

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Funkcionalizovaná nanovláknna na bázi chitosanu pro
zrychlenou regeneraci měkkých tkání**

**Functionalized chitosan-based nanofibres for accelerated
regeneration of soft tissues**

Philipp Bazikov

Školitel: Mgr. Eva Filová, Ph.D.

Praha 2018

Poděkování patří mé školitelce 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

Philipp Bazikov

Podpis

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Seznam zkratk.....	6
Úvod.....	7
Cíle práce	9
1 Chitosanová nanovlákná pro regeneraci tkání	10
1.1 Chitosan	10
1.2 Zdroje chitinu.....	11
1.3 Příprava chitosanu.....	12
1.3.1 Příprava chitosanu z chitinu	12
1.3.2 Získání chitosanu z houbové kultury.....	13
2 Možnosti funkcionalizace chitosanových nanovláken.....	14
2.1 Chemické modifikace nanovláken.....	14
2.1.1 Směsná nanovlákná	15
2.1.2 Koaxiální nanovlákná.....	16
2.1.3 Povrchová modifikace	16
2.2 Fyzikální modifikace.....	17
2.2.1 Síťování	17
2.2.2 Plazmatické úpravy	17
3 Chitin-glukanový komplex s antibakteriální aktivitou na nanovláken během hojení ran	19
4 Modifikace chitosanu pomocí trombocytů a jiných krevních produktů	21
5 Dodávání léčiv nanovlákná	22
6 Porovnání chitosanu s jinými látkami na hojení ran.....	26
6.1 Polyvinylalkohol (PVA)	26
6.2 Polylakton (PLA).....	26
6.3 Kyselina hyaluronová	27
6.4 Nanovláknenné nosiče ze sojových proteinů a celulózy napodobující mimobuněčnou hmotu kůže pro zlepšení hojení ran.....	28
7 Závěr	29
8 Seznam použité literatury	31

Abstrakt

Pro zlepšení regenerace měkkých tkání byly vyvinuty kryty ran 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 velice slibné pro regeneraci měkkých tkání. Vzhledem k vysokému počtu aminoskupin na řetězcích jsou vlastnosti chitosanu závislé na pH prostředí. To činí z chitosanových nanovláken slibné nosiče pro dodávání látek. V této práci jsou uvedeny příklady různých modifikací nanovláken. Pro zvýšení jejich účinnosti a urychlení regenerace měkkých tkání jsou nanovlákná funkcionalizována bioaktivními látkami různých typů: antimikrobiální, analgetické léčivé látky, růstové faktory atd. Pro stabilizaci nanovláken ve vodném prostředí (a současně zlepšení fyzikálních vlastností) se nanovlákná síťují pomocí glutaraldehydu, glyoxalu, genipinu nebo vyšší teplotou.

Chitosan se používá k inhibici tvorby fibrózní tkáně při hojení ran a k podpoře růstu a diferenciaci buněk. Byla prokázána antimikrobiální účinnost komplexu chitin-glukan s nanovláknou pro hojení ran. Rekonstrukce hlubších ran, v nichž jsou poškozené pokožka a měkké tkáně, vyžaduje prostorovou rekonstrukci a stimulaci regeneračních procesů v celém objemu defektu. V tomto případě je navíc vhodné použít krevní destičky, buněčné komponenty a produkty sekrece buněk. Novou slibnou strategií funkcionalizace nanovláken v regenerativní medicíně je systém dodávání léků, který používá nanovezikuly (lipozomy a niozomy) v kombinaci s nanovláknou.

V práci jsou pro porovnání zmíněny také jiné typy nanovláken kromě chitosanových, jako např. nosiče na bázi polyvinylalkoholu, polykaprolaktonu nebo kyseliny hyaluronové, které se testují v regeneraci měkkých tkání a mohou se také využívat k přípravě kompozitních anebo funkcionalizovaných nanovláken s chitosanem.

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

Abstract

To improve the regeneration of soft tissues, wound dressings were developed, containing nanofibers, different in composition and functional features. The work concentrates on chitosan and composite scaffolds containing chitosan. Porous nanofibre materials based on chitosan are very promising 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 nanofibres promising carriers for the delivery of drugs. In this work, the examples of different modifications of nanofibres are shown. To increase the efficiency and accelerate the regeneration of soft tissues, nanofibres are functionalized with bioactive substances of various types: antimicrobial, analgesic, growth factors, etc. To stabilize nanofibres and to improve the physical characteristics, treatments using glutaraldehyde, glyoxal, genipin or heat treatment were used.

Chitosan is used to inhibit fibroplasia during wound healing and to promote cell growth and differentiation. The efficiency of antibacterial activity of chitin-glucan complex with nanofibres 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 useful. As a new strategy for nanofibre functionalization, the drug delivery system using nanovesicles (liposomes and niosomes) in combination with nanofibres for regenerative medicine is promising.

In the work, nanofibres from different materials (besides chitosan) such as: polyvinyl alcohol, polycaprolactone or hyaluronic acid, which are tested for the regeneration of soft tissues, and could be used for the preparation of composites with chitosan or its functionalization, are mentioned.

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

Seznam zkratek

bFGF – basický fibroblastový růstový faktor

CA – acetát celulózy

ChCsGC – chitin / chitosan – glukán

ECM – mimobuněčná hmota

FTIR – Fourierova transformační infračervená spektroskopie

HA – hyaluronová kyselina

HRP – křenová peroxidáza

MC – metylcelulóza

PCL – polykaprolakton

PEG – polyetylglykol

PEO – polyetylenoxid

pH – acidobazická rovnováha

PLGA – kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové

PVA – polyvinylalkohol

PVP – polyvinylpyrrolidon

SPH – hydrolyzát sójové bílkoviny

Úvod

Poškození kůže a měkkých tkání vznikají při poranění, popálení nebo při chirurgických zákrocích. Stávající metody napomáhající hojení ran jsou málo účinné. Regeneraci zabraňuje zjizvení tkáně v důsledku tkáňové degenerace, oxidační poškození, nerovnováha vlhkosti v ráně během hojení a případná 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 tvořené nanovláknem s rozdílným složením a funkčními charakteristikami (Liu et al., 2013, Cai et al., 2010).

Optimální kryty ran by měly umožňovat prostup plynů a vlhkosti, které jsou nezbytné pro plnou integraci a buněčnou aktivitu. Kryt by dále měl kopírovat povrch rány, tj. materiál musí být flexibilní, manipulace s ním musí být snadná a dále musí umožňovat efektivní odvádění exsudátu. Další důležitou vlastností moderních krytů ran je, že jsou atraumatické – při jejich odstranění není poškozena vytvořená epitelální vrstva. Optimální kryty nejen zabraňují infekci, ale také umožňují podávání léčiv. Proto je vhodné nanovláknenné nosiče funkcionalizovat (Liang et al., 2007). Potenciální použití nanovláken jako nosičů léků bylo v posledních letech představeno jako důležitý úkol, protože nanočástice a nanovláknena byly vyvinuty s cílem vylepšit farmakologické i léčebné účinky léčiv spočívající ve snížení jejich toxických vedlejších účinků (Feng et al., 2014, Brannon-Peppas et al., 2004). Nanočástice v nanovláknenech sloužících jako nosič léku poskytují postupné 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 et al., 2007).

V poslední době chitosan přitahuje pozornost ve farmaceutické a biomedicínské oblasti díky svým příznivým biologickým vlastnostem, jako jsou například biologická degradovatelnost, přírodní původ a fakt, že není toxický (Pillai et al., 2009). Chitosan je kationtový polysacharid získaný částečnou deacetylací chitinu (Dang et al., 2006, Janes et al., 2001b). Způsob přípravy nanovláken z chitosanu se vyznačuje tím, že vytvořená nanovláknena jsou síťována chemicky nebo fyzikálně. Značný zájem o chitosan je také kvůli jednoduchosti jeho výrobního procesu. Chitosanová nanovláknena jsou ve farmaceutickém průmyslu široce používána jako slibné nosiče pro dodávání léčiv s řízeným uvolňováním (Calvo et al., 1997,

Yang a Hon., 2009, Janes et al., 2001a, Janes et al., 2001b, Gan et al., 2007). Porézní nanovláknenné nosiče na bázi chitosanu se tedy ukazují jako velice slibné pro regeneraci měkkých tkání. Pro porovnání budou zmíněny také jiná nanovláknna na bázi syntetických polymerů nebo nosiče na bázi polysacharidů, která se vyvíjejí pro regeneraci měkkých tkání a mohou být také použity v kombinaci s chitosanem.

