

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
FAKULTA MECHATRONIKY, INFORMATIKY A MEZIOBOROVÝCH STUDIÍ
ÚSTAV NOVÝCH TECHNOLOGIÍ A APLIKOVANÉ INFORMATIKY



DISERTAČNÍ PRÁCE

**Nanovláknový kryt s konjugovanou kyselinou hyaluronovou pro dopravu léčiv
v hojení ran**

Liberec 2021

Ing. Miroslava Rysová

Disertační práce

Autor: Ing. Miroslava Rysová

Vedoucí práce: doc. Ing. Lenka Martinová, CSc.

Studijní program: P3901 Aplikované vědy v inženýrství

Studijní obor: 3901V055 Aplikované vědy v inženýrství

Adresa:

Technická univerzita v Liberci

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií

Studentská 1402/2

461 17 Liberec 1

Prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci jsem vypracovala samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucí mé disertační práce a konzultantem.

Jsem si vědoma toho, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci. Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má disertační práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů. Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

V Liberci dne 17. prosince 2021

Ing. Miroslava Rysová

.....

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat všem kolegům, přátelům a zejména svojí rodině za jejich pomoc, trpělivost a lásku.

V neposlední řadě děkuji mojí školitelce, doc. Ing. Lence Martinové, CSc. za její vedení, odborné rady a podporu.

Abstrakt

Chronické rány, často spojené s bakteriální kontaminací, představují stále větší problém vzhledem k rozvoji civilizačních a chronických onemocnění, jako je například diabetes mellitus, které jsou často příčinou rozvoje chronické rány a jejich neúspěšná léčba může vést až k amputaci. V současnosti je kladen důraz na hledání nových materiálů pro hojení chronických a kontaminovaných ran. Nanovlákná v tomto ohledu představují zajímavý nanomateriál s řadou unikátních vlastností výhodných pro jejich využití jako krytu rány.

Tato práce se zabývá vývojem nanovláknenného materiálu pro zvýšenou vazbu především hydrofilních kationních antibakteriálně účinných léčiv. Nanovláknenný kryt rány byl připraven elektrostatickým zvlákněním anorganických biodegradabilních nanovláken na bázi oxidu křemičitého. Ta byla následně pro zajištění zvýšené sorpce léčiva povrchově funkcionalizována. Nejdříve byly na povrch silanizací roubovány aminoskupiny, které byly následně využity ke konjugaci kyseliny hyaluronové (HA) prostřednictvím EDC/NHS. V průběhu vývoje nanovláknenného krytu byla optimalizována příprava nanovláknenné vrstvy a studovány podmínky silanizace a konjugace kyseliny hyaluronové pro dosažení vazby co největšího množství na povrch. Nanovláknenný kryt byl následně charakterizován z hlediska biokompatibility a biodegradace. Interakce s léčivem byly ověřeny na modelových léčivech polymyxin B a nisin. Byla prokázána zvýšená vazba těchto léčiv na povrch nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou a jejich prodloužený antibakteriální účinek proti bakteriím *E. coli* a *S. gallinarum*.

Klíčová slova: Křemičitá nanovlákná, kyselina hyaluronová, hojení ran, doprava léčiv, biokompatibilita, biodegradabilita, antibakteriální účinek

Abstract

Chronic wounds, often associated with bacterial contamination, are a growing problem due to the development of civilization and chronic diseases, such as diabetes mellitus, which are often the cause of chronic wound development and their failure can lead to amputation. Currently, the emphasis is on finding new materials for healing chronic and contaminated wounds. In this respect, nanofibers represent an interesting nanomaterial with a number of unique properties advantageous for their use as a wound dressing. This work deals with the development of nanofiber material for increased binding, especially hydrophilic cationic antibacterial drugs. The nanofiber wound dressing was prepared by electrostatic spinning of inorganic biodegradable nanofibers based on silica. The nanofibres were subsequently surface functionalized to ensure increased drug sorption. First, amino groups were grafted onto the surface by silanization, which were then used to conjugate hyaluronic acid (HA) using EDC/NHS. During the development of the nanofiber dressing, the preparation of the nanofiber layer was optimized and the conditions of silanization and conjugation of hyaluronic acid were studied in order to achieve binding of the largest possible amount to the surface. The nanofiber dressing was subsequently characterized in terms of biocompatibility and biodegradation. Drug-nanofibres interactions were verified on the model drugs polymyxin B and nisin. Increased binding of these drugs to the surface of nanofibers with conjugated hyaluronic acid and their prolonged antibacterial effect against *E. coli* and *S. gallinarum* was demonstrated.

Key words: Silica nanofibers, hyaluronic acid, wound healing, drug delivery, cationic drugs, biocompatibility, biodegradation, antibacterial effect.

Obsah

Úvod.....	17
TEORETICKÁ ČÁST	19
1 Hojení ran	19
1.1 Nanomateriály v hojení ran	20
1.1.1 Nanovlákná v hojení ran	22
2 Příprava nanovláken elektrostatickým zvlákňováním	25
2.1 Faktory ovlivňující zvlákňovací proces	26
3 Metoda Sol-Gel.....	27
3.1 Povrchová chemie křemičitých (nano)materiálů	32
3.1.1 Funkcionalizace povrchu křemičitých materiálů	34
3.1.2 Modifikační činidla a jejich vazba.....	35
3.2 Biokompatibilita křemičitých materiálů	41
3.3 Biodegradace.....	42
3.4 Nanovlákná připravená metodou sol-gel	42
3.4.1 Nanovlákná s inkorporovanými anorganickými částicemi.....	43
3.4.2 Nanovlákná s nosným polymerem zapojeným do procesu sol-gel.....	45
3.4.3 Křemičitá nanovlákná připravená metodou sol-gel bez nosného polymeru	
49	
3.4.4 Funkcionalizace křemičitých nanovláken.....	53
4 Kyselina hyaluronová	56
4.1 Struktura kyseliny hyaluronové	56
4.2 Bioaktivita kyseliny hyaluronové	57
4.3 Biomateriály na bázi kyseliny hyaluronové.....	60
4.4 Modifikace kyseliny hyaluronové.....	61
4.4.1 Konjugace kyseliny hyaluronové pro dopravu léčiv	61
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	65

