

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**FUNKCIONALIZOVANÁ NANOVLÁKNA PRO ZRYCHLENOU
REGENERACI MĚKKÝCH TKÁNÍ**

**FUNCTIONALIZED NANOFIBERS FOR ACCELERATED
REGENERATION OF SOFT TISSUES**

Philipp Bazikov

Školitel: Mgr. Eva Filová, Ph.D.

Praha 2017

Poděkování patří mému školiteli Mgr. Evě Filové, Ph.D., za pomoc a cenné rady, které mi poskytovala v průběhu psaní této práce.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 24.08.17

Philipp Bazikov

Podpis

Obsah:

Abstrakt	4
Abstract	5
Seznam zkratk	6
Úvod	7
1. Chitosanová nanovlákná pro regeneraci	9
1.1. Chitosan	9
1.2. Zdroje chitinu	10
2. Možnosti funkcionalizace chitosanových nanovláken	11
2.1. Chemické modifikace nanovláken	11
2.2. Fyzikální modifikace	14
3. Chitin-glukanový komplex s antibakteriální aktivitou nanovláken při hojení ran	15
4. Modifikace chitosanu pomocí trombocytů a jiných produktů krevní separace	16
5. Dodávání léčiv nanovlákná	17
6. Závěr	22
7. Seznam použité literatury	23

Abstrakt

Pro zlepšení regenerace byly vyvinuty kryty na rány obsahující nanovlákná různého složení a funkčních vlastností. Tato práce se věnuje chitosanu a složeným nosičům s obsahem chitosanu. Porézní nanovláknenné materiály založené na chitosanu se jeví jako nejslibnější pro regeneraci měkkých tkání. Chitosan vykazuje pH citlivé chování kvůli velkému počtu aminoskupin na řetězcích, což činí z chitosanových nanovláken slibné nosiče pro dodávání látek. Pro zvýšení účinnosti a urychlení regenerace měkkých tkání nanovlákná jsou funkcionalizována bioaktivními látkami různých typů: antimikrobiální, analgetické léčivé látky, růstové faktory atd., stejně jako funkční polymery. Pro stabilizaci nanovláken ve vodném prostředí, které současně zlepšuje fyzikální vlastnosti, se nanovlákná síťují pomocí glutaraldehydu, glyoxalu, genipinem nebo tepelným ošetřením.

Chitosan se používá k inhibici tvorby fibrózní tkáně při hojení ran a k podpoře růstu a diferenciaci tkáně v tkáňové kultuře. Byla prokázána antimikrobiální účinnost komplexu chitin-glukan s nanovláknem pro hojení ran. Rekonstrukce hlubších ran, v nichž jsou pokožka a měkké tkáně poškozené, vyžaduje opatření k prostorové rekonstrukci a stimulaci regeneračních procesů v objemu defektu. V tomto případě je navíc vhodné použití krevních destiček, buněčných komponent a produktů sekrece buněk. Jako nová strategie pro funkcionalizaci nanovláken je slibný systém dodávání léků, který používá nanovezikuly (lipozomy a niozomy) v kombinaci s nanovláknem pro regenerační medicínu.

Klíčová slova: regenerace, funkcionalizace, nanovlákná, chitosan, hojení ran, nanovezikuly, niozomy, regenerační medicína.

Abstract

To improve the regeneration of soft tissues, wound coatings were developed, containing nanofibres, different in composition and functional features. The work concentrates on chitosan and composite scaffolds containing chitosan. Porous nanofiber materials based on chitosan are the most promising nanofibers for the regeneration of soft tissues. Chitosan exhibits pH-sensitive behavior due to the large number of amino groups on its chains, which makes chitosan nanofibers promising carriers for the delivery of macromolecules. To increase the efficiency and accelerate the regeneration of soft tissues, nanofibers are functionalized with bioactive substances of various types: antimicrobial, analgesic, growth factors, etc., as well as functional polymers. To stabilize nanofibers and to improve the physical characteristics, treatment using glutaraldehyde, glyoxal, genipin or heat treatment are used.

Chitosan is used to inhibit fibroplasia during wound healing and to promote tissue growth and differentiation in tissue culture. The efficiency of antibacterial activity of chitin-glucan complex with nanofibers for wound healing was shown. Reconstruction of deeper wounds, in which skin and soft tissues are damaged, requires measures for spatial reconstruction and stimulation of regeneration processes in the volume of the defect. In this case, the use of platelets, cellular components and cell secretion products is productive. As a new strategy for nanofiber functionalization, the drug delivery system using nanovesicles (liposomes and niosomes) in combination with nanofibers for regenerative medicine is promising.

Keywords: regeneration, functionalization, nanofibres, chitosan, wound healing, nanovesicles, niosomes, regenerative medicine.

Seznam zkratek

TPP – tripolyfosfát

pH – acidobazická rovnováha

PEO – polyethylenoxid

ChCsGC – chitin / chitosan – glukan

PVA – polyvinylalkohol

MC – metylcelulóza

PVP – polyvinylpyrrolidon

PDGF – růstový faktor odvozený od krevních destiček

TGF – transformující růstový faktor

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor

EGF – epiteliální růstový faktor

FGF – fibroblastový růstový faktor

IGF – inzulínu podobný růstový faktor

PEG – polyetylen glykol

RES – retikuloendoteliální systém

PCL – polykaprolakton

PLGA – kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové

HRP – křenová peroxidáza

ÚVOD

Poškození kůže a měkkých tkání se vyskytují v místě poranění, popálení nebo v zóně chirurgických zákroků. Stávající metody hojení ran jsou málo účinné. Regeneraci zabraňuje – zjizvení tkáni v důsledku tkáňové degenerace, oxidačních poškození, nerovnováze vlhkostí tkáně během hojení a možné infekce. V tomto ohledu je zapotřebí urychlit proces hojení ran a zlepšit strukturálně – funkční vlastnosti nově vytvořené tkáně. V poslední době byly pro zlepšení regenerace vyvinuty kryty ran, které představují nanovlákná s rozdílným složením a funkční charakteristikou (Mi F.-L. et al., 2001, Wiesmann W. P. et al., 2012, Johnson R. Et al., 2012).

Optimální kryty ran by měly umožňovat přenos plynů a vlhkosti, které jsou nezbytné pro plnou integraci a buněčnou aktivitu. Je také nutné kopírovat povrch rány, tj. materiál musí být flexibilní a pohodlný při manipulaci a poskytovat efektivní odstranění exsudátu.