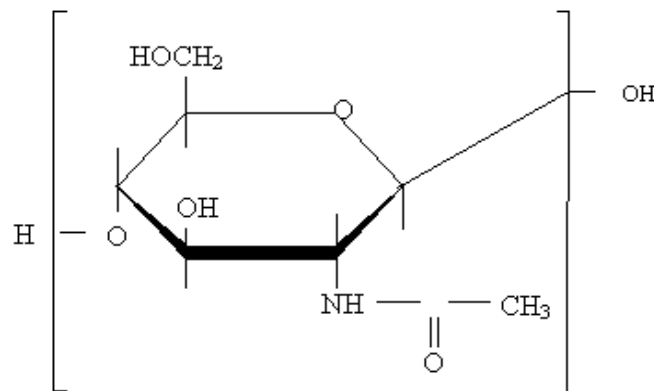
Cíle práce:

1. Studium metod používaných pro získání chitosanu z chitinu.
2. Posoudit možnosti funkcionalizace chitosanových nanovláken pro regeneraci tkání.
3. Určit perspektivu použití nanovláken chitosanu jako 'drug delivery' systémů pro regeneraci měkkých tkání.

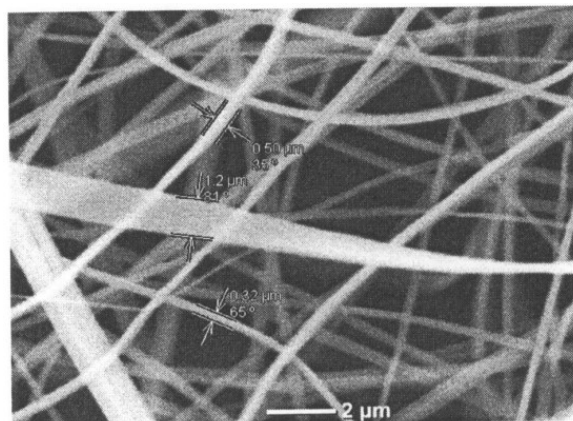
1 Chitosanová nanovláknna pro regeneraci tkání

1.1 Chitosan

Chitosan je polysacharid, který se získává enzymatickou N-deacetylací chitinu. Má unikátní polykationtovou fibrilární strukturu (Obr. č. 1 a 2), která mu dává afinitu 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 pro využití k regeneraci v tkáňovém inženýrství).



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



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

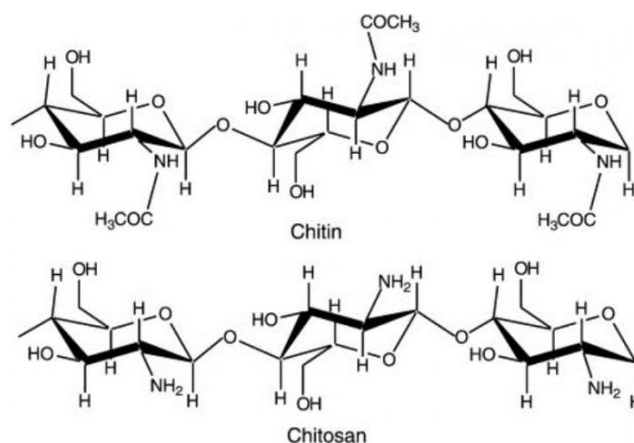
Chitosan je díky strukturálním vlastnostem (Obr. č. 3) bakteriostatický, urychluje regeneraci a má hemostatické účinky (Dash et al., 2011). Produkty biodegradace chitosanu (např. chito-oligosacharidy (Chang et al., 2001) nebo glukosamin (Yan a Fong, 2015) jsou netoxické a vyskytují se v přirozených metabolických reakcích organismu.

1.2 Zdroje chitinu

Hlavními zdroji chitinu jsou:

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

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 (Pillai et al., 2009).

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. V přirozených podmínkách se ale mění parametry okolního prostředí (teplota, složení kultivačního média atd.), což vede k výrobě produktů, které nejsou reprodukovatelné. Chitosan připravovaný ze živočišných zdrojů (vytvořených *in vivo*) má nevýhody uvedené výše.

Naopak výhody dalších zdrojů chitosanu plynou z rozsáhlé biotechnologické produkce pěstování hub v umělých podmínkách. Ta je charakterizována vysokou produktivitou a přesným nastavením provozních podmínek (teplota, vlhkost, denní světlo, složení živin atd.). Díky tomu je zajištěna reprodukovatelnost růstových podmínek pro výrobce, a tím i syntéza polymerů a následně i kvalita chitinu a chitosanu. Chitosan z hub je součástí chitosan-glukanového komplexu, ve kterém je k hlavnímu chitosanovému řetězci 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 jsou na rozdíl od živočišného amorfni (Nwe a Stevens, 2002).

1.3 Příprava chitosanu

1.3.1 Příprava chitosanu z chitinu

Chitosan je nejdůležitějším derivátem chitinu, protože má nejvhodnější vlastnosti pro praktické využití. Obvykle se chitosan vyrábí N-deacetylací chitinu, na který se působí koncentrovanou zásadou (40–50 hm. % hydroxid sodný či draselný) při teplotách vyšších než 100 °C.

Fyzikálně-chemické vlastnosti výsledného produktu závisí na:

- koncentraci deacetylačního činidla a době jeho působení,
- teplotě a prostředí (dusíková atmosféra, vzduch), ve kterém reakce probíhá,
- typu chitinu podle jeho původu,
- velikosti částic použitých schránek korýšů,
- typu deacetylace.

Deacetylace může být provedena homogenním či heterogenním způsobem. Homogenní metoda vychází z disperze zásada-chitin a poskytuje amorfni produkt se zvýšeným obsahem náhodně rozložených N-acetylovaných a volných glukosaminových jednotek. Touto metodou získáme ve vodě rozpustný chitosan se stupněm acetylce 48–55 %, ale o nízké molární hmotnosti. Heterogenní deacetylce je charakterizována v kyselině rozpustnými a nerozpustnými podíly a značnou krystalinitou vysoce deacetylovaného chitosanu. Obecně lze říci, že alkalická deacetylce chitinu probíhá rychle až ke stupni

konverze 75–85 %. Po dosažení tohoto stupně konverze roste deacetylace velmi pomalu (Sannan et al., 1977).

Stupeň deacetylace je jedním z hlavních parametrů charakterizujících chitosan. Nejpresnější měření vyžadují složitá vybavení (NMR spektrometr), které v mnoha laboratořích po celém světě, ve kterých se pracuje s chitosanem, není k dispozici. Hledají se levnější, jednoduché, ale spolehlivé metody (Biskup et al., 2012).

Štěpení chitinu usnadňuje přístup deacetylačního činidla do vnitřku struktury, čímž se dosáhne rovnoměrného deacetylačního procesu a jeho doprovodného rozkladu. Při použití příliš velkých částic chitinu neprobíhá deacetylační proces v plném rozsahu – povrchové vrstvy těchto částic jsou deacetylovány ve větší míře než vrstvy vnitřní. Po rozpuštění v kyselině octové tvoří tyto povrchové vrstvy roztok a vnitřní vrstvy částic nejsou zcela deacetylovány, pouze bobtnají. V případě dostatečně silného mletí chitinu na velikost částic 300–500 nm se všechny vrstvy částic deacetylují rovnoměrně, což vede k získání homogenního produktu (Mohammed et al., 2017).

1.3.2 Získání chitosanu z houbové kultury

Obvykle se chitosan získává z mycelií *Absidia coerulea*, *Mucor rouxii*, *Gongronella butieri*, *Phycomyces blakesleanus* a *Absidia blakesleana*. V kultuře hub se kmeny testují na stanovení nejrychleji rostoucích a největších chitosan-produkujících hub. Optimální výtěžky chitosanu byly pozorovány u většiny kultur při teplotách 21 ° C a 26 ° C v 1% kvasnicovém extraktu, 0,4% glukóze a 0,3% peptonu (Rane a Hoover, 2009). *A. coerulea* ATCC 14076 a NRRL 1315 byly nejlepšími chitosanovými producenty ze studovaných kmenů. Výtěžky chitosanu *A. coerulea*, *M. rouxii*, *G. butieri*, *P. blakesleanus* a *A. blakesleana* byly 47–50, 29–32, 21–25, 6 a 7 mg na 100 ml. Stupeň acetylce chitosanu byl od 6 do 15 %; nejnižší byla z kmenů *A. coerulea*. Hmotnostně střední molekulová hmotnost houbových chitosanů byla ekvivalentní, přibližně $4,5 \times 10^5$ Da (Rane a Hoover, 2009).