5	Příprava a charakterizace křemičitých nanovláken	66
5.1	Cíle	66
5.2	Materiály a metody	67
5.2.1	Příprava nanovláken	67
5.2.2	Měření viskozity	68
5.2.3	Charakterizace nanovláken	69
5.3	Výsledky a diskuse.....	71
5.3.1	Vliv viskozity a procesních parametrů	71
5.3.2	Vliv podmínek stabilizace na vlastnosti nanovláken.....	79
5.3.3	Shrnutí výsledků	86
6	Konjugace kyseliny hyaluronové a charakterizace.....	87
6.1	Cíle kapitoly	87
6.2	Materiály a metody	88
6.2.1	Příprava nanovláken	88
6.2.2	Silanizace povrchu	88
6.2.3	Konjugace kyseliny hyaluronové.....	88
6.2.4	Charakterizace nanovláken	91
6.2.5	Kvantifikace funkčních skupin	92
6.2.6	Kvantifikace kyseliny hyaluronové	92
6.2.7	Hodnocení biodegradace nanovláken	93
6.2.8	Hodnocení biokompatibility funkcionalizovaných nanovláken	94
6.3	Výsledky a jejich diskuse.....	95
6.3.1	Vliv podmínek na účinnost silanizace	95
6.3.2	Vliv podmínek na konjugace HA	98
6.3.3	Výsledky chemické a povrchové analýzy.....	104
6.3.4	Vliv povrchové funkcionalizace na biodegradabilitu	108
6.3.5	Biokompatibilita funkcionalizovaných nanovláken	111

6.3.6	Shrnutí výsledků	115
7	Hodnocení interakcí nanovláken s modelovými léčivy	115
7.1	Cíle kapitoly	115
7.2	Materiály a metody	116
7.2.1	Volba modelového léčiva	116
7.2.2	Imobilizace léčiva	118
7.2.3	Charakterizace nanovláken po imobilizaci	119
7.2.4	Kinetika uvolňování léčiva	119
7.2.5	Hodnocení antibakteriální účinnosti	121
7.3	Výsledky a jejich diskuse	122
7.3.1	Vliv léčiva na morfologii nanovláken	122
7.3.2	Výsledky chemické analýzy	123
7.3.3	Kinetika uvolňování léčiva	127
7.3.4	Antibakteriální účinnost imobilizovaného léčiva	130
7.3.5	Shrnutí výsledků	133
	Závěr	133
8	Použité zdroje	137
9	Přílohy: Morfologie zvláknovaných nanovláken	158

Seznam obrázků

Obr. 1 Přehled jednotlivých fází hojení akutní rány.....	20
Obr. 2 Nanomateriály pro hojení ran.	21
Obr. 3 Schematický přehled efektů nanovláken při jejich využití jako krytu ran	23
Obr. 4 Přehled možných nanovláknenných struktur a jejich kombinace s léčivem.	24
Obr. 5 Ilustrační schéma jehlového elektrostatického zvlákňování s rotačním kolektorem	26
Obr. 6 Reakční schémata průběhu hydrolýzy a následné kondenzace alkoxidů křemíku katalyzovaných (A) kyselinou a (B) zásadou	29
Obr. 7 Schéma vlivu vybraných reakčních podmínek metody sol-gel.	30
Obr. 8 Schéma vlivu přechodových fází solu na gel na viskozitu, rozměr koloidních nanočástic a možnosti zpracování.....	31
Obr. 9 Možnosti materiálů připravovaných metodou sol-gel.	32
Obr. 10 Povrchové silanoly (A) izolované, (B) vicinální a (C) geminální.....	33
Obr. 11 Příklady silylace povrchu	36
Obr. 12 Příklady různých vazeb a vícevrstvých nepravidelností vznikajících při vazbě 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES).....	37
Obr. 13 Příklady modifikací povrchu různými funkčními skupinami proveditelné silanizací funkčními alkoxysilany.	38
Obr. 14 Příklad využití povrchu sililovaného 3-(glycidyl)propyltrimethoxysilanem ke konjugaci ibuprofenu.	39
Obr. 15 Přehled možností konjugace biomolekul.....	40
Obr. 16 Nanovláknna dopovaná křemičitými nanočásticemi. TEM snímky PLGA/GE orientovaných nanovláken	44
Obr. 17 Nanovláknna SiO ₂ /PVA připravená metodou sol-gel.	46
Obr. 18 Nanovláknna připravená ze směsi TEOS/PVP.....	48
Obr. 19 Vliv viskozity na morfologii čistě křemičitých nanovláken připravených jehlovým elektrostatickým zvlákňováním.	50
Obr. 20 Schéma různých struktur organosilanů a struktur z nich vytvořených.....	51
Obr. 21 Organosilanová nanovláknna připravená elektrostatickým zvlákňováním.....	52
Obr. 22 Křemičitá nanovláknna povrchově funkcionalizovaná různými metodami.	55
Obr. 23 Struktura dvou disacharidových jednotek kyseliny hyaluronové.....	56
Obr. 24 Příklady struktur konjugátů HA a léčiva paclitaxel s různou délkou linkeru...	62

Obr. 25 Příklady amidačních konjugací kyseliny hyaluronové.....	64
Obr. 26 Schéma vlivů jednotlivých parametrů při výběru substrátu pro další konjugaci.	66
Obr. 27 Schémata zařízení využitých pro přípravu křemičitých nanovláken.....	68
Obr. 28 Vývoj viskozity solu připraveného metodou sol-gel v čase	71
Obr. 29 Morfologie nanovláken připravených na laboratorní aparatuře vybavené tyč. elektrodou.	74
Obr. 30 Grafické porovnání průměrů nanovláken připravených na laboratorní aparatuře	75
Obr. 31 Morfologie nanovláken připravených na zařízení Nanospider NS 1W500U....	76
Obr. 32 Grafické vyhodnocení a srovnání průměrů nanovláken připravených na zařízení Nanospider.	77
Obr. 33 Morfologie nanovláken připravených na zařízení Nanospider NS 1W500U vybaveném drátovou elektrodou.....	77
Obr. 34 3D grafy kombinovaného vlivu vybraných parametrů zvlákňování.	78
Obr. 35 Vizuální hodnocení vlivu tepelné stabilizace na barvu a makroskopický vzhled křemičitých nanovláken.	80
Obr. 36 Vliv tepelné úpravy na morfologii nanovláken.	80
Obr. 37 Grafické srovnání vlivu tepelné úpravy na průměr nanovláken.....	81
Obr. 38 Výsledky termogravimetrické analýzy (TGA) křemičitých nanovláken	82
Obr. 39 FTIR spektra křemičitých nanovláken upravených při různých teplotách.....	85
Obr. 40 Biokompatibilita nanovláken stabilizovaných při různých teplotách.....	86
Obr. 41 Reakční schéma znázorňující kroky vedoucích ke kovalentní vazbě HA na substrát obsahující primární aminoskupiny.	90
Obr. 42 Kalibrační křivky pro kvantifikaci	93
Obr. 43 Účinnost silanizace povrchu nanovláken v závislosti na (A) podmínkách procesu a (B) podmínkách skladování.....	97
Obr. 44 Morfologie nanovláken po silanizaci	97
Obr. 45 Vliv podmínek na konjugaci HA.....	101
Obr. 46 SEM snímky nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou.....	103
Obr. 47 FTIR spektra křemičitých nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou.	106
Obr. 48 FTIR spektra křemičitých nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou.	107