Důležitou vlastností moderních krytů ran je, že jsou atraumatické: při jejich odstranění nesmí být poškozena vytvořená epitelální vrstva. Optimální kryty musí nejen zabránit infekci, ale také mají umožnit podávání léku (Wiesmann W.P. et al., 2012, Johnson R. et al., 2012). Proto k využití modifikací nanovlákn je třeba přidat další funkce.

Porézní nanovláknenné nosiče na bázi chitosanu jsou nejslibnější pro regeneraci měkkých tkání. Potenciální použití nanovlákn jako nosičů léků bylo v posledních letech představeno jako důležitý úkol, protože nanočástice a nanovlákná byly vyvinuty s cílem vylepšit farmakologické i léčebné účinky spočívající ve snížení jejich toxických vedlejších účinků (Feng, S. S. 2004, Brannon Peppas I. et al., 2004). Nanočástice v nanovlákněch sloužících jako nosič léku poskytují kontinuální a kontrolované uvolňování léčiv, udržují hladinu léku v rámci požadované úrovně, ale také umožňují lokalizaci a konkrétní zacílení účinku léků v požadované tkáni, čímž snižují dávku léků a zlepšují stav pacienta (Devalapally h. et al., 2007).

V poslední době chitosan přitahuje hodně pozornosti v oblasti farmaceutické a biomedicínské kvůli svým příznivým biologickým vlastnostem, jako jsou například biologická degradovatelnost, přírodní původ a netoxičnost (Paul W., 2000). Chitosan je kationtový polysacharid získaný částečnou deacetylací chitinu.

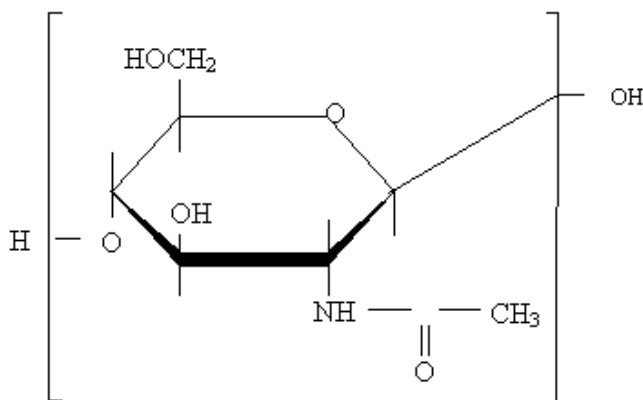
Na rozdíl od jiných polymerů je chitosan hydrofilní polymer s kladným nábojem, který z technického hlediska má zvláštní strukturu (Dang J. M. and Leong K.W. 2006, Janes K. et al, 2001). Způsob přípravy nanovlákn z chitosanu se vyznačuje tím, že vytvořená nanovlákná

jsou síťována elektrostatickými interakcemi mezi pozitivně nabitými řetězci chitosanu a polyanionty použitými jako síťující činidlo, jako je například tripolyfosfát (TRP). Tripolyfosfát (TPP) je populární, protože je netoxický, má schopnost rychle gelovat a interagovat s elektrostatickým kationtovým chitosanem. V poslední době je značný zájem o chitosan kvůli jednoduchosti jeho výrobního procesu. Chitosanová nanovlákná jsou ve farmaceutickém průmyslu široce používána jako slibné nosiče pro dodávku léků s řízeným uvolňováním (Calvo P. et al., 1997, Yang H. et al., 2009, Janes K. a kol., 2001, Gan Q., Et al., 2007). Modifikace chitosanových nanovláken je tedy důležitou vlastností pro zlepšení účinnosti regenerace měkkých tkání.

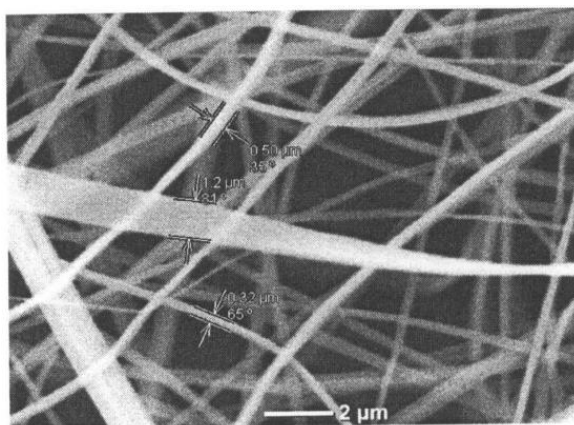
1. Chitosanová nanovláknna pro regeneraci

1.1 Chitosan

Chitosan je polysacharid, který je získán enzymatickou N-deacetylací chitinu, má polykationtovou unikátní fibrilární strukturu (Obrázek č. 1,2), která mu dává afinitu pro adhezi k materiálům buněčných stěn všech živých organismů na Zemi. Chitosan vytváří stabilní sloučeniny s proteiny, s aniontovými polysacharidy a také je účinný pro imobilizaci živých buněk v biotechnologiích (zejména při vytváření matricových mikrosfér, na jejichž základě jsou získány umělé trojrozměrné struktury různých typů orgánů v technologii nosičů pro regeneraci v tkáňovém inženýrství).



Obrázek č. 1. Chemická struktura chitinu (Převzato z Abdel-Mohsen A et al. 2016).



Obrázek č. 2 Morfologie chitinových nanovláken (Převzato z Abdel-Mohsen A et al. 2016).

Chitosan je bakteriostatický, urychluje regeneraci, má hemostatické účinky (Dash M. et al., 2011). Intenzita těchto vlastností a tím i účinnost výrobků na bázi chitosanu je dána

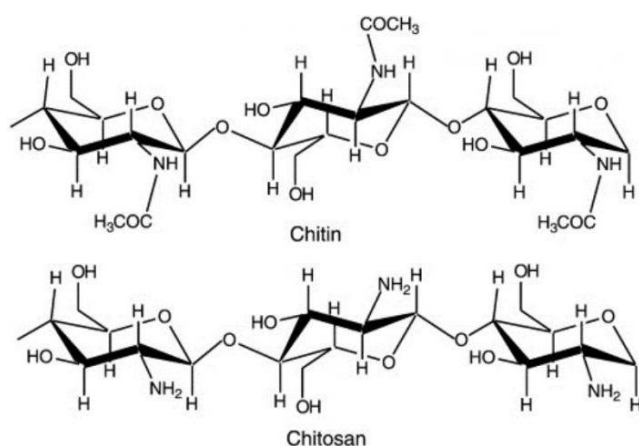
strukturálními vlastnostmi polymerního materiálu (Obr. 3) Chitosan je biokompatibilní a biologicky odbouratelný polysacharidový polymer (Mi F.-L. et al., 2001, Campbell T., 2012, Johnson R. a kol., 2012). Produkty biodegradace chitosanu jsou netoxické a jsou zahrnuty do přirozených metabolických reakcí organismu.