2 Možnosti funkcionalizace chitosanových nanovláken

Chitosanová polymerní nanovláknna se získávají elektrostatickým zvlákňováním. Tato metoda umožňuje z roztoku polymerů získávat vlákna o průměru 50 až 4 500 nm. Taková nanovláknna jsou charakterizována nízkou hustotou, vysokou porézností, propustností pro vodu a plyn a velikostí pórů v rozmezí od desítek do stovek mikrometrů (Qasim et al., 2018, Yudin et al., 2014, Schiffman a Schauer, 2008).

Látky mohou být buď adherovány přímo na nanovláknenný povrch, kdy dochází k jejich uvolnění prostou difuzí s ohledem na jejich vzájemnou interakci a sílu vazby, či mohou být začleněny přímo dovnitř nanovláknna, kdy je uvolnění pomalejší a dochází k němu v závislosti na reologických 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 et al., 2008). Pro vytvoření systémů pro řízené dodávání léčiv s využitím nanovláken lze aplikovat různé metody, jako jsou fyzikální adsorpce na nanovláknna, směsné elektrostatické zvlákňování, emulzní elektrostatické zvlákňování a koaxiální elektrostatické zvlákňování. Metodami funkcionalizace nanovláken jsou:

- zvlákňování ze směsi roztoků,
- zvlákňování z emulze,
- koaxiální zvlákňování,
- povrchová adheze (Spasova et al., 2004, Buzgo et al. 2018, Ji et al., 2011).

2.1 Chemické modifikace nanovláken

Mezi základní chemické modifikace patří:

- směsná nanovláknna,
- koaxiální nanovláknna (nanovláknna jádro-plášť),
- povrchová modifikace.

2.1.1 Směsná nanovlákná

Míchání polymerů je jednou z účinných metod, které poskytují nové a žádoucí biokompozity pro aplikace tkáňového inženýrství. Zvýšení funkčních vlastností chitosanu pomocí směsi polymerů se provádí za účelem stabilizace procesu elektrostatického zvláknování 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 (Dhandayuthapani et al., 2010, Azuma et al., 2015).

Je však známo, že proces elektrostatického zvláknování 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 (MC), polyvinylpyrrolidon (PVP) či polyethylenoxid (PEO) (Padil et al., 2015, Zhao et al., 2012).

Zavedení chitinových nanovláken do zvláknovacího roztoku chitosanu dále 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 nanofibril chitinu. Vrstva nanovláken z chitosanu a nanofibril 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 kopolyamidu, zatímco vrstva chitin-chitosan zůstává a podporuje proces epitelizace (Li L. et al., 2006, Al-Enizi et al., 2018).

Ve studii (Dhandayuthapani et al., 2010) byl chitosan smíchán se želatínou. Byl zkoumán vliv parametrů při zvláknování a vlastností roztoku polymeru na morfologii získaných vláken. Zjistilo, že chitosan a želatina tvoří úplně mísitelné směsi, jak dokládá měření diferenční snímací kalorimetrie a Fourierovi transformační infračervené spektroskopie (FTIR). Pevnost v tahu směsných nanovláken z chitosanu/želatiny ($37,91 \pm 4,42$ MPa) byla statisticky významně vyšší než pevnost želatinových nanovláken ($7,23 \pm 1,15$ MPa) a srovnatelná s normální lidskou kůží (Dhandayuthapani et al., 2010).

V experimentu (Spasova et al., 2004) byla úspěšné přípravy nanovláken obsahujících chitosan dosaženo elektrostatickým zvláknováním vodných roztoků směsi chitosan/PEO.

Průměr nanovláken byl v rozmezí 40–290 nm a klesal se zvyšujícím se obsahem chitosanu a klesající celkovou koncentrací. Zvýšení použité intenzity elektrického pole vede ke zvýšení průměru nanovláken a k rozšíření distribuce velikosti průměru nanovláken. Byla ukázána možnost přípravy nanovláken obsahujících modelové léčivo (potassium 5-nitro-8-quinolinolate), širokospektrální antimikrobiální a antimykotické činidlo (Spasova et al., 2004).

2.1.2 Koaxiální nanovlákná

V práci (Maleknia et al., 2018) byla připravena core-shell nanovlákná z polyurethanu (jádro) a směsi chitosan/polyetylenoxid (PEO) (plášť) při různých poměrech rozpouštědel tetrahydrofuran/dimetylformamid. Bylo prokázáno, že přidání chitosanu/PEO do pláště nevyvolalo významné změny v krystalinitě koaxiálních nanovláken, ale zvýšilo hydrofilnost nanovláken a teplotu skelného přechodu. Předpokládá se, že koaxiální polyuretanová/chitosanová/PEO nanovlákná mohou být použita jako potenciální bioaktivní nosiče v tkáňovém inženýrství (Maleknia et al., 2018).

2.1.3 Povrchová modifikace

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 a Von Recum, 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 (bioaktivní látky) dochází obvykle k jeho denaturaci a následnému snížení aktivity. Na druhou stranu polymery zvlákněné z vodného rozpouštědla umožňují zachování bílkovin v nativním stavu. Nicméně tyto hydrofilní polymery (např. PVA) příliš nepodporují buněčnou adhezi a proliferaci a mají omezenou stabilitu ve fyziologických tekutinách (Kamoun et al., 2017). Na nanovlákná se proto adsorbují proteiny (např. kolagen, fibronectin, želatina) až po zvláknění (Zhang et al., 2014).

Povrch chitosanových filmů byl modifikován za použití stearyl chloridu a anhydridů šťavelové kyseliny a ftalové kyseliny. Data zeslabené úplné reflektance-FTIR potvrzují, že substituce na aminoskupinách chitosanu vznikla za vzniku amidových vazeb a modifikace probíhala do hloubky nejméně 1 μm (Tangpasuthadol et al., 2003).

Jednotlivé modifikované filmy byly podrobeny studiím adsorpce proteinů. Množství adsorbovaného proteinu stanoveného testem kyseliny bicinchoninové souvisí s typy molekul. Zlepšená povrchová hydrofobicita, následkem reakce se stearyl chloridem, podporuje adsorpci proteinů. Naopak, selektivní adsorpční chování bylo pozorováno u chitosanových filmů modifikovaných anhydridovými deriváty. Adsorpce lysozymu, který je při pH 7,4 pozitivně nabitý, byla zvýšena vodíkovou vazbou a přitahováním náboje s negativně nabitým hydrofilním povrchem. Naopak množství adsorbovaného albuminu bylo sníženo kvůli vysokému obsahu karboxylových skupin v albuminu, což vyvolalo odpudivost mezi modifikovaným povrchem a albuminem. Tato studie ukázala, že heterogenní chemickou modifikací je možné jemně naladit vlastnosti povrchu, které ovlivňují jeho reakci na biomakromolekuly (Tangpasuthadol et al., 2003).

2.2 Fyzikální modifikace

2.2.1 Síťování

Pro zlepšení fyzikálních vlastností – odolnosti vůči vodě i zvýšení pevnosti – se používají síťovací činidla: glutaraldehyd, glyoxal, genipin, fotosenzitivní látky, tripolyfosfát nebo zvýšená teplota (Ohkawa et al., 2006, Chen et al., 2008). Obsah chitosanu ve zvláknovacím roztoku obvykle kolísá od 1,5 do 3,5 % v závislosti na molekulové hmotnosti. Snížením molekulové hmotnosti polymeru na 30 kDa je možné zvýšit koncentraci roztoku chitosanu na 7 %. Nicméně použití chitosanu s nízkou molekulovou hmotností neumožňuje získání nerozpustných materiálů (Chen et al., 2008).