Obr. 49 Vliv funkcionalizace křemičitých nanovláken na smáčivost povrchu.	108
Obr. 50 Průběh degradace neupravených a funkcionalizovaných nanovláken v STT.	110
Obr. 51 Vývoj morfologie nanovláken v průběhu degradace v simulovaných podmínkách.....	111
Obr. 52 Biokompatibilita funkcionalizovaných nanovláken.	112
Obr. 53 Kolonizace funkcionalizovaných nanovláken buňkami 3T3.....	113
Obr. 54 Buňky adherované na povrchu (A) neupravených nanovláken a (B) nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou.	114
Obr. 55 Detailní pohled (SEM) na buňky 3T3 proliferující na povrchu nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou.....	114
Obr. 56 Chemická struktura (A) polymyxinu B a (B) nisinu	118
Obr. 57 Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace nisinu metodou BCA.	121
Obr. 58 Vzhled křemičitých nanovláken po imobilizaci léčiva z 0.5% roztoku.	123
Obr. 59 Vliv imobilizace léčiva včetně kapilární frakce na morfologii a porozitu nanovláčenné vrstvy.	123
Obr. 60 FTIR spektra křemičitých nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou a imobilizovaný léčivý polymyxin B a nisin.	125
Obr. 61 Srovnání FTIR spekter silanizovaných a HA konjugovaných křemičitých nanovláken s imobilizovaným polymyxinem B.	126
Obr. 62 Křivky kinetiky uvolňování nisinu.	128
Obr. 63 Křivky kinetiky uvolňování polymyxinu B.....	129
Obr. 64 Vliv povrchové funkčnosti a koncentraci imobilizačního roztoku na antibakteriální účinnost nanovláken.	130
Obr. 65 Vliv mechanismu vazby léčiva na antibakteriální účinnost nanovláken.....	131
Obr. 66 Antibakteriální účinnost nanovláken s imobilizovaným Polymyxinem B.	132
Obr. 67 Vývoj antibakteriální aktivity nanovláken v čase. Hodnoceno léčivo vázané na povrch bez kapilární frakce. Imobilizace z 0.1% roztoku.	132

Seznam tabulek

Tab. 1 Vliv vybraných parametrů zvlákňování na morfologii připravovaných nanovláken	27
Tab. 2 Hodnoty silanolového čísla a stupně pokrytí povrchu.....	34
Tab. 3 Závislost kalkulovaného specifického povrchu nanovláken na průměru nanovláken	79
Tab. 4 MRM přechody, declusterační potenciály a kolizní energie použité pro stanovení polymyxinu B.	120

Seznam použitých zkratk

3T3-A31	myší fibroblasty
APTES	3-aminopropyltriethoxysilan
APTMS	3-aminopropyltrimethoxysilan
BCA	bicinchoninová kyselina, metoda
BPTCS	3-bromopropyl-trichlorosilan
CMPI	2-chloro-1-methylpyridium iodid
CPTES	chloropropyltriethoxysilan
CS	chitosan
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
CVD	chemická depozice par
d	průměr nanovláken, výseče
DCC	dicyclohexylcarbodiimid
DIOC ₆	3,3'-Dihexyloxacarboyanine iodid
DMAP	dimethylaminopyridin
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DOX	doxorubicin
E.C.	Escherichia Coli
ECM	extracelulární hmota
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	fetální bovinní sérum
FITC	fluorescein isothiokyanát
FTIR	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
FWHM	full width at half maximum
GE	želatina
GFP	zelený fluorescenční protein
HA	kyselina hyaluronová
HA-COOH	karboxyl na kyselině hyaluronové

HAp	hydroxyapatit
H-NCD	vodíkem terminovaná nanokrystalinní diamantová vrstva
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou
IPA	isopropylalkohol
k_h	kinetická konstanta
LC/MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MES	methyلسalicylát
MMPs	metaloproteinázy
MRSA	methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus
MSNPS	mezoporézní křemičité nanočástice
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
M_w	molekulová hmotnost
n	počet
NADPH	fagocytické buňky
NBCS	novorozenecké telecí sérum
NCD	nanokrystalinní diamantová vrstva
NHS	N-hydroxysuccinimid
NIS	nisin
NPs	nanočástice
NFs	nanovlákná
O-NCD	kyslíkem terminovaná nanokrystalinní diamantová vrstva
P123	PEO-PPO-PEO
PAN	polyakrylonitril
PBS	fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
PEO	polyethylenoxid
PHBV	polyhydroxybutyrát-valerát
P_k	disociačních konstanta
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové

Poly B	polymyxin B
Ppy	polypyrrol
PVA	polyvinylalkohol
PVB	polyvinylbutyral
PVP	polyvinylpyrolidon
R.T.	pokožová teplota
ROS	reaktivní kyslíkové částice
S.D.	směrodatná odchylka
S.G.	Staphylococcus Gallinarum
SA	syntetický vzduch
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
Si-HA	křemičitá nanovlákná s kyselinou hyaluronovou (zkráceně)
Si-NH ₂	křemičitá nanovlákná se silanizovaným povrchem (zkráceně)
SiO ₂ -HA	křemičitá nanovlákná s kyselinou hyaluronovou
SiO ₂ -NH ₂	křemičitá nanovlákná se silanizovaným povrchem
SiO _x , SiO ₂	materiály na bázi křemíku
SNPs	neporézní křemičité nanočástice
STT	simulovaná tělní tekutina
sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimid
TBO	toluidinová modř O
TEOS	tetraethoxysilan
TGA	Termogravimetrická analýza
TMOS	tetramethoxysilan
TRIS	trisaminomethan
TSA	trypton sójový agar
TSB	trypton sójový bujón
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie

Úvod

Zvyšující se incidence chronických ran v populaci související s nárůstem výskytu civilizačních chorob, jako jsou ateroskleróza, diabetes mellitus či chronická žilní insuficience, a s ní související zvyšující se náklady na léčbu pacientů, vedly v posledním desetiletí nejen k hledání nových léčiv, ale i hledání nových účinných systémů pro řízenou dopravu a uvolňování léčiv [1, 2]. Při volbě materiálu pro konstrukci krytu ran se zvažuje nejen požadovaná stabilita nanovláken, ale také konkrétní požadavky kladené na materiál v souvislosti se stavem rány, fází hojení, přítomnosti infekce a složením infekce. Všechny tyto parametry ovlivňují volbu materiálového složení a struktury krytu.

