity of Ursolic Acid-Loaded Chitosan Nanoparticles. *Foods* [online]. 2021, 10(10) [cit. 2025-04-16]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10102470
- [202] ELIYAHU, Shaked, Andreia ALMEIDA, Maria Helena MACEDO, José DAS NEVES, Bruno SARMENTO a Havazelet BIANCO-PELED. The effect of freeze-drying on mucoadhesion and transport of acrylated chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2020, 573 [cit. 2025-04-16]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118739
- [203] THANDAPANI, Gomathi, Supriya Prasad P., Sudha P.N. a Anil SUKUMARAN. Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, 104, 1794-1806 [cit. 2025-04-16]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.057
- [204] WONG, Chun Y., Hani AL-SALAMI a Crispin R. DASS. Lyophilisation Improves Bioactivity and Stability of Insulin-Loaded Polymeric-Oligonucleotide Nanoparticles for Diabetes Treatment. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2020, 21(3) [cit. 2025-04-16]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-020-01648-6
- [205] ZHAO, Yingyuan, Zhaoxuan WANG, Shuxian LIU, Shiyang XIE, Yinchun XIE, Ruifang LI a Hiroaki ODA. Lyoprotectant Formulation and Optimization of the J-Aggregates Astaxanthin/BSA/Chitosan Nanosuspension. *Biomolecules* [online]. 2023, 13(3) [cit. 2025-04-16]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom13030496

- [206] POURSHAHAB, Pejman Sadegh, Kambiz GILANI, Esmaeil MOAZENI, Hamideh ESLAHI, Mohammad Reza FAZELI a Hossein JAMALIFAR. Preparation and characterization of spray dried inhalable powders containing chitosan nanoparticles for pulmonary delivery of isoniazid. *Journal of Microencapsulation* [online]. 2011, 2011-08-23, 28(7), 605-613 [cit. 2025-04-16]. ISSN 0265-2048. Dostupné z: doi:10.3109/02652048.2011.599437
- [207] ISLAM, Paromita, Jorrit WATER, Adam BOHR a Jukka RANTANEN. Chitosan-Based Nano-Embedded Microparticles: Impact of Nanogel Composition on Physicochemical Properties. *Pharmaceutics* [online]. 2017, 9(1) [cit. 2025-04-16]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics9010001
- [208] RUSLAN, Norra Shamiela, Noratiqah MOHTAR, Siti Sarah Fazalul RAHIMAN a Amirah MOHD GAZZALI. The influence of preparation factors on physical characteristics of chitosan nanoparticles. *Journal of Physical Science* [online]. 2020, 2020-11-25, 31(3), 47-60 [cit. 2025-04-16]. ISSN 16753402. Dostupné z: doi:10.21315/jps2020.31.3.4
- [209] KOMÁRKOVÁ, Kateřina. *Studium lyofilizovaných chitosanových částic s proteiny*. Pardubice, 2024. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [210] BENTO, Dulce, Sandra JESUS, Filipa LEBRE, Teresa GONÇALVES a Olga BORGES. Chitosan Plus Compound 48/80: Formulation and Preliminary Evaluation as a Hepatitis B Vaccine Adjuvant. *Pharmaceutics* [online]. 2019, 11(2) [cit. 2024-10-15]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11020072
- [211] BISWAS, S., CHATTOPADHYAY, M., SEN, K. K. et al. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. *Carbohydrate Polymers*. 2015, vol. 121, p. 403-410.
- [212] KAHYA, Nilay a F. Bedia ERIM. Surfactant modified alginate composite gels for controlled release of protein drug. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, 224 [cit. 2025-02-17]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115165
- [213] JONASSEN, Helene, Anna-Lena KJØNIKSEN a Marianne HIORTH. Stability of Chitosan Nanoparticles Cross-Linked with Tripolyphosphate. *Biomacromolecules* [online]. 2012, 2012-11-12, 13(11), 3747-3756 [cit. 2025-04-24]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm301207a
- [214] ImageJ. *Scientific Imaging Tutorials*. [online]. [cit. 2025-04-24]. Dostupné z: <https://imagej.net/imaging/>
- [215] OSSWALD, Christian R. a Jennifer J. KANG-MIELER. Controlled and Extended Release of a Model Protein from a Microsphere-Hydrogel Drug Delivery System. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 2015, 43(11), 2609-2617 [cit. 2025-04-25]. ISSN 0090-6964. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-015-1314-7