2.2.2 Plazmatické úpravy

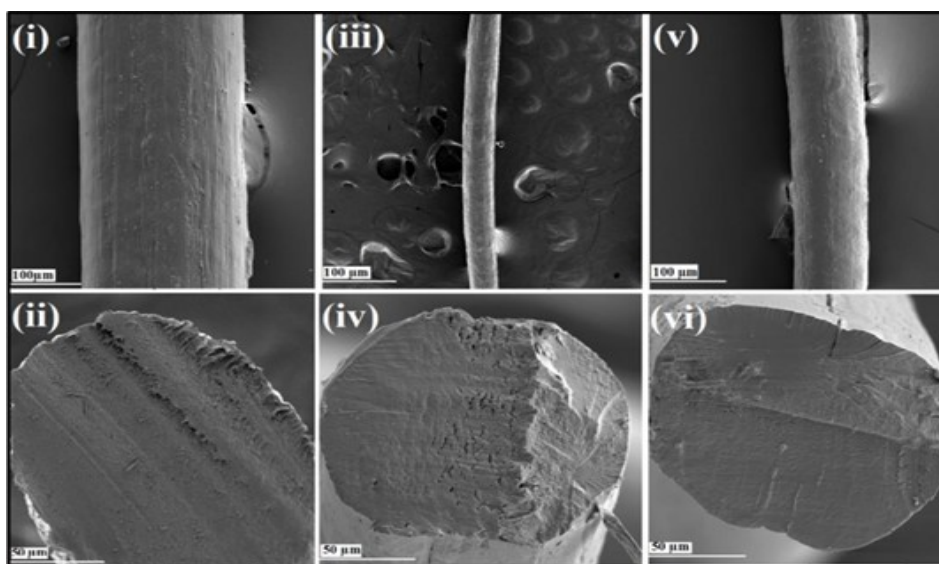
Plazmatem modifikovaný chitosan a poly(3,4-etylendioxytiofen) byly smíchány, aby se získala vodivá nanovlákná s PVA jako nosným polymerem v různých objemových poměrech. Vodivé směsi obsahující chitosan modifikovaný radiofrekvenčním hydrazinovým plazmatem vedly ke zvýšení množství $-NH_2$ skupin, k lepší antibakteriální aktivitě a k tvorbě tenčích vláken než ty, které obsahovaly chitosan bez plazmatické modifikace. Získané průměry nanovláken obsahující plazmaticky modifikovaný chitosan byly v rozmezí 170 až 200 nm a hodnoty získané z nemodifikovaného chitosanu byly v rozmezí 190 až 246 nm (Kiristi et al., 2013).

Chitosanové membrány byly připraveny odlitím rozpouštědla. Pro zvýšení adheze buněk na chitosanové membrány bylo použito kyslíkové plazma, které zlepšuje hydrofilnost jejich povrchu. Kontaktní úhel chitosanových membrán se po ošetření plazmatem snížil z 94,1° na 49,2°. Rentgenová fotoelektronová spektroskopie ukázala, že poměr obsahu kyslíku a poměru O/C se po ošetření kyslíkovým plazmatem významně zvýšil. *In vitro* testy ukázaly, že modifikované chitosanové membrány vykazují vyšší životaschopnost fibroblastů v porovnání s neošetřenými chitosanovými membránami. Navíc bylo zjištěno, že působením kyslíkového plazmatu se snížilo množství C-H vazeb, naopak množství C-OH skupiny bylo zvýšeno. Výsledky dalších experimentů ukázaly, že buď dusíkové, nebo argonové plazmatické ošetření může být použito pro zlepšení adheze a proliferace fibroblastů na chitosanových membránách. Navrhované úpravy by usnadnily použití materiálů na bázi chitosanu a chitosanu v ošetřování ran a v tkáňovém inženýrství (Zhao et al., 2009, Silva et al., 2008).

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

Existuje hodně studií, které prokazují, že chitosan v mnoha klinických případech urychluje hojení ran. Bylo zjištěno, že granule chitosanu mohou zvýšit regeneraci normální pokožky v případě otevřených ran. Proto může být chitosan použit k inhibici fibroplazie (nadměrné tvorby vaziva) během hojení ran a k podpoře růstu tkáně a diferenciaci buněk v tkáňové kultuře (Kumar et al., 2000).

Byl také vyvinut chitosan-glukanový obvaz s antibakteriální aktivitou pro hojení ran (Abdel-Mohsen et al. 2016). Chitin/chitosan-glukanový komplex (ChCsGC) byl izolován z kultury *Schizophyllum commune* a byl rozpuštěn v předchlazeném roztoku (15 °C) 8% močoviny / 6% vodném roztoku NaOH. Morfologie u chitin-glukanových nanovláken různých tloušťek je zobrazena na Obr. č. 4.



Obrázek č. 4. Morfologie různých typů chitin-glukanových nanovláken (Převzato z Abdel-Mohsen et al., 2016).

Netkané textilie z mikrovláken byly vyrobeny technikou „wet-dry“ zvlákňování. Biologická aktivita netkané textilie ChCsGC byla testována na různých typech bakterií a vykazovala vynikající antibakteriální aktivitu. Biokompatibilita netkaných textilií byla hodnocena za použití různého množství buněk fibroblastové myši buněčné linie. Dle výsledků testů s myšimi fibroblasty nebyl ChCsGC cytotoxický. ChCsGC prokázal také

vynikající účinnost v léčení rány při testování na modelu potkanů (Abdel-Mohsen et al., 2016).

Je popsáno použití chitosan-glukanového komplexu jako přípravku pro hojení ran a prevenci adheze bandáže k ráně. V práci (Rajabnia et al., 2016) je ukázáno, že chitosan z hub ve formě gelu prokázal za jinak nezměněných podmínek 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 (Dai et al., 2014, Ifuku, 2014).

4 Modifikace chitosanu pomocí trombocytů a jiných krevních produktů

Rekonstrukce hlubších ran vyžaduje prostorovou rekonstrukci a stimulaci regeneračních procesů v celém objemu defektu. V tomto případě je vhodné použití produktu tkáňového inženýrství sestávající z polymerní matrice, buněčných komponent a produktů sekrece buněk (Zhang Y. et al., 2007, Yang, 2011). Plazma bohatá na krevní destičky (PRP) a ostatní krevní produkty jsou v humánní a veterinární medicíně používány již více než 20 let. Četné studie prokázaly jejich terapeutický účinek na základě využití biologické aktivity růstových faktorů obsažených v krevních destičkách (Okuda et al., 2003).

Je známo, že krevní destičky obsahují specifické i nespecifické růstové faktory, které iniciují mitózu buněk a regeneraci pojivové tkáně. Nejdůležitější z nich je od destiček odvozený růstový faktor, transformující růstový faktor- β , vaskulární endotelový růstový faktor, epiteliální růstový faktor, bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a inzulínu podobný růstový faktor (Gan et al., 2007, Fréchet et al., 2016, Cook et al., 1993).

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

Chemické složení a porézní struktura modifikovaných nanovláken podporují adhezi krevních buněk, kmenových buněk nebo somatických buněk na jejich povrchu. To zajišťuje metabolické procesy nezbytné pro efektivní proliferaci, pohyb a diferenciaci buněk (Vasita a Katti, 2006).

Chitosan, jako kationtový polysacharid, může interagovat s negativně nabitými (makro) molekulami, jako je heparin. Studie prokázala blokování biologické aktivity heparinu pomocí N-(2-hydroxypropyl)-3-tri metylamonium chitosan chloridu v závislosti na dávce. Chitosan je jedním z nejslibnějších polymerů v biomedicínské oblasti díky své biokompatibilitě a biologické degradovatelnosti (Lorkowska-Zawicka et al., 2014).

5 Dodávání léčiv nanovláknny

Pro zvýšení účinnosti a urychlení regenerace měkkých tkání je vhodné nanovláknna obohatit. Za tímto účelem jsou nanovláknna funkcionalizována bioaktivními látkami různých typů: antimikrobiální, analgetické, růstové faktory atd., nebo jsou využívány funkční polymery.

Uvolňování léčiv může být způsobeno fyzickými nebo chemickými podněty, jako jsou pH, iontová síla, teplota a magnetické a biologické molekuly. Na stimuly citlivé nanočástice mohou být tedy slibným nosným systémem, protože mohou selektivně reagovat na změny prostředí *in vitro* nebo *in vivo*. Chitosan vykazuje citlivost vůči pH kvůli velkému počtu aminoskupin na jeho řetězcích (Yang a Hon, 2009).

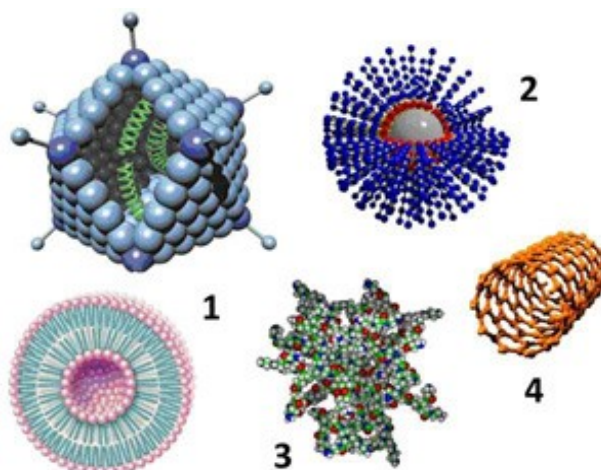
Díky citlivosti na pH mohou chitosanové nanočástice zavedené jako chitosanové nanogely podstoupit fázové přechody od bobtnání ke smršťování nebo naopak. Tato vlastnost je mimořádně důležitá z hlediska použitelnosti, neboť schopnost přenášet a uvolňovat částice se výrazně liší od nabobtnalého až zkolabovaného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

Využití chitosanu jako nanonosiče pro cílené podávání léků je také slibné. Byla zkoumána možnost uzavření protinádorových látek, například 5-fluorouracilu, do chitosanových nanočástic pro pH stimulované uvolňování (Tiğli a Pulat, 2012).