1.2. Zdroje chitinu

Hlavním zdrojem chitinu jsou:

1. Exoskeleta většiny tříd bezobratlých (členovců, měkkýšů, coelenterates, kroužkoců) - suroviny živočišného původu.
2. Houby (Ascomycetes, Engomitsety, Basidiomycetes, Deuteromycetes) a řasy (rozsivky) – z rostlinných surovin.

Komerční chitosan může být proto rostlinného a živočišného původu (dále v textu rostlinný a živočišný chitosan). Chitosan živočišného původu se obvykle získává z měkkýšů.



Obrázek č. 3 Chemická struktura chitosanu. (Převzato z Paul W. and Sharma C. P., 2000).

Chitin a chitosan stejně jako i jiné přírodní polymery a jejich deriváty jsou charakterizovány absencí stálých makromolekulárních charakteristik (délka řetězce, obsah acetamidových skupin a jejich distribuce v řetězci, přítomnost nečistot). To je způsobeno tím, že biosyntéza chitinu se provádí za přirozených podmínek charakterizovaných tím, že se mění parametry okolního prostředí (teplota, složení kultivačního média atd.), což vede k výrobě produktů, které nejsou reprodukovatelné. Chitosan se připravuje ze živočišné suroviny vytvořené in vivo, což má své nevýhody uvedené výše.

Výhody rostlinných surovin jsou důsledkem rozsáhlé biotechnologické produkce pěstování hub v umělých podmínkách. Je charakterizována vysokou produktivitou, přesným ovládním provozních podmínek (teplota, vlhkost, denní světlo, složení živin atd.).

To zajišťuje reprodukovatelnost růstových podmínek pro výrobce a tím i syntézu polymerů a následně i kvalitu chitinu a chitosanu.

Chitosan z hub představuje chitosan-glukanový komplex, ve kterém k hlavnímu chitosanovému řetězci je glykosidovou vazbou připojena sacharidová skupina, chitosan tedy získává rozvětvení. Obsah chitosanu v chitosano-glukanovém komplexu je od 50 % do 98 %, a to v závislosti na zdroji oddělení biopolymeru. Supramolekulární struktury rostlinného chitosanu na rozdíl od živočišného jsou amorfifní.

2. Možnosti funkcionalizace chitosanových nanovláken

Látky mohou být buď adherovány přímo na nanovláknový povrch, kdy dochází k jejich uvolnění prostou difuzí s ohledem na jejich vzájemnou interakci a sílu vazby, či mohou být začleněny přímo dovnitř nanovláknů, kdy je uvolnění pomalejší a dochází k závislosti na rheologických vlastnostech polymerní matrice, povaze aktivní látky a degradabilitě systému. V závislosti na použitém polymeru a metodě funkcionalizace lze vytvořit systémy s rychlým, okamžitým, opožděným či upraveným uvolňováním léku do místa působení (Agarwal, S., et al, 2008) Pro vytvoření systémů pro řízené dodávání léčiv s využitím nanovláken lze aplikovat různé metody, jako jsou fyzikální adsorpce na nanovláknů, směsné elektrostatické zvlákňování, emulzní elektrostatické zvlákňování a koaxiální elektrostatické zvlákňování. Metody funkcionalizace nanovláken: a) směsné zvlákňování, b) emulzní zvlákňování, c) koaxiální zvlákňování, d) povrchová adheze (Ji, W., et al., 2011).

2.1. Chemické modifikace nanovláken

Mezi základní chemické modifikace patří:

- **směsná nanovláknů.**
- **povrchová modifikace.**

Směsná nanovláknů

Zvýšení funkčních vlastností chitosanu pomocí směsi polymerů se provádí za účelem stabilizace procesu elektrostatického zvlákňování a také pro zlepšení hojení ran. To je

způsobeno tím, že při odstranění bandáže z povrchu rány se oddělí nerozpustná vrstva polymerů, přičemž chitin-chitosanová vrstva zůstává a přispívá k procesu epitelizace.

Chitosanová polymerní nanovlákná se získávají elektrostatickým zvlákňováním. Tato metoda umožňuje získávat vlákna o průměru 50 až 4500 nm z roztoku polymerů. Taková nanovlákná jsou charakterizována nízkou hustotou, vysokou porézností, propustností pro vodu a plyn, velikostí pórů v rozmezí od desítek do stovek mikrometrů. (Baumgartner P., 1971, Dobrovolskaya I. et al., et al., 2015, Schiffman J. and Schauer C. L. 2008).

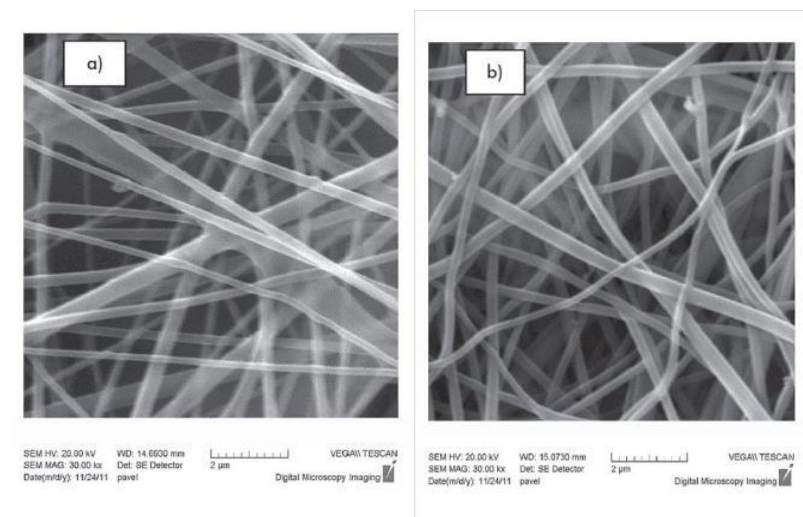
Nicméně je známo, že proces elektrostatického zvlákňování nanovláken z roztoku chitosanu je obtížný z důvodu jeho polyelektrolytických vlastností. Pro stabilizaci procesu formace nanovláken na bázi chitosanu je roztok modifikován vodou rozpustnými polymery, jako jsou polyvinylalkohol (PVA), metylcelulóza (MZ), polyvinylpyrrolidon (PVP), polyetylenoxid (PEO) (Spasova M. et al., 2004, Li L. Hsieh Y.-L. et al., 2007).