Nanovlákná představují velmi zajímavý materiál pro využití v hojení ran. Specifický povrch dostupný na jejich povrchu může být využit pro vazbu léčiva, zatímco jejich struktura poskytuje ráně ochranu a při zachování výměny plynů s okolním prostředím. Chování nanovláken v ráně je potom dáno především jejich materiálovým složením. To ovlivňuje jejich degradabilitu, biokompatibilitu a bioaktivitu. V průběhu let bylo úspěšně zvlákněno několik stovek syntetických i přírodních polymerů a jejich směsí, z nichž pouze část byla studována z hlediska možného využití v dopravě léčiv pro kontrolu infekce v hojení ran. Pro tento účel byla nanovlákná různě funkcionalizována především antibakteriálními ionty a nanočásticemi, antiseptiky, antibiotiky, ale i přírodními extrakty. Kinetika uvolňování těchto látek přitom závisí jednak na složení nanovláken, vlastnostech léčiva, ale také na způsobu jeho vazby do nanovláken nebo na jejich povrch [2, 3, 4, 5, 6, 7].

Z hlediska materiálového složení představují unikátní materiál nanočástice a nanovlákná na bázi oxidu křemičitého připravená metodou sol-gel. Degradace těchto nanomateriálů vede k uvolňování křemíku jako biogenního prvku podporujícího hojení ran [8]. Zároveň poskytují tyto nanomateriály široké možnosti z hlediska povrchové funkcionalizace, která umožňuje řídit vazbu aktivních molekul a jejich následné uvolňování [9, 10]. Tyto vlastnosti byly prozatím popisovány především u nanočástic. Křemičitá nanovlákná a možnosti jejich povrchových modifikací jsou prozatím málo prostudovány, ačkoli v současné době zaznamenávají velký rozvoj díky novým metodám přípravy [11, 12].

Materiálem s vysokým potenciálem pro využití v hojení ran a dopravě léčiv je také kyselina hyaluronová, a to především díky jejím unikátním vlastnostem, vysoké bioaktivitě [13, 14] a schopnosti stimulovat prostředí rány. Její silně hydrofilní, záporně nabitě molekuly jsou schopny tvořit komplexy s léčivými a je hodně využívána také k tvorbě konjugátů s léčivými. Právě díky těmto vlastnostem je často využívána jako nosič v dopravě léčiv [15, 16, 17], kde může být kombinována s dalšími materiály pro zajištění požadovaných vlastností a optimální vazby a profilu uvolňování léčiva.

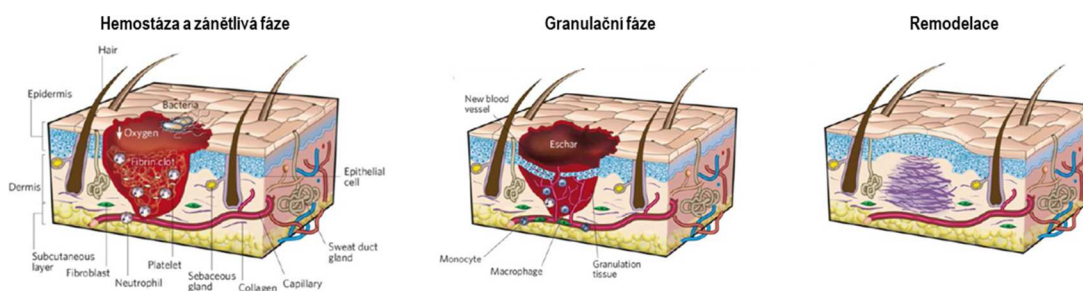
Zatímco u hydrofobních léčiv se konjugace na nanomateriály využívá ke zlepšení biodostupnosti [18, 19, 20], u silně hydrofilních léčiv je inkorporace do nanomateriálů nebo vazba na jejich povrch prováděna pro zajištění jejich stability a zabránění odplavení léčiva. [21, 22]. Toto platí především u lokální aplikace léčiv.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Hojení ran

Hojení ran představuje komplexní proces zahrnující sekvenci dějů, která je zahájena v okamžiku vzniku poranění. Tento proces zahrnuje migraci a aktivitu několika buněčných typů, růstových faktorů a cytokinů. Ty jsou zapojeny do jednotlivých fází procesu hojení, které na sebe vzájemně navazují a částečně se překrývají. Jsou jimi (i) hemostáza a zánět (někdy také rozdělovány na dvě samostatné fáze hojení, [3]), (ii) buněčná proliferace a formování nové tkáně a (iii) remodelace tkáně. K hemostáze dochází okamžitě po vzniku poranění. Jejím primárním účelem je zastavení krvácení, což je docíleno stažením cévy (vasokonstrikce), agregací krevních destiček a koagulací krve. Následně vznikající fibrinová síť má za úkol uzavřít poškozené cévy, zabránit vstupu patogenů do krevního řečiště a poskytnout podporu jako dočasná extracelulární hmota (ECM) pro migraci a proliferaci buněk. Infiltrace buněk – neutrofilů, monocytů a lymfocytů, je podporována růstovými faktory uvolňovanými aktivovanými destičkami a vede k zahájení zánětlivé fáze, která trvá až šest dní. V ní dochází k diferenciaci monocytů na makrofágy produkující cytokiny lákající další prozánětlivě aktivní buňky. Zánětlivá fáze je také ukončena aktivitou makrofágů, které vyvolají apoptózu zánětlivých buněk, vyčistí oblast rány od jejich zbytků, čímž dochází ke zmírnění zánětu a je zahájena granulační fáze. Na granulační fázi, také označované jako proliferací, se podílejí zejména fibroblasty, keratinocyty a epiteliální buňky. Proliferující fibroblasty produkují hlavní složky extracelulární hmoty – glykoproteiny a proteiny – zejména kolagen typu III jako náhradu poškozené ECM. Dále dochází k formování nového cévního zasítní (angiogeneze) nezbytného pro zásobování kyslíkem, živinami a růstovými faktory nutnými pro udržení produkce nové tkáně. Rána je vyplňována granulační tkání skládající se z nové ECM a cév a uzavírá se zejména kontrakcí vyvolanou působením fibroblastů. Z okrajů rány zároveň migrují keratinocyty, které ránu izolují od vnějšího prostředí. Tento proces trvá v rozmezí dvou až tří týdnů. Následující remodelační fáze je nejdelší a může trvat až dva roky, v závislosti a hloubce rány. V jejím průběhu krevní destičky a makrofágy stimulují prostřednictvím TGF- β a cytokinů, jejichž úplný přehled poskytují Barrientos et al. [23], diferenciaci fibroblastů na myofibroblasty. Dochází ke kontrakci rány rychlostí 10 – 20 μm za den a tvorbě jizvy. Snižuje se počet buněk i hustota cévního zasítní.

Zvyšuje se podíl kolagenu v tkáni, což vede ke zvyšování pevnosti, která ovšem nepřesahuje 80% pevnosti tkáně nepoškozené [3, 4, 24].