Jako systém dodávání léku se často používají uhlíkové nanočástice – fullereny a nanotrubičky (Obr. č. 5). Hlavním rysem fullerenů je jejich rámová forma, která se může stát základem nejen pro distribuční systémy, ale také pro novou třídu léčiv (Tripathi et al., 2015). Fullereny a grafeny se podílejí na kontrole velikostí pórů na chitosanových membránách a tak mohou hrát důležitou roli v regulaci aplikace léčiv (Fahim et al. 2015).

V práci (Lancina et al., 2017) byla vyvinuta nanovláknna na bázi chitosanu, která jsou schopna dodávat inzulín prostřednictvím bukalní sliznice. Chitosan byl elektrostaticky zvlákněn do nanovláken pomocí nosného PEO v různých poměrech. Průnik inzulínu přes bukalní sliznici byl měřen *ex vivo* v prasečím transbukálním modelu. Morfologie vláken, mechanické vlastnosti a stabilita *in vitro* závisely na poměru PEO. Směsi s nižším obsahem PEO vedly k tvorbě vláken menších průměrů s výrazně rychlejší kinetikou uvolňování

inzulínu. Inzulin nevykazoval snížení bioaktivity po zvláknění. Bukální permeace inzulínu u nanovláken s vysokými obsahem chitosanu byla významně vyšší než u volného inzulínu. Práce demonstruje, že nanovlákná na bázi chitosanu mají potenciál sloužit jako nosič transdukčního inzulínu (Lancina et al., 2017).

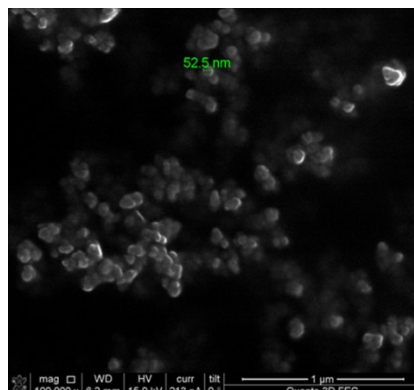


Obrázek č. 5. Nanočástice používané k transportu terapeutických molekul. 1 – lipozom a adenovirus; 2 – polymerní nanostruktura; 3 – dendrimer; 4 – uhlíkové nanotrubičky (Převzato z Maruyama, 2000).

Stejně jako všechny fosfolipidy a tuky, také lipozomy oxidují. Velikost lipozomálních kapslí zhoršuje jejich průchodnost tkáněmi. Proto byly v posledních letech jako alternativy vyvinuty niozomy – analoga silikonové povahy, která mají řadu výhod. Niozomy jsou nanovezikuly o velikosti 30–80 nanometrů (Obr. č. 6), které mají ve vodě nerozpustný plášť tvořený dvouvrstvou neiontového emulgátoru (povrchově aktivní látky), skupinou látek sestávající z kopolyolů dimetikonu, eteru polyetylglykolu na bázi polydimetylsiloxanu a uvnitř jsou uzavřena léčiva. Transdermální transport účinných látek je možný v důsledku schopnosti neiontově povrchově aktivních látek vytvořit dvojité molekularní vrstvy podobnou plazmatické membráně živých buněk (Abdelkader et al., 2014, Marianecci et al., 2016).

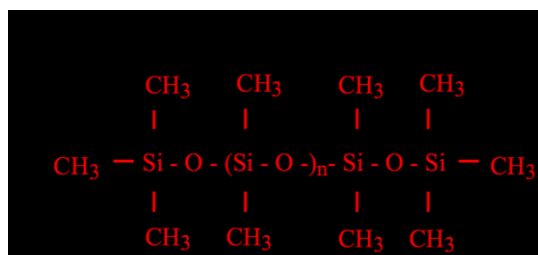
V experimentu (Venugopal a Chandran, 2012) byly připraveny chitosanové nanočástice obsahující inzulin metodou tvorby komplexu polyelektrolytů. Transdermální dodávání inzulínu pomocí inzulin-chitosanových nanočástic statisticky významně snížilo plazmatickou hladinu glukózy a zvýšilo sekreci inzulínu u diabetických potkanů. Tyto výsledky podporují

proveditelnost rozvoje transdermálního biodegradabilního nanoinzulínu pro humánní aplikaci po delší dobu (Venugopal a Chandran, 2012).



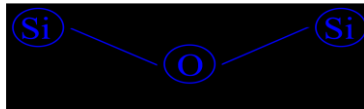
Obrázek č. 6. Elektronová mikroskopie niozomu (Převzato z Abdelkader et al., 2014).

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 (polyetylglykolu). CH₃- (metyl) skupina tvoří „oblak“ kolem atomů křemíku a poskytuje reaktivní místa pro reakci s biologicky aktivní látkou (Obr. č. 7) (Carafa et al., 2011).



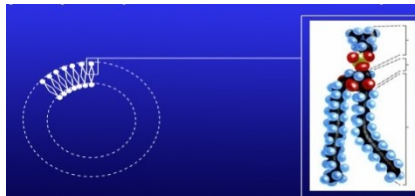
Obrázek č. 7. Molekula PEG-12 Dimethicon (Převzato z Carafa et al., 2011).

Délka vazby Si-O je delší než vazba C-C, proto je molekula Dimethicone PEG-12 elastičtější než fosfolipidy používané při tvorbě vezikul (lipozomů) a je schopna vytvářet vezikuly bez významných energetických sil. Délka vazby Si-O je 1,6 Å (délka vazby analogů niozomu je C-C 1,4 Å), úhel vazby Si-O-Si je 130 stupňů, na rozdíl od vazby C-C-C s úhlem 109 stupňů, což vede ke zvýšení elasticity a stability (Obrázek č. 8).



Obrázek č. 8. Připojení molekul křemíku a kyslíku v niozomu (Převzato z Moghassemi 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 (Obr. č. 9). To zvyšuje stabilitu podávaných látek v organismu, a tím je umožněno snížení dávky léčiv.



Obrázek č. 9. Tvorba organosilikonových niozomů z PEG-12 Dimethicone (Převzato z Marianecci et al., 2016).

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

6 Porovnání chitosanu s jinými látkami na hojení ran

6.1 Polyvinylalkohol (PVA)

Elektrostatickým zvlákňováním byla připravena nanovlákná z polyvinylalkoholu (PVA), která byla ošetřena směsí medu a polyhexametylenbiguanidů (Turaga et al., 2016). Funkcionalizovaná nanovlákná PVA byla charakterizována hodnocením jejich antimikrobiálních vlastností, jejich prodyšnosti a mechanických vlastností. PVA nanovlákná ošetřená směsí medu a polyhexametylenbiguanidů vykazovala dobrou antimikrobiální aktivitu. Navíc nanovlákná prokázala adekvátní charakteristiky prodyšnosti, což je velmi potřebný atribut v textilních materiálech používaných v obvazových aplikacích (Turaga et al., 2016).

Rovněž lze PVA smíchat s xanthanovou gumou a sorbitolem za účelem zlepšení pružnosti materiálu. PVA smíchaný se sorbitolovými hydrogely má nižší tuhost než 10 hmotn. % PVA. Hydrogely tvořené PVA-sorbitolem navíc vykazovaly vyšší elasticitu než 10 hmotn. % PVA (Nazanin, 2016).

Směsná nanovlákná na bázi polyvinylalkoholu (PVA) a fibroinu prokázala zachování enzymatické aktivity proteinů, jako jsou lipáza, kasein a křenová peroxidáza (HRP) (Zeng et al., 2005), po inkorporaci do různých nanovláken připravených z rychle rozložitelných polymerů rozpuštěných v polárních rozpouštědlech. Metoda směsného elektrostatického zvlákňování 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 hedvábí či fibroin podporující adhezi a proliferaci buněk (Zeng et al., 2005).