V práci (Yudin V. et al., 2014, Dobrovolskaya I. a kol., 2015) bylo prokázáno, že chitosanová kompozitní vlákna obsahující chitinová nanovlákná o průměru 20 nm a délce 600 až 800 nm jsou charakterizována zvýšenou pevností a pružností. Navíc zavedení chitinových nanovláken do zvlákňovacího roztoku chitosanu stabilizuje formovací proces. Tento způsob funkcionalizace nanovláken vedl tedy k získání dvouvrstvého povlaku na ráně, který se skládal z vnější vrstvy nanovláken na bázi ve vodě rozpustného kopolyamidu a vnitřní vrstvy kompozitních nanovláken na bázi chitosanu a nanovláken z chitinu. Nanovlákná z neresorbovatelného kopolamidu poskytují potřebné mechanické vlastnosti povlaku stejně jako metabolické procesy s vnějším prostředím. Vrstva nanovláken z chitosanu a nanovláken z chitinu, která přímo přichází do kontaktu s povrchem rány, současně zajišťuje hemostatický a baktericidní účinek, atraumatické krytí a při integraci s aktivním biologickým médiem dochází k postupné resorpci polymeru. Při odstranění obvazu z povrchu rány se oddělí nerozpustná vrstva kopolamidu, zatímco vrstva chitin-chitosan zůstává a podporuje proces epitelizace (Li L., Hsieh Y.-L., 2006).

Povrchová modifikace

Aktivací volných radikálů na povrchu polymeru nastává fyzikálním účinkem chemicky inertního plazmatu následně po vystavení chemicky reaktivní plynné atmosféře funkcionalizace, tj. vytváření chemicky odlišných povrchových skupin účinkem chemicky aktivního plazmatu (hydrofilizace nebo hydrofobizace povrchu polymeru). V experimentech

modifikace nanovláknenných vrstev byly použity vzorky připravené z nanovláknenných vrstev PVA. K určení povrchových vlastností nanovláknenných vzorků PVA modifikovaných v plazmatu byl použit přístroj Advex Instruments. Modifikace nanovláknenných vrstev PVA plazmatem významným způsobem ovlivňuje jejich smáčivost. Nemodifikované vzorky jsou silně hydrofilní (kontaktní úhel 22°). Vzorky modifikované plazmatem byly charakterizovány hydrofobními vlastnostmi (kontaktní úhel 119°). Vzhled povrchu nanovláknenných vrstev PVA byl hodnocen pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Výsledky provedených studií ukázaly, že modifikace polymerní nanovláknenné vrstvy nesíťovaného PVA v metanovém plazmatu při zvolených podmínkách procesu neovlivňuje významným způsobem strukturu jejich povrchu. Analýza SEM neukázala rozdíly v morfologii povrchu nanovláken modifikovaných a nemodifikovaných (Obrázek č. 4).



Obrázek č. 4 SEM snímky nanovláknenných vrstev PVA: před modifikací plazmatem (a) a po modifikaci plazmatem (b) (Převzato z Denes, F. S. and S. Manolache, 2004).

Plazmová povrchová úprava nanovláknenných polymerních struktur přináší významné změny užitných vlastností povrchů. Současně nedochází k degradaci jemné nanovláknenné struktury. Tato technologie umožňuje průmyslové nasazení všude tam, kde je třeba funkcionalizovat povrch polymerních materiálů (Denes, F. S. and S. Manolache, 2004).

Pokrytí proteiny

Hlavním omezením metody pro řízené dodávání proteinů zůstává snížení jejich aktivity. Biokompatibilní polymery, například polykaprolakton (PCL), kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA) a polyuretan (PU) apod., podporující adhezi buněk, jsou

většinou hydrofobní a dobře rozpustné v organických rozpouštědlech (Sill T. J., von Recum H. A., 2008). Jedná se tedy o prostředí odlišné od vodného, díky čemuž dochází ke změnám především sekundární a terciální struktury proteinů. V důsledku interakce bioaktivní látky s rozpouštědlem při použití organických rozpouštědel a proteinu – jako bioaktivní látky dochází obvykle k jeho denaturaci a následnému snížení aktivity látky. Na druhou stranu polymery zvlákněné z vodného rozpouštědla umožňují zachování bílkovin v nativním stavu. Nicméně tyto hydrofilní polymery příliš nepodporují buněčnou adhezi a proliferaci a mají omezenou stabilitu ve fyziologických tekutinách.

Proto se nanovláknna pokrývají proteiny (např. kolagen, fibronectin, želatina) až po zvláknění. Modifikovaná nanovláknna podporují buněčnou adhezi a prliferaci. Otázkou zůstává stabilita vrstvy na povrchu nanovláken (Haifeng L., et al., 2013).

2.2. Fyzikální modifikace

Sítování

Pro zlepšení fyzikálních vlastností – odolnosti vůči vodě i zvýšení pevnosti – se používají síťovací činidla: glutaraldehyd, glyoxal, genipin, fotosenzitivní látky nebo tepelně ošetření (Chen J. a kol, 2008, Ohkawa K. a další, 2007). Obsah chitosanu obvykle v roztoku kolísá od 1,5 do 3,5 % v závislosti na molekulové hmotnosti a snížení molekulové hmotnosti polymeru na 30 kDa umožňuje zvýšit koncentraci roztoku chitosanu na 7 %. Nicméně použití chitosanu s nízkou molekulovou hmotností neumožňuje získání nerozpustných materiálů.

Plazmatické úpravy

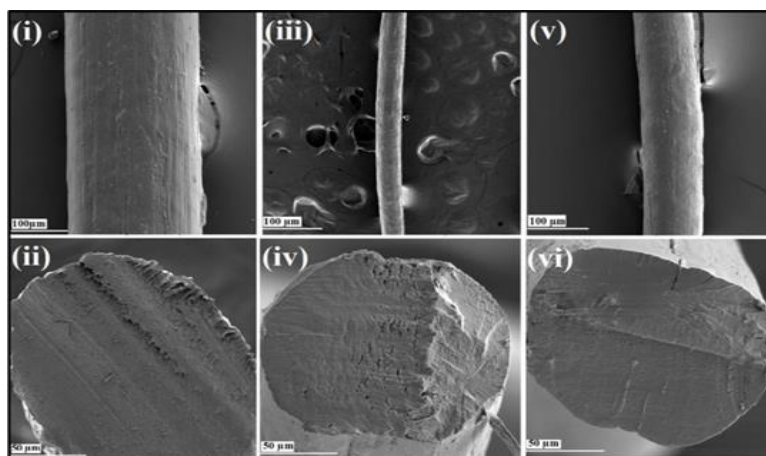
Plazmou modifikovaný chitosan a poly (3,4-etylendioxytiefen) byly smíchány, aby se získala vodivá nanovláknna s polyvinylalkoholem jako nosným polymerem v různých objemových poměrech. Chemické složení a molekulární interakce mezi složkami nanovláknenných směsí byly stanoveny za použití Fourierovy transformační infračervené spektroskopie (FTIR). Vodivé směsi obsahující chitosan modifikovaný plazmou vedly k lepší antibakteriální aktivitě a k tvorbě tenčích vláken než ty, které obsahovaly chitosan bez modifikace plazmy. Získané průměry nanovláken plazmo-modifikovaného chitosanu byly v rozmezí 170 až 200 nm a hodnoty získané z nemodifikovaného chitosanu byly v rozmezí 190 až 246 nm. Elektrické a elektrochemické vlastnosti nanovláken byly rovněž zkoumány čtyřbodovou vodivostí sondy a měřením cyklické voltametrie (Kiristi M., et al., 2013).