Obr. 1 Přehled jednotlivých fází hojení akutní rány.
[4]

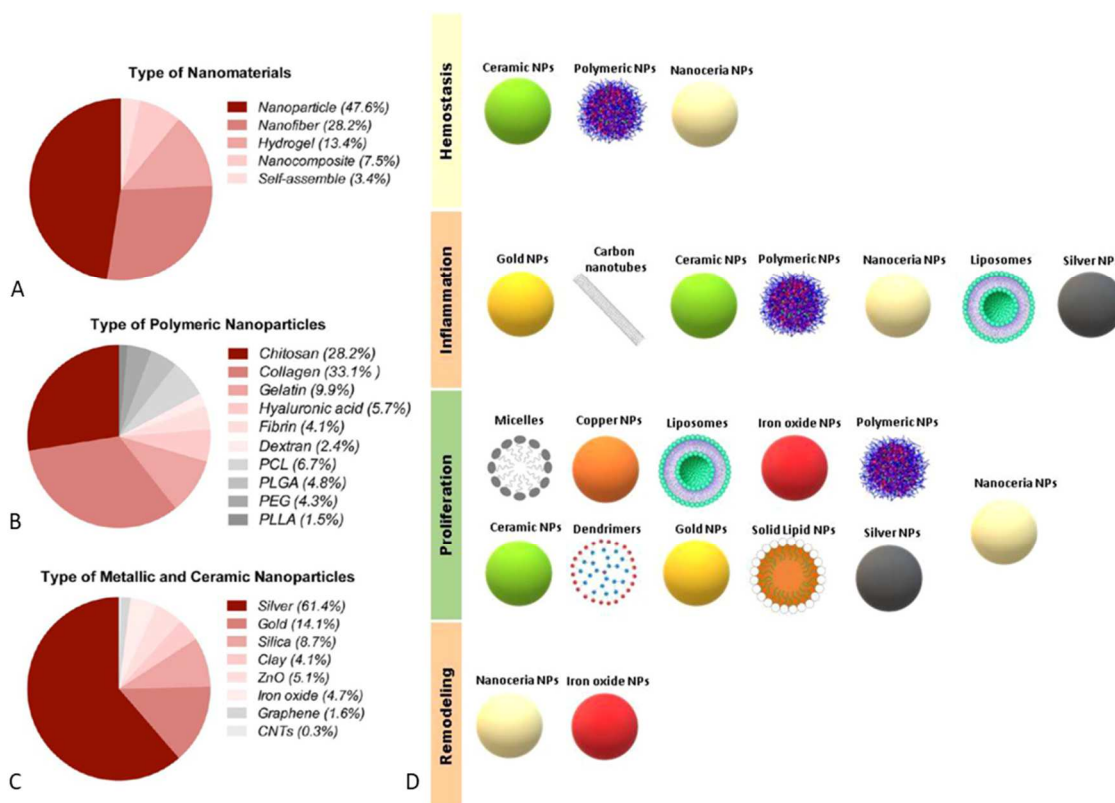
Trvání jednotlivých fází je závislé také na kategorii rány. V případě popálenin může, na rozdíl od řezných poranění, být prodloužen samotný proces vzniku rány a počáteční fáze hojení díky vzniku a odstraňování puchýřů nebo dokonce nekrotické tkáně [25].

Velice specifický případ představují rány chronické – tedy rány s narušeným procesem hojení, které ani při adekvátní terapii nevykazují tendenci k hojení. Na rozdíl od ran akutních u nich dochází k zastavení v zánětlivé fázi. Zvýšené hladiny metaloproteináz (MMPs) vedou k degradaci mezibuněčné hmoty a některých růstových faktorů. U chronický ran bývá také narušena funkce a migrace fibroblastů až o 75 %. Dochází k narušení antioxidační kapacity a zvyšování koncentrace reaktivních kyslíkových částic (ROS) v ráně. Tyto děje bývají často spojeny s bakteriální kontaminací rány a/nebo chronickým onemocněním, nejčastěji diabetem. Mezi nejčastěji se vyskytující chronické rány se řadí bércevé vředy venózní etimologie, arteriální kožní vředy, dekubity, neuropatické kožní vředy a kožní vředy v terénu lymfedénu. Jedná se o život ohrožující stavy, často spojené s bakteriální infekcí, které mohou vést až k amputaci či sepsi. Volba vhodné metody či kombinace metod umožňující obnovu procesu hojení a uzavření kožního krytu je tedy nezbytná [24, 25, 26, 27, 28].

1.1 Nanomateriály v hojení ran

Vzhledem ke zvyšující se incidenci chronických ran v populaci je v současné době pozornost zaměřená na hledání nových metod léčby a materiálů k ní využitelných. Celá řada nanomateriálů byla testována pro využití v této oblasti. Různé nanomateriály,

jejichž přehled uvádí obrázek 2, byly testovány jako nosiče léčiv a aktivních látek do prostoru rány, antibakteriálních činidel, ale i jako stimulanty buněčné proliferace, diferenciaci a exprese.



Obr. 2 Nanomateriály pro hojení ran.

Procentuální zastoupení nanomateriálů testovaných pro využití v hojení ran a publikovaných v odborných časopisech mezi lety 1990 a 2016. Dělení dle (A) typu nanomateriálu, (B) složení polymerních nanočástic a (C) složení kovových a keramických nanočástic. (Data získána z Web of Science k březnu 2016). D. Schematické rozdělení nanomateriálů aplikovatelných v hojení ran v závislosti na stavu fázi hojení [4, 5].

Vzhledem k významu potlačení bakteriální kontaminace a jí způsobené proteolýzy, byly široce studovány různé typy antibakteriálních nanočástic a nanomateriálů dopovaných nebo konjugovaných s léčivými. Pravděpodobně nejvíce byly v tomto ohledu studovány +nanočástice stříbra (Ag NPs), u nichž byla potvrzena antibakteriální účinnost a schopnost podporovat diferenciaci fibroblastů a motilitu keratinocytů. Jejich nevýhodou je však jejich potenciální toxicita a vyvolávání ROS stresu. Celá řada dalších typů (nano)materiálů byla studována z hlediska biokompatibility, bioaktivity a možného synergického efektu s dalšími terapeutiky. Je tedy patrné, že volba nejen léčiva a struktury dopravního systému, ale i jeho materiálové složení má významný vliv a může

ovlivňovat vybrané buněčné procesy a vybrané fáze hojení. Například u nanočástic ZnO byl potvrzen proangiogenní, protizánětlivý účinek a schopnost podporovat reepitelizaci. U nanočástic CeO₂ byl potvrzen proangiogenní a antioxidační účinek [2, 6, 7, 29].

Jako jeden z nejuniverzálnějších materiálů jsou označovány keramické částice, jak ukazuje schéma na obr. 2B, z nichž nejpočetnější skupinu tvoří nanočástice křemíku (SiO₂ NPs). U nich byla popsána aplikovatelnost ve fázi hemostáze, zánětlivé, proliferační. Jejich nespornou výhodou jsou možnosti tvorby různých tvarů včetně mezoporézních nanočástic s vysokým měrným povrchem umožňujícím enkapsulaci nebo kovalentní vazbu léčiva. Jejich degradací jsou do rány uvolňovány ionty křemíku, u nichž byl potvrzen pozitivní vliv na hojení ran, podpora angiogeneze a produkce kolagenu i reepitelizace [2, 5, 30, 31, 8].