6.2 Polykaprolakton (PCL)

PCL je polyester, který je typicky připravován katalytickou polymerizací s otevřením kruhu ϵ -kaprolaktonu. PCL je plně biologicky degradovatelný a rozkládá se hydrolýzou esterové vazby při fyziologických podmínkách. Z tohoto důvodu je možné tento polymer využít mj. v implantační technice, jako nosič léčiv, jako materiál pro vnitřní šití nebo pro implantáty, které jsou po uzdravení tkáně organismem vstřebány (Huang et al., 2003).

Rozpuštěním PCL v šesti směsích rozpouštědel připravených z etanolu, dimetylsulfoxidu (DMSO), etylacetátu, chloroformu, tetrahydrofuranu (THF), kyseliny octové a dimethylacetamidu (DMA) se elektrostatickým zvlákněním podařilo připravit porézní PCL nanovlákná. Připravená porézní nanovlákná vrstva z PCL by mohla být z důvodu vysokého měrného povrchu využita pro některé speciální aplikace ve tkáňovém inženýrství. Její předností je biodegradabilita, biokompatibilita a poréznost vláken. Další možné aplikace se předpokládají v oboru filtrace (Huang et al., 2003, Wang et al., 2013).

PCL v kombinaci s dalšími materiály, jako jsou hydrogely nebo decelularizovaná ECM, se dá využívat v léčení úrazů míchy (Donoghue et al. 2013), poškozených menisků (Gao et al., 2017) a také k léčení poškození měkkých tkání (Schulz et al., 2014). Výhodami PCL jsou jeho vysoká elasticita a dobrá zpracovatelnost a dostupnost (Ulery et al., 2011). Nevýhodou ale je pomalá degradace homopolymerů, což bývá usnadněno použitím kopolymerů (Saad a Suter, 2001).

6.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) se používá při regeneraci tkáně samostatně nebo jako složka nosičů podílejících na regeneraci. HA navíc zvyšuje účinnost nosičů (např. stimulací epidermálních růstových faktorů), například v kombinaci se zabudováním bFGF. Účinnost hojení ran byla studována na zvířecích modelech. Použití HA vedlo ke zlepšené epitelizaci a tvorbě měkké tkáně s dobrou elasticitou a zvýšenou mikrovaskulární hustotou. HA také ukázala dobré výsledky při regeneraci pojivové tkáně u králičích modelů. V případě dehiscence rány po chirurgickém zákroku u pacientů s plantární nervovou neuropatií byly použity léky s plazmou bohaté na krevní destičky a HA. Další studie zaznamenaly použití gelů obsahujících HA k hojení ran u pacientů s chronickou parodontitidou (Neuman et al., 2015).

Na regeneraci měkkých tkání byla hodnocena účinnost léků na bázi kyseliny hyaluronové, kolagenu, želatiny, fibroblastů a růstových faktorů. Tyto nosiče, které se skládají z různých biologických složek, přispívají k regeneraci dermis a léčení ran měkkých tkání. V jednom případě dermální/epidermální frakce buněk zachycená přímo uvnitř hydrogelu urychlila hojení ran. V jiném případě byl substrát použit pro dodání bFGF. Vstříkovaný hydrogel poskytoval adhezi v modelu potkana po incizi linea alba a usnadnění hojení ran (Na et al., 2012). Houbovitý substrát s epidermálním růstovým faktorem

podporuje hojení ran u krysy s vyříznutou částí peritonea (Kuroyanagi et al., 2014). Používá se např. s nosiči z PCL a HA, které příznivě ovlivňují rychlost a směr pohybu fibroblastů a urychlují tím regeneraci tkáně (Qian et al., 2015).

6.4 Nanovláknenné nosiče ze sojových proteinů a celulózy napodobující mimobuněčnou hmotu kůže pro zlepšení hojení ran

Sójovému proteinu byla věnována pozornost díky různým možnostem jak vylepšit zdravotní stav pacientů, včetně zlepšené regenerace pokožky. Bylo zjištěno, že sójový protein obsahuje bioaktivní molekuly, jako proteiny mimobuněčné hmoty (ECM) a estrogenu. Při hojení ran byla potravinářská sója prohlášena za bezpečnou a cenově výhodnou alternativu k živočišným bílkovinám a endogennímu estrogenu. V experimentu (Ahn et al., 2018) je popsán vývoj rostlinného nanovláknenného krytu sestávajícího z acetátu celulózy (CA) a hydrolyzátu sójové bílkoviny (SPH) za použití elektrostatického zvláknování pomocí rotující jehly. Připravená nanovláknena úspěšně napodobují fyzikálně-chemické vlastnosti přirozené ECM epidermis a vykazují vysokou schopnost zadržovat vodu. *In vitro* CA/SPH nanovláknena podporují proliferaci fibroblastů, jejich migraci a infiltraci a expresi integrinu $\beta 1$. V *in vivo* experimentu na myši, CA/SPH nanovláknena urychlují reepitelizaci a redukuje tvorbu jizev (Ahn et al., 2018).

7 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.

Ve většině výzkumů se chitosan používá jako surovina pro umělá vlákna, příze, prášky, granule, houby a kompozity s bavlnou nebo polyestery. Léčivé přípravky vyrobené z chitosanu se používají jako materiály pro ošetření ran.

Porézní nanovláknenné materiály založené na chitosanu nebo komplexu chitin-glukan představují nejslibnější nanovlákná pro regeneraci měkkých tkání. Vlastnosti chitosanu závisí na pH, což činí chitosanová 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 regeneraci tkání.

Na rekonstrukce hlubší rány se používají nosiče s obsahem krevních destiček, buněk nebo produktů sekrece buněk. Účinnost ošetřování ran se zvyšuje při současném použití autologních krevních produktů – destičkového gelu a plazmy bohaté na krevní destičky. Dostupnost, bezpečnost a účinnost kombinovaného použití kompozitních nanovláknenných obvazů na rány a autologních krevních produktů určují, zda je možné stimulovat regeneraci a zabránit změnám v tkáni a infekčním komplikacím.

Nová strategie funkcionalizace nanovláken ukazuje perspektivnost systému podání léků pomocí nanovezikul (lipozomů a niozomů) v kombinaci s nanovlákný s obsahem chitosanu pro regenerativní medicínu.

Pro regeneraci měkkých tkání se také vyvíjejí jiné materiály na bázi syntetických polymerů, např. PVA, polykaprolaktonu, na bázi proteinů nebo polysacharidů. Liší se v chemickém složení, fyzikálních vlastnostech, povrchovými vlastnostmi a často se kombinují nebo modifikují. Různé kompozity, včetně kompozitů s chitosanem, nabízejí široké možnosti

modifikace a funkcionalizace jejich vlastností, a tím i zlepšení nebo zacílení jejich účinku na regeneraci tkání.

8 Seznam použité literatury

- H. ABDELKADER, A. W. G. ALANI, R. G. ALANY. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications and limitations. *Drug Delivery*. 2013, **21**(2), 87-100.
- A. M. ABDEL-MOHSEN, J. JANCAR, D. MASSOUD, Z. FOHLEROVA, H. ELHADIDY, Z. SPOTZ, A. HEBEISH. Novel chitin/chitosan-glucan wound dressing: Isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, **510**(1), 86-99.
- S. AGARWAL, J. H. WENDORFF, A. GREINER, Z. FOHLEROVA, H. ELHADIDY, Z. SPOTZ, A. HEBEISH. Use of electrospinning technique for biomedical applications: isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties. *Polymer*. 2008, **49**(26), 5603-5621.
- S. AHN, C. O. CHANTRE, A. R. GANNON, J. U. LIND, P. H. CAMPBELL, T. GREVESSE, B. B. O'CONNOR, K. K. PARKER. Soy protein/cellulose nanofiber scaffolds mimicking skin extracellular matrix for enhanced wound healing. *Advanced Healthcare Materials*. 2018, **7**(9), 1701175.
- A. AL-ENIZI, M. ZAGHO, A. ELZATAHRY. Polymer-based electrospun nanofibers for biomedical applications. *Nanomaterials*. 2018, **8**(4), 259.
- K. AZUMA, R. IZUMI, T. OSAKI, S. IFUKU, M. MORIMOTO, H. SAIMOTO, S. MINAMI, Y. OKAMOTO. Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials. *Journal of Functional Biomaterials*. 2015, **6**(1), 104-142.
- R. C. BISKUP, D. JAROSIŃSKA, B. ROKITA, P. ULAŃSKI, J. ROSIAK. Determination of degree of deacetylation of chitosan – comparison of methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. 2012, **17**, 1-20.
- L. BRANNON-PEPPAS, J. O. BLANCHETTE, A. GREINER, Z. FOHLEROVA, H. ELHADIDY, Z. SPOTZ, A. HEBEISH. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy: isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004, **56**(11), 1649-1659.
- M. BUZGO, E. FILOVA, A. STAFFA, M. RAMPICHOVA, M. DOUPNIK, K. VOCETKOVA, V. LUKASOVA, R. KOLCUN, D. LUKAS, A. NECAS, E. AMLER. Needleless emulsion electrospinning for the regulated delivery of susceptible proteins. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018, **12**(3), 583-597.