3. Chitin-glukanový komplex s antibakteriální aktivitou nanovláken během hojení ran.

Existuje hodně výzkumů, které prokazují, že chitosan urychluje hojení ran v mnoha klinických případech. Bylo zjištěno, že granule chitosanu mohou zvýšit regeneraci normální pokožky u otevřených ran. Proto může být chitosan použit k inhibici fibroplazie (tvorbě fibrinového vaziva) během hojení ran a k podpoře růstu tkáně a diferenciaci v tkáňové kultuře (Kumar, 2000). Ve většině výzkumů se chitosan používá jako surovina pro umělá vlákna, příze, prášky, granule, houby a kompozity s bavlnou nebo polyesterem. Léčivý přípravek vyrobený z chitosanu se používá jako vstřebatelné šití a materiály pro ošetření ran.

Chitosan, který má strukturální charakteristiky podobné glykosaminoglykanům, může být použit k vývoji takového substrátu pro náhradu kůže (Kumar, 2000, Kweon et al., 2003). Byl vyvinut chitosan-glukanový obvaz s antibakteriální aktivitou pro hojení ran (Abdel-Mohsen A. et al., 2016).

Chitin / Chitosan-glukanový komplex (ChCsGC) byl izolován z kultury *Schizophyllum* (*S. commune*) a nejdříve byl rozpuštěn v předchlazeném roztoku (15 ° C) 8% močoviny / 6% vodném roztoku NaOH. Bylo provedeno hodnocení mechanické pevnosti tkání a morfologie povrchu. Izolovaná a netkaná vlákna byla charakterizována pomocí FTIR-ATR, optického mikroskopu, TGA, DSC, H / C NMR, SEM a XRD (Obrázek č. 5) (Abdel-Mohsen A et al. 2016).



Obrázek č. 5 Morfologie různých typů chitin-glukanových nanovláken (Převzato z Abdel-Mohsen A et al. 2016).

V souladu s fyzikálně-chemickými vlastnostmi měření lze předpokládat, že síť a nové vrstvy mají stejnou chemickou strukturu s malými změnami tepelné stability pro obvazy. Biologická aktivita netkané textilie ChCsGC byla testována na různých typech bakterií a vykazovala vynikající antibakteriální aktivitu. Biokompatibilita netkaných materiálů byla hodnocena s použitím různých koncentrací fibroblastové myší buněčné linie. ChCsGC nevykazovala cytotoxicitu na myší fibroblasty. Novinka ChCsGC prokázala vynikající účinnost v léčbě rány při testování pomocí modelu u potkanů.

Je popsáno použití chitosan – glukosanového komplexu jako přípravku pro hojení ran a prevenci adheze bandáže na ráně. V práci (*Méndez-Vilas A., 2011*) je ukázáno, že chitosan z hub ve formě gelu prokázal za jinak nezměněných okolností významně menší minimální inhibiční koncentraci mikroorganismů (*Streptococcus mutans*) než chitosan ze skořápky korýšů.

K dnešnímu dni bylo zveřejněno značné množství studií o výrobě nanovláken z chitosanu korýšů a jejich použití v medicíně k urychlení léčby ran jako hemostatického činidla a buněčného nosiče. Hlavní metodou pro získání chitosanových nanovláken je elektrostatické zvlákňování s použitím různých instrumentálních variant této metody: jehlové a bezjehlové zvlákňování, použití různých typů elektrod (patenty US 20100216211).

4. Modifikace chitosanu pomocí trombocytů a jiných produktů krevní separace.

Rekonstrukce hlubších ran, v nichž jsou kůže a měkké tkáně poškozené, vyžaduje opatření k prostorové rekonstrukci a stimulaci regeneračních procesů v objemu defektu.

V tomto případě je vhodné použití produkty tkáňového inženýrství sestávající z polymerní matrice, buněčných komponent a produktů sekrece buněk (Zhang et al., 2007, Cha et al., 2006, López-Leó a kol., 2005).

Autoři této práce navrhli spojit použití experimentálního krytu rány s produkty získanými centrifugací krve pacienta, aby se zvýšila účinnost regenerace tkáně a dosáhlo se většího hemostatického, antimikrobiálního a analgetického účinku.

Plazma bohatá na krevní destičky (PRP) a ostatní krevní produkty jsou separovány v humánní a veterinární medicíně na více než 20 let. Četné studie prokázaly jejich

terapeutický účinek na základě využití biologické aktivity růstových faktorů obsažených v krevních destičkách.

Je známo, že krevní destičky obsahují specifické i nespecifické růstové faktory, které iniciují mitogenezi a regeneraci pojivové tkáně. Nejdůležitější z nich je od destiček odvozený růstový faktor (PDGF), transformující růstový faktor (TGF- β), vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), epiteliální růstový faktor (EGF), fibroblastový růstový faktor (FGF), inzulinu podobný růstový faktor (IGF) (Gan Q. et al., 2007).

PRP a plazmové gelové deriváty – destičkový gel – je široce používán při hojení kostí a měkkých tkání v regenerační a rekonstrukční chirurgii, ve stomatologii, traumatologii a ortopedii (Everts et al, 2006).

V poslední době byla porézní nanovláknina použita jako šablony pro mobilní technologie. Chemické složení a porézní struktura modifikovaných nanovláken podporuje adhezi krevních buněk, kmenových buněk nebo somatických buněk na jejich povrchu. To zajišťuje metabolické procesy nezbytné pro efektivní proliferaci, pohyb a diferenciaci buněk (Dobrovolskaya I. et al., 2015).