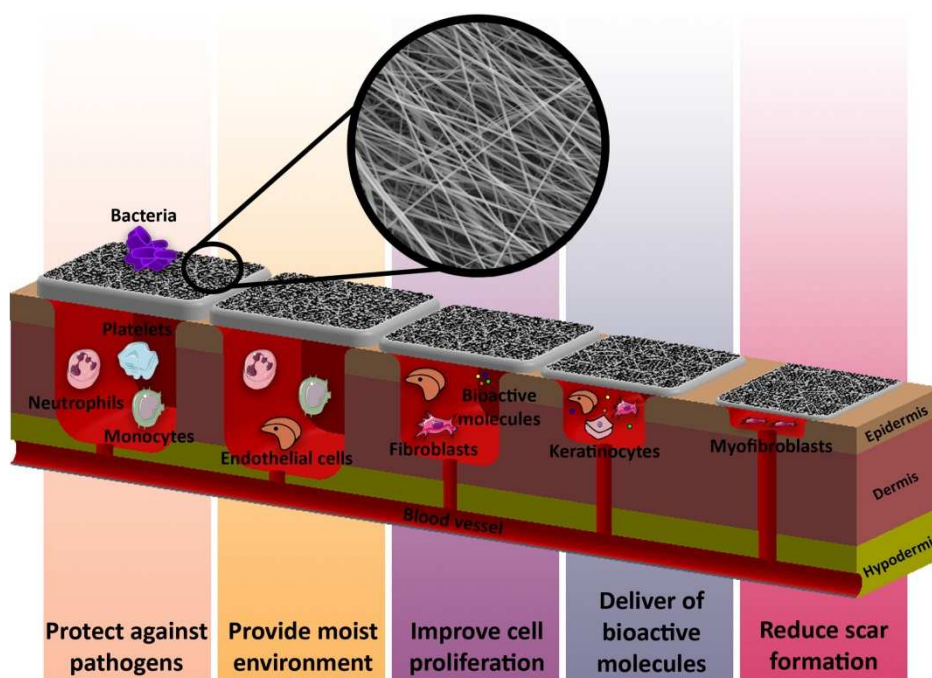
Podpora buněčné proliferace, angiogeneze a produkce kolagenu byla potvrzena například také u nanomateriálů obsahujících kyselinu hyaluronovou [4]. Ty jsou navíc schopny upravovat pH prostředí rány ovlivňující například proteolytickou aktivitu u kontaminovaných chronických ran [32].

Kromě uvedených příkladů byla pro využití v hojení ran zkoumána celá řada polymerních a anorganických nanomateriálů, dendrimerů, liposomů a dalších. Jejich ucelený přehled poskytují například Blanco-Fernandez et al. [2], Parani et al. [4], Barroso et al. [5], Naskar a Kim [6], Mikai et al. [7] a Wang et al. [33].

1.1.1 Nanovláknna v hojení ran

Nanovláknna tvoří mezi nanomateriály vyvíjenými pro účely hojení ran unikátní skupinu vynikající svými vlastnostmi. Jejich vysoký měrný povrch v kombinaci s vysokou porozitou a nízkými rozměry pórů umožňuje jejich využití nejen jako nosiče léčiv pro uvolnění *in situ*, ale i jako krytu rány. Nanovláknna kombinují schopnost nanomateriálů zlepšovat biodostupnost léčiva a strukturu vyhovující všeobecným požadavkům kladeným na konvenční i tzv. funkční a bioaktivní kryty ran. Ty musejí být biokompatibilní, nealergenní, vykazovat nízkou adhezi ke spodině rány, která umožňuje odstranění krytu bez jeho poškození a podporovat vlhké hojení. V případě funkčních a bioaktivních krytů jsou tyto požadavky rozšířeny ještě o schopnost odvodu exudátu z rány, umožnění výměny plynů s vnějším prostředím a bariélní funkce chránící

prostředí rány před infiltrací mikroorganismů a vnějšími fyzikálními a chemickými vlivy – tedy dočasné nahrazení funkce nepoškozené kůže. Kromě toho by takový kryt měl být schopen aktivně podporovat proces hojení regulací buněčné adheze, proliferace a diferenciaci. Nanovláknenné kryty tyto požadavky splňují. Kromě toho je jako jejich výhoda v regeneraci tkání uváděna strukturní podobnost s ECM, což vede k podpoře buněčného růstu. Kromě toho je nanovláknenným krytům přisuzována schopnost redukce formování jizev. Přehled jejich účinků je uveden na obrázku 3 [25, 2, 34].



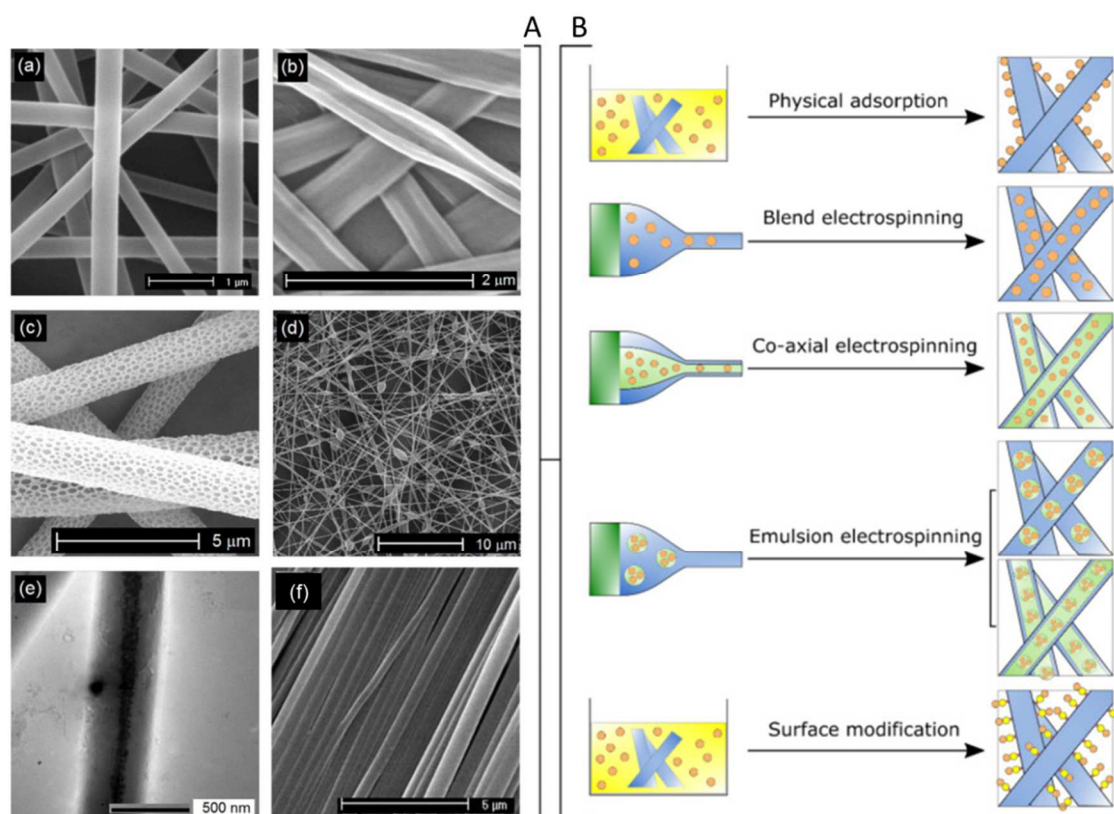
Obr. 3 Schematický přehled efektů nanovláken při jejich využití jako krytu ran [35].