- Z. - X. CAI, X. - M. MO, K. - H. ZHANG, L. - P. FAN, A. - L. YIN, C. - L. HE, H. - S. WANG. Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound-dressing applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010, **11**(9), 3529-3539.
- P. CALVO, C. REMUÑAN-LÓPEZ, J. L. VILA-JATO, M. J. ALONSO. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical Research*. 1997, **14**(10), 1431-1436.
- M. CARAFA, C. MARIANECCI, L. DI MARZIO, F. RINALDI, C. DI MEO, P. MATRICARDI, F. ALHAIQUE, T. COVIELLO. A new vesicle-loaded hydrogel system suitable for topical applications: preparation and characterization. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011, **14**(3), 336-346.
- K. L. B. CHANG, M. - C. TAI, F. - H. CHENG. Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, **49**(10), 4845-4851.
- J. - W. CHEN, K - F. TSENG, S. DELIMARTIN, C.- K. LEE, M. - H . HO, I. C. KWON. Preparation of biocompatible membranes by electrospinning. *Desalination*. 2008, **233**(1-3), 48-54.
- D. R. COOK, M. E. DOUMIT, R. A. MERKEL. Transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived growth factor-BB interact to affect proliferation of clonally derived porcine satellite cells. *Journal of Cellular Physiology*. 1993, **157**(2), 307-312.
- T. DAI, M.TANAKA, Y. - Y. HUANG, M. R. HAMBLIN. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2014, **9**(7), 857-879.
- J. DANG, K. LEONG, S. DELIMARTIN, C. - K. LEE, M. - H. HO, I. C. KWON. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006, **58**(4), 487-499.
- M. DASH, F. CHIellini, R. M. OTTENBRITE, E. CHIellini, M. -H. HO, I. C. KWON. Chitosan - A versatile semi - synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2011, **36**(8), 981-1014.
- H. DEVALAPALLY, A. CHAKILAM, M. M. AMIJI, E. CHIellini, M.-H. HO, I. C. KWON. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development: an emerging field of polymer science. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, **96**(10), 2547-2565.
- B. DHANDAYUTHAPANI, U. M. KRISHNAN, S. SETHURAMAN. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2010, **94**(1), 264-272.
- P. S. DONOGHUE, R. LAMOND, S. D. BOOMKAMP, T. SUN, N. GADEGAARD, M. O. RIEHLE, S. C. BARNETT. The development of a ϵ -polycaprolactone scaffold for central nervous system repair. *Tissue Engineering Part A*. 2013, **19**(3-4), 497-507.

P. A. EVERTS, J. T. KNAPE, G. WEIBRICH, J. P. SCHÖNBERGER, J. HOFFMANN, E. P. OVERDEVEST, H. A. BOX, A. VAN ZUNDERT. Platelet rich plasma and platelet gel: a review. *Journal of Extra-corporeal Technology*. 2006, **38**(2), 174–187.

I. S. FAHIM, N. MAREI, H. G. SALEM, W. MAMDOUH. Effect of graphene and fullerene nanofillers on controlling the pore size and physicochemical properties of chitosan nanocomposite mesoporous membranes. *Journal of Nanomaterials*. 2015, **25**(4), 1-10.

S. - S. FENG, P. V. POPRYADUKHIN, V. E. YUDIN, E. M. IVAN'KOVA, V. Y. ELOKHOVSKIY, Z. WEISHAUPTOVA, K. BALIK. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy: an emerging field of polymer science. *Expert Review of Medical Devices*. 2014, **1**(1), 115-125.

J. - P. FRÉCHETTE, I. MARTINEAU, G. GAGNON, E. M. IVAN'KOVA, V. Y. ELOKHOVSKIY, Z. WEISHAUPTOVA, K. BALIK. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *Journal of Dental Research*. 2016, **84**(5), 434-439.

Q. GAN, T. WANG, G. GAGNON, E. M. IVAN'KOVA, V. Y. ELOKHOVSKIY, Z. WEISHAUPTOVA, K. BALIK. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release: growth factor content and roles in wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007, **59**(1), 24-34.

S. GAO, W. M. GUO, M. CHEN, Z. YUAN, M. WANG, Y. ZHANG, S. LIU, T. XI, Q. GUO. Fabrication and characterization of electrospun nanofibers composed of decellularized meniscus extracellular matrix and polycaprolactone for meniscus tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*. 2017, **5**(12), 2273-2285.

Z. - M. HUANG, Y. - Z. ZHANG, M. KOTAKI, S. RAMAKRISHNA. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*. 2003, **63**(15), 2223-2253.

S. IFUKU. Chitin and chitosan nanofibers: preparation and chemical modifications. *Molecules*. 2014, **19**(11), 18367-18380.

K. A. JANES, M. P. FRESNEAU, A. MARAZUELA, A. FABRA, M. J. ALONSO, Y. FAN, K. BALIK. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin: growth factor, content and roles in wound healing. *Journal of Controlled Release*. 2001a, **73**(2-3), 255-267.

K. A. JANES, P. CALVO, M. J. ALONSO, A. FABRA, M. J. ALONSO, Y. FAN, K. BALIK. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules: growth factor content and roles in wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001b, **47**(1), 83-97.

W. JI, Y. SUN, F. YANG, J. J. J. P. VAN DEN BEUCKEN, M. FAN, Z. CHEN, J. A. JANSEN. Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharmaceutical Research*. 2011, **28**(6), 1259-1272.

- O. I. KALAOGLU-ALTAN, A. KIRAC-AYDIN, B. SUMER BOLU, R. SANYAL, A. SANYAL. Diels–alder “clickable” biodegradable nanofibers: benign tailoring of scaffolds for biomolecular immobilization and cell growth. *Bioconjugate Chemistry*. 2017, **28**(9), 2420-2428.
- E. A. KAMOUN, E. - R. S. KENAWY, X. CHEN. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*. 2017, **8**(3), 217-233.
- M. KIRISTI, A. U. OKSUZ, L. OKSUZ, S. ULUSOY. Electrospun chitosan/PEDOT nanofibers. *Materials Science and Engineering: C*. 2013, **33**(7), 3845-3850.
- M. N. V. R. KUMAR, Y. - L. HSIEH, G. ZHOU, P. LI, X. WEI, Y. FAN, K. BALIK. A review of chitin and chitosan applications: growth factor content and roles in wound healing. *Reactive and Functional Polymers*. 2000, **46**(1), 1-27.
- M. KUROYANAGI, A. YAMAMOTO, N. SHIMIZU, A. TOI, T. INOMATA, A. TAKEDA , Y. KUROYANAGI. Development of anti-adhesive spongy sheet composed of hyaluronic acid and collagen containing epidermal growth factor. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2014, **25**(12), 1253-1265.
- M. G. LANCINA, R. K. SHANKAR, H. YANG. Chitosan nanofibers for transbuccal insulin delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017, **105**(5), 1252-1259.
- L. LI, Y. - L. HSIEH, G. ZHOU, P. LI, X. WEI, Y. FAN, K. BALIK. Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers: growth factor content and roles in wound healing. *Carbohydrate Research*. 2006, **341**(3), 374-381.
- D. LIANG, B. S. HSIAO, B. CHU. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007, **59**(14), 1392-1412.
- H. LIU, X. DING, G. ZHOU, P. LI, X. WEI, Y. FAN, K. BALIK. Electrospinning of nanofibers for tissue engineering applications: growth factor content and roles in wound healing. *Journal of Nanomaterials*. 2013, **2013**(1), 1-11.
- B. LORKOWSKA-ZAWICKA, K. KAMIŃSKI, J. CIEJKA, K. SZCZUBIAŁKA, M. BIAŁAS, K. OKOŃ, D. ADAMEK, M. NOWAKOWSKA, J. JAWIEŃ, R. OLSZANECKI, R. KORBUT. Inactivation of heparin by cationically modified chitosan. *Marine Drugs*. 2014, **12**(7), 3953-3969.
- T. LÓPEZ-LEÓN, E. L. S. CARVALHO, B. SEIJO, J. L. ORTEGA-VINUESA, D. BASTOS-GONZÁLEZ. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, **283**(2), 344-351.
- C. MARIANECCI, L. DI MARZIO, E. DEL FAVERO, L. CANTÙ, P. BROCCA, V. RONDELLI, F. RINALDI, L. DINI, A. SERRA, P. DECUZZI, C. CELIA , D. PAOLINO, M. FRESTA, M. CARAFA. Niosomes as drug nanovectors: multiscale pH-dependent structural response. *Langmuir*. 2016, **32**(5), 1241-1249.