5. Dodávání léčiv nanovlákniny

Schopnost směsných nanovláken na bázi polyvinylalkoholu (PVA) a fibroinu zachovávat enzymatickou aktivitu byla prokázána začleněním proteinů, jako jsou lipáza a kasein a křenová peroxidáza (HRP) (Patel, A.C., et al., 2006), do různých nanovláken připravených z rychle rozložitelných polymerů rozpuštěných v polárních rozpouštědlech. Metoda směsného elektrostatického zvláknování se používá pro dodání malých bioaktivních molekul s vysokou efektivitou a může být úspěšně použita i pro dodání proteinů, kdy je ale nutno použít specifické polymery. Mezi polymery zvláknitelné z vodných roztoků patří hedvábní či fibroin podporující adhezi a proliferaci buněk. Nanovláknenné nosiče založené na fibroinu připraveném směsným elektrostatickým zvláknováním byly využity pro dodání bone morphogenic proteinu-2 (BMP-2). Studie prokázala zachování bioaktivity BMP-2, lepší proliferaci mezenchymálních kmenových buněk (MSC) a jejich osteogenní diferenciaci in vitro (Li, C., et al., 2006).

Pro zvýšení účinnosti a urychlení regenerace měkkých tkání je vhodné dodat nanovláknům další funkce. Za tímto účelem jsou funkcionalizována s bioaktivními látkami

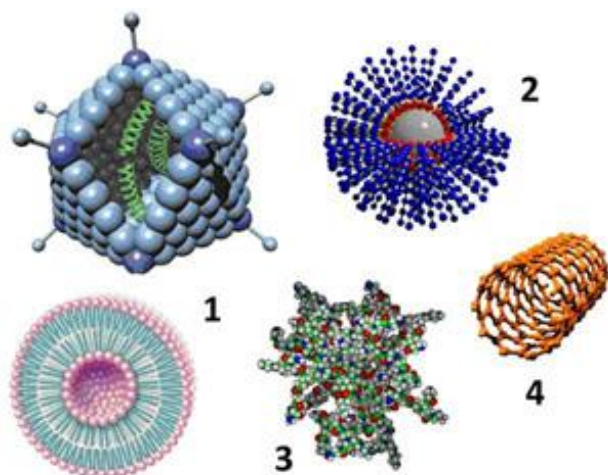
různých typů: antimikrobiální, analgetické, růstové faktory atd., stejně jako funkční polymery.

Uvolňování léčiv může být způsobeno fyzickými nebo chemickými podněty, jako jsou pH, iontová síla, teplota a magnetické a biologické molekuly. Takže stimulačně citlivé nanočástice mohou být slibným nosným systémem, protože mohou selektivně reagovat na změny prostředí *in vitro* nebo *in vivo* (Zhang J., 2007). Chitosan vykazuje pH-citlivé chování kvůli velkému počtu aminoskupin na jeho řetězcích (Cha J., 2006).

Kvůli citlivosti na pH mohou chitosanové nanočástice zavedené jako chitosanové nanogely podstoupit fázové přechody od bobtnání ke smršťování nebo naopak. Tato vlastnost je mimořádně důležitá z hlediska použitelnosti, neboť schopnost přenášet a uvolňovat částice se výrazně liší od nabobtnalého až do přehnutého stavu, což činí z nanočástic chitosanu slibný nosič pro dodávání makromolekul (López-León T., et al., 2005).

Modifikace chitosanu jako nanonosiče pro cílené podávání léků je také slibná. Byla zkoumána možnost uzavření protinádorových látek, například 5-fluorouracilu v chitosanových nanočásticích pro pH stimulovaného uvolňování (Seda R., et al., 2012).

Jako systém dodávání léku se často používají uhlíkové nanočástice – fullereny a nanotrubičky (Obrázek č. 6). Hlavním rysem fullerenů je jejich rámová forma, která se může stát základem nejen pro distribuční systémy, ale také pro novou třídu léčiv (Maruyama K. et al., 2000).



Obrázek č. 6. Nanočástice používané k transportu terapeutických molekul.

1 – lipozom a adenovirus; 2 – polymerní nanostruktura; 3 – dendrimer; 4 – uhlíkové nanotrubičky. (Převzato z Maruyama K. et al., 2000).

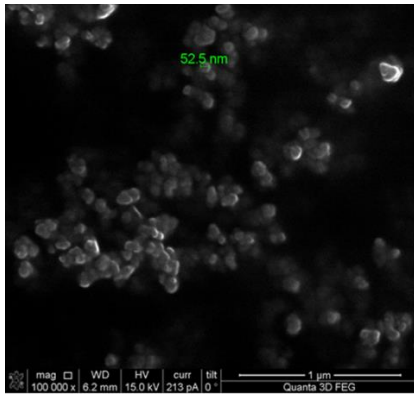
Lipozomy jsou vezikuly tvořené dvouvrstvou fosfolipidu a vnitřním odděleným kompartmentem. Širší použití lipozomů v regenerativní medicíně je omezeno jejich krátkým poločasem a neefektivním udržením v místě aplikace. Tyto nevýhody mohou být významně sníženy díky jejich kombinaci s nanovláknem. Disperze liposomů s nanovláknem byla provedena ve studiích (Mickova et al., 2012).

Byly vyrobeny dva různé systémy nanovláken s lipozomy, tj. lipozomy smíchané s nanovláknem a nanovláknem s jádrem / obalem s inzertovanými lipozomy. Bylo prokázáno, že elektrostatické zvlákňování směsi nezachovává nedotčené lipozomy, ale naopak koaxiální elektrostatické umožňuje jejich efektivní začlenění do nanovláken. Jako příklad je uvedena zachovaná enzymatická aktivita enkapsulované křenové peroxidázy.

Potenciál tohoto systému byl také prokázán zvýšenou proliferací mezenchymálních kmenových buněk. Koaxiální zvlákňování lipozomů je velmi slibné jako systém pro podávání léčiv.

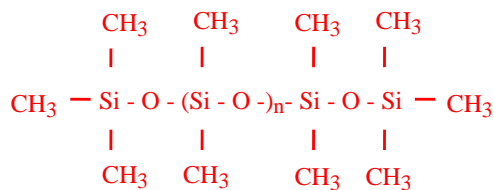
Nicméně lipozomy mají i své nevýhody, z nichž hlavní je nestabilita. Nepříznivé vlivy okolního prostředí mohou zlomit pouzdro lipozomu a látka se nedostane na místo určení (Mozafári M, et al., 2005). Stejně jako všechny fosfolipidy a tuky také lipozomy oxidují, velikost lipozomálních kapslí zhoršuje jejich průchodnost. Proto byly v posledních letech jako alternativy vyvinuty niosomy – analog silikonové povahy, které mají řadu výhod.