- [216] HANH CAO, Luu Ngoc, Tuong Vy NGUYEN, Nhu Quynh NGUYEN, Thi Bich THUYEN NGUYEN, Huynh Vu Thanh LUONG a Duy Toan PHAM. Alginate functionalized chitosan nanoparticles using multilayer co-axial electro-spraying for ovalbumin controlled release via oral delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2024, 96 [cit. 2025-04-25]. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2024.105733
- [217] MEYLINA, Lisna, Muchtaridi MUCHTARIDI, I Made JONI, Khaled M. ELAMIN a Nasrul WATHONI. Hyaluronic Acid-Coated Chitosan Nanoparticles as an Active Targeted Carrier of Alpha Mangostin for Breast Cancer Cells. *Polymers* [online]. 2023, 15(4) [cit. 2025-04-28]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym15041025
- [218] CARRASCO-SANDOVAL, Jonathan, Mario ARANDA, Karem HENRÍQUEZ-AEDO, Marcos FERNÁNDEZ, Amparo LÓPEZ-RUBIO a María José FABRA. Impact of molecular weight and deacetylation degree of chitosan on the bioaccessibility of quercetin encapsulated in alginate/chitosan-coated zein nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2023, 242 [cit. 2025-04-28]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.124876
- [219] WU, Haishan, Ting GUO, Jian NAN, Liu YANG, Guangfu LIAO, Hyun Jin PARK a Jinglei LI. Hyaluronic-Acid-Coated Chitosan Nanoparticles for Insulin Oral Delivery: Fabrication, Characterization, and Hypoglycemic Ability. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2022, 22(7) [cit. 2025-04-28]. ISSN 1616-5187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.202100493
- [220] TAGHIPOUR-SABZEVAR, Vahid, Tahere SHARIFI, Shadab BAGHERI-KHOULENJANI, Vahabodin GOODARZI, Hamid KOOSHKI, Raheleh HALABIAN a Mehrdad MOOSAZADEH MOGHADDAM. Targeted delivery of a short antimicrobial peptide against CD44-overexpressing tumor cells using hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: An in vitro study. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2020, 22(5) [cit. 2025-04-28]. ISSN 1388-0764. Dostupné z: doi:10.1007/s11051-020-04838-2
- [221] PULUHULAWA, Lisa Efriani, I Made JONI, Khaled M. ELAMIN, Ahmed Fouad Abdelwahab MOHAMMED, Muchtaridi MUCHTARIDI a Nasrul WATHONI. Chitosan–Hyaluronic Acid Nanoparticles for Active Targeting in Cancer Therapy. *Polymers* [online]. 2022, 14(16) [cit. 2025-04-28]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14163410
- [222] TSENG, Ching-Li a Feng-Huei LIN. PREPARATION OF GELATIN NANOPARTICLES WITH EGFR SELECTION ABILITY VIA BIOTINYLATED-EGF CONJUGATION FOR LUNG CANCER TARGETING. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications* [online]. 2012, 2012-04-25, 20(03), 161-169 [cit. 2025-04-30]. ISSN 1016-2372. Dostupné z: doi:10.4015/S1016237208000714
- [223] LIM, Hyun Jung a Eui-Hong BYUN. Evaluation of Anti-Cancer Activity of *Gryllus bimaculatus* Water Extract on Non-Small Cancer Lung Cell via Apoptosis. *Preventive Nutrition and Food*

- Science* [online]. 2021, 2021-12-31, 26(4), 453-458 [cit. 2025-04-30]. ISSN 2287-1098. Dostupné z: doi:10.3746/pnf.2021.26.4.453
- [224] SLOVAKOVA, Marcela, Sylva JANOVSKA, Radek SLEHA, et al. Nasal Immunization Using Chitosan Nanoparticles with Glycoprotein B of Murine Cytomegalovirus. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2024, 2024-03-28, 34(3), 663-672 [cit. 2025-04-30]. ISSN 1017-7825. Dostupné z: doi:10.4014/jmb.2308.08008
- [225] TSAI, Wen-Hsuan, Kun-Hua YU, Yi-Cheng HUANG a Cheng-I LEE. EGFR-targeted photodynamic therapy by curcumin-encapsulated chitosan/TPP nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2018, 13, 903-916 [cit. 2025-04-30]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S148305
- [226] SOUSA DE ALMEIDA, Mauro, Arya ROSHANFEKR, Sandor BALOG, Alke PETRI-FINK a Barbara ROTHEN-RUTISHAUSER. Cellular Uptake of Silica Particles Influences EGFR Signaling Pathway and is Affected in Response to EGF. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2023, 18, 1047-1061 [cit. 2025-04-30]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S388557
- [227] BOLKOVÁ, Alex. *Příprava chitosanových částic s proteiny pro podání na sliznici*. Pardubice, 2021. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [228] Caro León, F. J., Lizardi-Mendoza, J., Argüelles-Monal, W., Carvajal-Millan, E., López Franco, Y. L., & Goycoolea, F. M. Supercritical CO₂ dried chitosan nanoparticles: production and characterization. *RSC Advances*, 2017, 7(49), 30879–30885. DOI: 10.1039/C7RA02555F.