- K. MARUYAMA. In vivo targeting by liposomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2000, **23**(7), 791-799.
- S. MOGHASSEMI, A. HADJIZADEH. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. *Journal of Controlled Release*. 2014, **185**, 22-36.
- M. MOHAMMED, J. SYEDA, K. WASAN, E. WASAN. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*. 2017, **9**(4), 53.
- S. Y. NA, S. H. OH, K. S. SONG, J. H. LEE. Hyaluronic acid/mildly crosslinked alginate hydrogel as an injectable tissue adhesion barrier. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2012, **23**(9), 2303-2313.
- A. NAZANIN. Mechanical properties of poly (vinyl alcohol) based blends and composites. *Electronic Thesis and Dissertation Repository*. 2016, **3746**.
- M. G. NEUMAN, R. M. NANAU, L. ORUÑA-SANCHEZ, G. COTO. Hyaluronic acid and wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2015, **18**(1), 53.
- N. NWE, W. F. STEVENS. Chitosan isolation from the chitosan-glucan complex of fungal cell wall using amylolytic enzymes. *Biotechnology Letters*. 2002, **24**(18), 1461-1464.
- K. OHKAWA, K. - I. MINATO, G. KUMAGAI, S. HAYASHI, H. YAMAMOTO. Chitosan nanofiber. *Biomacromolecules*. 2006, **7**(11), 3291-3294.
- K. OKUDA, T. KAWASE, M. MOMOSE, M. MURATA, Y. SAITO, H. SUZUKI, L. F. WOLFF, H. YOSHIE. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *Journal of Periodontology*. 2003, **74**(6), 849-857.
- V. V. T. PADIL, N. H. A. NGUYEN, A. ŠEVCŮ, M. ČERNÍK. Fabrication, characterization, and antibacterial properties of electrospun membrane composed of gum karaya, polyvinyl alcohol, and silver nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. 2015, Article ID 750726, 1-10.
- C. K. S. PILLAI, W. PAUL, C. P. SHARMA. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 2009, **34**(7), 641-678.
- S. QASIM, M. ZAFAR, S. NAJEEB, Z. KHURSHID, A. SHAH, S. HUSAIN, I. REHMAN. Electrospinning of chitosan-based solutions for tissue engineering and regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**(2), 407.
- Y. QIAN, L. LI, C. JIANG, W. XU, Y. LV, L. ZHONG, K. CAI, L. YANG. The effect of hyaluronan on the motility of skin dermal fibroblasts in nanofibrous scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, **79**, 133-143.

- K. D. RANE, D. G. HOOVER. Production of chitosan by fungi. *Food Biotechnology*. 2009, **7**(1), 11-33.
- R. RAJABNIA, M. GHASEMPOUR, S. GHAREKHANI, S. GHOLAMHOSEINNIA, S. SOROORHOMAYOON. Anti-streptococcus mutans property of a chitosan: containing resin sealant. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*. 2016, **6**(1), 49.
- B. SAAD, U. W. SUTER. Biodegradable polymeric materials. In *Encyclopedia of materials: science and technology*. K.H.J. Buschow, et al., Editors, Elsevier, Oxford. 2001, 551-555.
- T. SANNAN, K. KURITA, Y. IWAKURA. Studies on chitin. V. Kinetics of deacetylation reaction. *Polymer Journal*. 1977, **9**(6), 649-651.
- J. D. SCHIFFMAN, C. L. SCHAUER. A review: electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications. *Polymer Reviews*. 2008, **48**(2), 317-352.
- S. SCHULZ, M. ANGARANO, M. FABRITIUS, R. MÜLHAUPT, M. DARD, M. OBRECHT, P. TOMAKIDI, T. STEINBERG. Nonwoven-based gelatin/polycaprolactone membrane proves suitability in a preclinical assessment for treatment of soft tissue defects. *Tissue Engineering Part A*. 2014, **20**(13-14), 1935-1947.
- T. J. SILL, H. A. VON RECUM. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008, **29**(13), 1989-2006.
- S. S. SILVA, S. M. LUNA, M. E. GOMES, J. BENESCH, I. PASHKULEVA, J. F. MANO, R. L. REIS. Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies. *Macromolecular Bioscience*. 2008, **8**(6), 568-576.
- M. SPASOVA, N. MANOLOVA, D. PANEVA, I. RASHKOV. Preparation of chitosan-containing nanofibres by electrospinning of chitosan/poly (ethylene oxide) blend solutions. *E-Polymers*. 2004, **4**(1).
- A. R. S. TIĞLI, M. PULAT. 5-fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: evaluation of controlled release kinetics. *Journal of Nanomaterials*. 2012, **2012**(1), 1-10.
- A. TRIPATHI, S. SARAF, S. SARAF. Carbon nanotropes: a contemporary paradigm in drug delivery. *Materials*. 2015, **8**(6), 3068-3100.
- U. TURAGA, V. SINGH, A. GIBSON, S. MAHARUBIN, C. KORZENIEWSKI, S. PRESLEY, E. SMITH, R. J. KENDALL, S. RAMKUMAR. Preparation and characterization of bioactive and breathable polyvinyl alcohol nanowebs using a combinational approach. *TAPPI Journal*. 2016, **15**(10).
- V. TANGPASUTHADOL, N. PONGCHASIRIKUL, V. P. HOVEN. Surface modification of chitosan films. *Carbohydrate Research*. 2003, **338**(9), 937-942.

- B. D. ULERY, L. S. NAIR, C. T. LAURENCIN. Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2011, **49**(12), 832-864.
- R. VASITA, D. S. KATTI. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 2006, **1**(1), 15-30.
- V. VENUGOPAL, J. CHANDRAN. Transdermal delivery of insulin by biodegradable chitosan nanoparticles: ex vivo and in vivo studies. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, **8**(1), 315-321.
- X. WANG, B. DING, B. LI. Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering. *Materials Today*. 2013, **16**(6), 229-241.
- Q. YAN, S. S. FONG. Bacterial chitinase: nature and perspectives for sustainable bioproduction. *Bioresources and Bioprocessing*. 2015, **2**, 31.
- H. - C. YANG, M. - H. HON. The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery. *Microchemical Journal*. 2009, **92**(1), 87-91.
- T.-L. YANG. Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, **12**(3), 1936-1963.
- V. E. YUDIN, I. P. DOBROVOLSKAYA, I. M. NEELOV, E. N. DRESVYANINA, P. V. POPRYADUKHIN, E. M. IVAN'KOVA, V. YU. ELOKHOVSKII, I. A. KASATKIN, BORIS M. OKRUGIN, P. MORGANTI. Wet spinning of fibers made of chitosan and chitin nanofibrils. *Carbohydrate Polymers*. 2014, **108**, 176-182.
- J. ZENG, A. AIGNER, F. CZUBAYKO, T. KISSEL, J. H. WENDORFF, A. GREINER. Poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning as a protein delivery system and the retardation of enzyme release by additional polymer coatings. *Biomacromolecules*. 2005, **6**(3), 1484-1488.
- H. ZHANG, J. MI, Y. HUO, X. HUANG, J. XING, A. YAMAMOTO, Yang GAO. Absorption enhancing effects of chitosan oligomers on the intestinal absorption of low molecular weight heparin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014, **466**(1-2), 156-162.
- Y. ZHANG, X. HUANG, B. DUAN, L. WU, S. LI, X. YUAN. Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. *Colloid and Polymer Science*. 2007, **285**(8), 855-863.
- N. R. ZHAO, Y. J. WANG, L. REN, X. F. CHEN. Surface modification of chitosan membranes by oxygen plasma treatment. *Materials Science Forum*. 2009, **610-613**, 1259-1262.
- Y. ZHAO, Y. ZHOU, X. WU, L. WANG, L. XU, S. WEI. A facile method for electrospinning of ag nanoparticles/poly (vinyl alcohol)/carboxymethyl-chitosan nanofibers. *Applied Surface Science*. 2012, **258**(22), 8867-8873.