Niosomy – jsou nanovezikuly o velikosti 30–80 nanometrů (*Obrázek č. 7*), které mají ve vodě nerozpustný plášť tvořený dvouvrstvou neiontového emulgátoru (povrchově aktivní látky), skupiny látek sestávající z kopolyolů dimetikonu, eteru polyetylen glykolu na bázi polydimetylsiloxanu a uvnitř jsou uzavřena léčiva. Transdermální transport účinných látek je možný v důsledku schopnosti neiontové povrchově aktivní látky (povrchově aktivních látek) vytvořit dvojistou molekulární vrstvu podobnou plazmatické membráně živých buněk (Marianecci C. et. al., 2016).



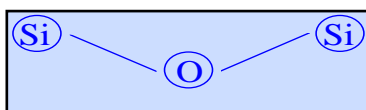
Obrázek č. 7 Elektronová mikroskopie niosomu (Převzato z Abdelkader H. et al. 2014).

Přítomnost kovalentní vazby Si-O-Si v hydrofobní části molekuly polydimetylsiloxanové bázi emulgátoru, který má vysokou pružnost a reaktivitu, umožňuje cíleně dodávat široký rozsah účinných látek pomocí reaktivních míst a jejich cílené uvolňování nanovezikuly. Dimetikonové kopolyoly jsou tudíž hybridy křemíku (dimetikonu) a uhlíku (polyetylen glykolu). CH₃ – (metyl) skupina tvoří „oblak“ kolem atomů křemíku a poskytuje reaktivní místa pro reakci s biologicky aktivní látkou (Obrázek č. 8) (Carafa, M. et al, 2011).



Obrázek č. 8 Molekula PEG-12 Dimethicon (Převzato z Carafa, M. et al, 2011).

Délka vazby Si-O je delší než vazba C-C, proto je molekula Dimethicone PEG-12 elastičtější než fosfolipidy používané při tvorbě vezikul (liposomů) a je schopna vytvářet vezikuly bez významných energetických sil. Délka vazby Si-O je 1,6 Å (délka vazby analogů SAW je C-1,4 Å), úhel vazby Si-O-Si je 130 stupňů, na rozdíl od vazby s úhlem 109 stupňů C-C-C, což vede ke zvýšení elasticity a stability (Obrázek č. 9).



Obrázek č. 9 Připojení molekul křemíku a kyslíku v niozomu (Převzato z Moghassemi S. et al., 2014).

Vazba Si-O-Si se otáčí, a proto má rovněž velkou elasticitu. Přítomnost PEG (část polyetylenglykolu) určuje stabilitu v hydrofilních médiích a ochranu proti napadení buňkami retikuloendoteliálního systému (RES) (Obrázek č. 10). To zvyšuje stabilitu podávaných látek v organismu a tím je umožněno snížení dávky léčiv.

Dvojitá molekulární vrstva



Obrázek č. 10 Tvorba organosilikonových niozomů z PEG-12 Dimethicone (Převzato z *Marianecci C. et. al., 2016*).

Výsledky uvedené v této studii ukazují potenciál tohoto systému pro podávání léků pomocí niozomů a nanovláken pro regenerační medicínu.

6. Závěr

Ve své práci jsem shrnul výsledky experimentů s nanovlákný s obsahem chitosanu vyvinutých nebo testovaných pro regeneraci měkkých tkání. Použitá chitosanová nanovlákná zahrnovala různé použité směsi látek při zvláknování roztoků, dále chemické, fyzikální i biologické modifikace nanovláken.

Porézní nanovláknenné materiály založené na chitosanu nebo komplexu chitin-glukan představují nejslibnější nanovlákná pro regeneraci měkkých tkání. Chitosan vykazuje pH citlivé chování kvůli velkému počtu aminoskupin v řetězcích, což činí chitosanové nanovlákná vhodnými nosiči pro dodávání makromolekul.

Pro zvýšení účinnosti a urychlení regenerace měkkých tkání jsou nanovlákná funkcionalizována bioaktivními látkami různých typů: antimikrobiálními látkami, analgetiky, růstovými faktory, funkčními polymery atd. Kompozitní krytí ran z chitosanových nanovláken má všechny potřebné vlastnosti: biokompatibilitu, snadnost použití, antimikrobiální vlastnosti a podporu regenerace tkání.

Na rekonstrukce hlubší rány se používají nosiče s obsahem krevních destiček, buněčných komponent a produktů sekrece buněk.

Účinnost ošetřování ran se zvyšuje při současném použití autologních produktů separace krve – destičkového gelu a plazmy bohaté na krevní destičky. Dostupnost, bezpečnost a účinnost kombinovaného použití kompozitních nanovláknenných obvazů na rány a autologních produktů separace krve určují, zda je možné pomocí technologie stimulovat regeneraci a zabránit změnám v tkáni a infekčním komplikacím.

Nová strategie funkcionalizace nanovláken ukazuje perspektivnost systému podání léků pomocí nanovezikul (lipozomů a nozomů) v kombinaci s nanovlákný pro regenerační medicínu.

7. Seznam použité literatury

1. Abdelkader, H.; Alani, A. W.; Alany, R. G. (2014). Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications and limitations. *Drug Delivery*, 21, 87–100.
2. Abdel-Mohsen A, Jancar J, Massoud D, Fohlerova Z, Elhadidy H, Spatz Z, Hebeish A (2016). Novel chitin/chitosan-glucan wound dressing: Isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties// *Int J Pharm* 20, 86-99.
3. Agarwal, S., J. H. Wendorff, and A. Greiner (2008). Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 49(26): 5603-5621.
4. Baumgartner P.K. (1971). Electrostatic spinning of acrylic microfibers // *J. Coll. Inter. Sci.* 36.(4), 71–79.
5. Brannon-Peppas L. and Blanchette J. O., (2004). “Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy,” *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 1649–1659.
6. Carafa, M.; Marianecchi, C.; Di Marzio, L.; Rinaldi, F.; Di Meo, C.; Matricardi, P.; Alhaique, F.; Coviello, T. A (2011). New Vesicle-Loaded Hydrogel System Suitable for Topical Applications: Preparation and Characterization. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 14, 336–346.
7. Calvo. P., C. Remuñan-Lopez, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, (1997). “Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines,” *Pharmaceutical Research*, 14, 1431–1436,
8. Campbell T.D., Wiesmann W.P., McCarthy S.J. (2012). Method for preparing a compressed wound dressing. United States Patent 8313474.
9. Cha J., Lee W. B., Park C. R., Cho Y. W., Ahn C. H., and Kwon I. C., (2006). “Preparation and characterization of cisplatin-incorporated chitosan hydrogels, microparticles, and nanoparticles,” *Macromolecular Research* 14, 573–578.
10. Chen J. (2008). Preparation of biocompatible membranes by electrospinning / Cheix — et al. // *Desalination* 233, 48-54.
11. Dang J.M. and Leong K.W. (2006). “Natural polymers for gene delivery and tissue engineering,” *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 487–499.
12. Dash M., Chiellini F. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications // *Progress in Polymer Science* 36, 981-1014.