Regulace konkrétních buněčných dějů je možná prostřednictvím modifikace složení nanovláken a jejich funkcionalizace léčivy či bioaktivními látkami. Z hlediska složení bylo popsáno široké spektrum nanovláknenných krytů na bázi syntetických polymerů jako kyseliny polymléčné (PLA) [36, 37, 38], polykaprolaktonu (PCL) [39, 40], nebo polyhydroxybutyrátu-valerátu (PHBV) [41, 42], polymerů přírodních jako je chitosan [34, 43, 44], hedvábný fibroin (silk fibroin, SF) [2, 45] nebo kyselina hyaluronová [34, 46].

Tyto materiály mohou být připravovány v čisté podobě nebo ve směsi různými metodami, z nichž nejčastěji využíváné je elektrostatické zvláknění.

Cílem přípravy směsných nanovláken je dosažení kombinace vlastností jednotlivých polymerů z hlediska pevnosti a pružnosti, stability ve vodném prostředí a bioaktivity. Přehled různých materiálů a jejich kombinací využívaných k přípravě nanovláken pro hojení ran poskytují [42, 35, 47].

Nanovlákná různých polymerů mohou být připravována s různou povrchovou strukturou, což většinou vede ke zvyšování dostupného měrného povrchu a modifikaci buněčné adheze [35]. Možnosti různých nanovláknenných struktur jsou na obrázku 4A.



Obr. 4 Přehled možných nanovláknenných struktur a jejich kombinace s léčivem. (A) Struktura nanovláken a-hladká, b- stužková, c-porézní, d- s korálovými defekty, e- jádro/plášť, f- orientovaná. (B) Možné způsoby inkorporace léčiv/bioaktivních látek do těchto nanovláken [42].

Příprava nanovláken metodou elektrostatického zvlákňování umožňuje také přípravu vícevrstevných nanovláknenných materiálů s odlišnou strukturou a/nebo složením jednotlivých vrstev. Tyto materiály potom vykazují odlišné vlastnosti na vnější a vnitřní straně [48, 49].

Nespornou výhodou nanovláken, zejména těch připravovaných metodou elektrostatického zvlákňování, je široký výběr způsobu inkorporace léčiv. Inkorporace

léčiva do hmoty nanovláken, kdy je léčivo distribuováno v celém průřezu nanovlákná, jeho jádře nebo plášti, vede k pomalejšímu uvolňování. Podmínkou zapracování je však vzájemná kompatibilita a mísitelnost polymerního léčiva a roztoku. Povrchové úpravy zahrnují fyzikální adsorpci, elektrostatickou a kovalentní vazbu na povrch. Tyto metody vazby se využívají při nutnosti zrychleného uvolňování nebo při vazbě katalytických látek na povrch [42, 35]. Schématické rozložení možností inkorporace léčiva ukazuje obrázek 4B.

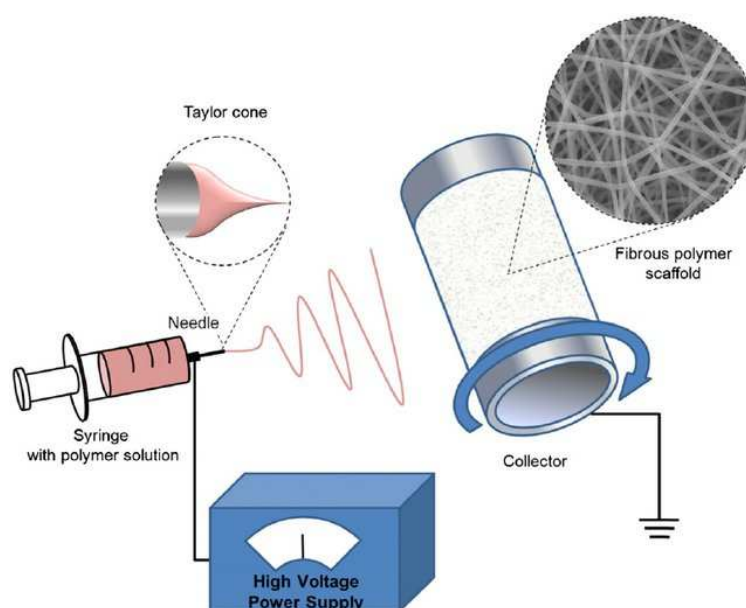
Je známa řada léčiv úspěšně inkorporovaných do nanovláken. Vzhledem k významu potlačení bakteriální kontaminace u chronických ran tvoří většinu antibakteriálně účinné látky. Byla úspěšně popsána inkorporace nanočástic stříbra [35, 50, 51, 52] a antibiotik jako tetracyklin [35, 53], nebo ampicilin [35, 54] i přírodních látek nebo extraktů [35, 55, 56] a antibakteriálních proteinů [57, 58]. Pro podporu hojení potom byly úspěšně inkorporovány nebo vázány na povrch růstové faktory [35, 59, 60, 61]. Obsáhlý výčet kombinací krytů ran a aktivních látek uvádějí Iacob et al. [34], Azimi et al. [42] a Miguel et al. [35]. Několik z těchto nanovláknenných krytů již prošlo nebo v současnosti prochází klinickým hodnocením [47].

2 Příprava nanovláken elektrostatickým zvlákňováním

Jednou z nejčastěji využívaných metod výroby nanovláken je elektrostatické zvlákňování. Ačkoli první patent týkající se této metody byl podán Formhalsem již roku 1934, k rozvoji metody došlo až v 90. letech 20 [62].