13. Denes, F.S. and S. Manolache (2004). Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science. *Progress in Polymer Science* 29(8), 815-885.
14. Devalapally H, Chakilam A., and Amiji M.M., (2007). "Role of nanotechnology in pharmaceutical product development," *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96, 2547–2565.
15. Dobrovolskaya I.P., Popryadukhin P.V., Yudin V.E., Ivan'kova E.M., Elokhovskiy V.Yu., Weishauptova Z., Balik K. (2015). Structure and properties of porous films based on aliphatic copolyamide developed for cellular technologies // *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 26, 46–56.
16. Everts P.A., Knape J.T., Weibrich G., Schönberger J.P., Hoffmann J., Overdeest E.P., Box H.A., van Zundert A.J. (2006). Platelet-rich plasma and platelet gel: a review// *Extra Corpor Technol* 38, 174–187.
17. Feng, S. S. (2004). "Nanoparticles of biodegradable polymers for new concept chemotherapy," *Expert Review of Medical Devices* 1, 115–125.
18. Fréchette J.-P., Martineau I., Gagnon G. (2005). Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing // *J. Dent. Res.* 84, 434–439.
19. Gan Q., Wang T., (2007). "Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release," *Colloids and Surfaces B* 59, 24–34.
20. Haifeng L., Xili Ding, Gang Zhou, Ping Li, Xing Wei, Yubo Fan (2013). Electrospinning of Nanofibers for Tissue Engineering Applications// *Journal of Nanomaterials*.
21. Janes K. A, Fresneau M. P, Marazuela A., Fabra A, and Alonso M. J. (2001). "Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin," *Journal of Controlled Release* 73, 255–267.
22. Janes K. A., Calvo P., and Alonso M. J., (2001). "Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules," *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, 83–97.
23. Johnson R., Tumej D. Biocompatible wound dressing. BS Patent 0095421. 2012. Mi F.-L., Shyu Sh.-Sh., Wu Yu-B., Lee S.-T., Shyong J.-Y., Huang R.-N. (2001). Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing // *Biomaterials* 22, 165–173.
24. Ji, W., et al., (2011). Bioactive Electrospun Scaffolds Delivering Growth Factors and Genes for Tissue Engineering Applications. *Pharmaceutical Research* 28, 1259-1272.

25. Kiristi M, Oksuz AU, Oksuz L, Ulusoy S. (2013). Electrospun chitosan/PEDOT nanofibers Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. Oct. 33(7), 3845-50.
26. Li, C., et al., (2006). Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 27(16), 3115-3124.
27. Li L., Hsieh Y.-L. Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers // Carbohydrate Research 341(3), 374-81
28. López-León T., Carvalho E. L. S., Seijo B., Ortega-Vinuesa J. L., and Bastos-González D., (2005). "Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior," Journal of Colloid and Interface Science 283, 344–351.
29. Marianecchi C, Di Marzio L, Del Favero E, Cantù L, Brocca P, Rondelli V, Rinaldi F, Dini L, Serra A, Decuzzi P, Celia C, Paolino D, Fresta M, Carafa M. (2016). Niosomes as Drug Nanovectors: Multiscale pH-Dependent Structural Response//Langmuir 32(5), 1241-9.
30. Maruyama, K. (2000). In vivo targeting by liposomes./K.Maruyama// Biol Pharm Bull 23, 791–9.
31. Méndez-Vilas A. (2011) Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances// FORMATEX 542-550.
32. Moghassemi, S.; Hadjizadeh, A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. J. Controlled Release 185, 22–36.
33. Mozafari, M.R. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. /M.R. Mozafari, C.Johnson, S. Hatziantoniou, C. Demetzos//Journal of Liposome Research 18 309-327.
34. Mickova A, Buzgo M, Benada O, Rampichova M, Fisar Z, Filova E, Tesarova M, Lukas D, Amler E. (2012). Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. Biomacromolecules 13, 952-62.
35. Ohkawa K. Chitosan Nanofiber / Ohkawa K. et al. (2006). Biomacromoleci 7, 3291-3294.
36. Patel, A.C., et al., (2006) In situ encapsulation of horseradish peroxidase in electrospun porous silica fibers for potential biosensor applications. Nano Letters 6, 1042-6.
37. Paul W. and Sharma C. P., (2000). "Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review," S.T.P. Pharma Sciences 10, 5–22.
38. Polak J.M., Hench L.L, Kemp P. (2002). Future strategies for tissue and organ replacement // London. Imperial College Press 3–24.

39. Schiffman J.D., Schauer C.L. (2008). A review electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications // *Polymer Reviews* 48, 317–52.
40. Seda R. Tiğli A., Mehlika P. (2012). 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for pH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics// *Journal of Nanomaterials*, Volume 43-53.
41. Sill T.J., von Recum H.A. (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering // *Biomaterials* 29(13), 1989–06.
42. Spasova M., Manolova N., Paneva D., Rashkov I. (2004). Preparation of chitosan-containing nanofibers by electrospinning of chitosan/ poly(ethylene oxide) blend solutions // *e-Polymers* 56, 1–12.
43. Xie, J.B. and Y.L. Hsieh (2003). Ultra-high surface fibrous membranes from electrospinning of natural proteins: casein and lipase enzyme. *Journal of Materials Science* 38(10), 2125-2133.
44. Yang. H. C., Hon M. H, (2009). “The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery,” *Microchemical Journal* 92, 87–91.
45. Yudin V.E., Dobrovolskaya I.P., Neelovl. M., Dresvyanina E.N., Popryadukhin P.V., Ivan’kova E.M., Elokhovskii V.Yu., Kasatkin I.A., Okrugin B. M., Morganti P. (2014). Wet spinning of fibers made of chitosan and chitin nanofibrils // *Carbohydrate Polymers* 108, 176–182.
46. Zhang Y., Huang X., Duan B., Wu L., Li S., Yuan X. (2017). Preparation of electrospun chitosan/ poly(vinyl alcohol) membranes // *Colloid. Polym. Sci.* 5, 855–63.
47. Zhang J. L., Srivastava R. S., and Misra R. D. K., (2007). “Core-shell magnetite nanoparticles surface encapsulated with smart stimuli-responsive polymer: synthesis, characterization, and LCST of viable drug-targeting delivery system,” *Langmuir*, 23, 6342–6351.