Jedná se o způsob přípravy ultra jemných vláken, s průměrem většinou v submikronovém měřítku, která jsou formována z polymerního roztoku nebo polymerní taveniny působením elektrostatických a kapilárních sil. Samotný procesu elektrostatického zvlákňování je založen na působení vysokého napětí vedoucího k vytvoření elektricky nabitého proudu polymerního roztoku nebo taveniny. Častěji jsou touto metodou však zpracovávány polymerní roztoky. Zvlákňovací roztok je v přímém kontaktu s elektrodou připojenou ke zdroji vysokého napětí. Protielektroda, označovaná jako kolektor, je uzemněna nebo opačně nabitá. Při vystavení vysokému napětí se formuje elektrostatické pole, které formuje elektricky nabitý proud polymerního roztoku (či taveniny), který je vypuzen z kapiláry. S rostoucí intenzitou elektrického pole, se

kulovitý tvar kapaliny na hrotu kapiláry prodlouží a vzniká kónický tvar označovaný jako Taylorův kužel, který je následkem relaxace indukovaného náboje na volném povrchu kapaliny na výstupu ze zvlákňovací kapiláry. Během fáze letu kapalinové trysky, která je označována jako bičující nestabilita se polymerní proud postupně enormně napíná a dochází k odparu rozpouštědla a vytvoření ultrajemných vláken. Ta jsou při pohybu k uzemněné protielektrodě (kolektoru) ukládána přímo na něj, nebo na pomocný podkladový materiál umístěný na jeho povrchu. Schéma základního laboratorního zařízení vybaveného jehlovou elektrodou je na obrázku 5. V současnosti existuje řada modifikací tohoto procesu, které umožňují zvýšení výrobnosti procesu nebo manipulaci s morfologií tvořených nanovláken. Té je dosahováno například využitím bezjehlového zvlákňování, speciálních tvarů elektrod nebo profilovaného nebo rotujícího kolektoru. Ty umožňují například tvorbu trojrozměrných nanovláknenných struktur nebo umožňují formovat nikoli náhodně ale stejnosměrně orientovaných nanovláken. Pro všechny tyto varianty však platí stejné faktory, které mohou dále ovlivňovat proces elektrostatického zvlákňování a kvalitu a morfologii připravovaných nanovláken [62, 63, 64].



Obr. 5 Ilustrační schéma jehlového elektrostatického zvlákňování s rotačním kolektorem [65].

2.1 Faktory ovlivňující zvlákňovací proces

Faktory ovlivňující elektrostatické zvlákňování a vlastnosti a kvalitu výsledné nanovláknenné vrstvy jsou nejčastěji rozdělovány na procesní a systémové parametry.

Procesními parametry jsou intenzita elektrického pole a tedy aplikované elektrické napětí, vzdálenost zvláknovací elektrody a kolektoru a rychlost dávkování polymerního roztoku nebo taveniny. Do procesních parametry jsou zahrnuty také klimatické podmínky (teplota, vlhkost). Jako systémové parametry se označují vlastnosti zvláknovaného materiálu, jako jsou molekulová hmotnost polymeru, koncentrace a složení polymerního roztoku (ovlivňující zejména povrchové napětí a vodivost), viskozita, teplota zvláknění (taveniny) a přídavek aditiv. Ačkoli platí všeobecné závislosti mezi jednotlivými parametry a morfologií formovaných nanovláken, jsou odlišné pro každý polymer. Všeobecně popisované trendy vlivů vybraných parametrů na průměr a morfologii nanovláken jsou uvedeny v tabulce 1. Každý nový zvláknovaný polymer nebo jejich směs proto vyžadují jejich optimalizaci [63, 66].

Tab. 1 Vliv vybraných parametrů zvláknování na morfologii připravovaných nanovláken [66].

Parametr	Efekt na morfologii vláken
aplikované napětí ↑	průměr vláken nejprve ↓, potom ↑ (ne monotónně)
průtok kapilárou ↑	průměr vláken ↑ (korálkové efekty se projeví v případě příliš vysokého průtoku)
vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem ↑	průměr vláken ↓ (kolákové efekty se objeví v případě, že je vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem příliš krátká)
koncentrace polymeru (viskozita) ↑	průměr vláken ↑ (v optimálním rozsahu)
vodivost roztoku ↑	průměr vláken ↓ (velký rozsah průměrů)
těkavost rozpouštědla ↑	vlákna vykazují mikrotexuru (póry/nerovnosti na povrchu, které vedou ke zvyšování měrného povrchu)

3 Metoda Sol-Gel

Metoda sol-gel umožňuje přípravu anorganických a hybridních materiálů na bázi kovů (či polokovů) – Al, Si, Ti, Zr a dalších [67, 68, 69]. Tato metoda je využívána již od 19. století, přičemž významný posun zaznamenala až v 2. polovině 20. století. V roce 1968, kdy Werner Stöber a jeho tým popsali amoniakem katalyzovanou hydrolyzu umožňující kontrolu morfologie a velikosti formovaných částic. Tento objev umožnil další rozvoj metody sol-gel a tvorbu dispergovaných částic, nanočástic a dalších materiálů jí připravených. Z těch jsou v dnešní době nejvíce studovány nanomateriály na bázi

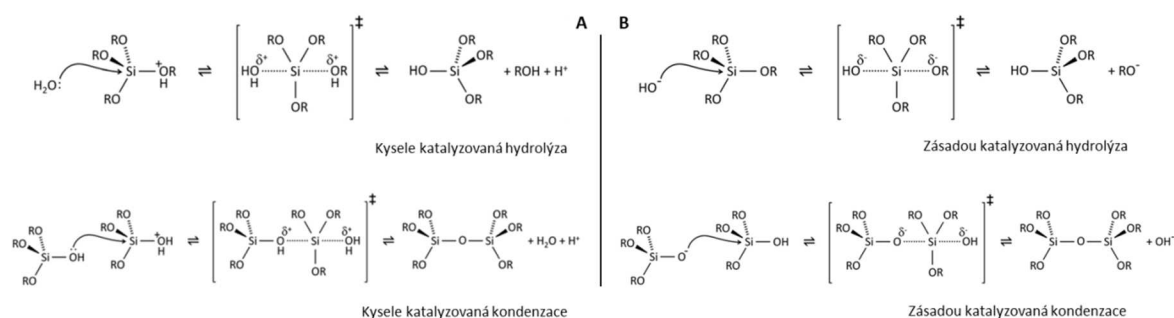
křemíku a to zejména díky jejich využitelnosti v medicíně a dopravě léčiv [70]. Metoda sol-gel všeobecně označuje skupinu postupů přípravy skelných, skelně krystalických nebo krystalických materiálů, jejichž společným znakem je homogenizace výchozích složek ve formě roztoku. Kratší polymerní řetězce a oligomerní jednotky a primární nanočástice a následně procházejí formováním koloidní suspenze (solu) a gelací solu, kdy se vytváří prostorová porézní síť ve spojitě kapalně fázi (gel). V závislosti na použitých výchozích surovinách se rozlišují dvě základní skupiny sol-gel postupů vycházejících ze zpracování ve vodném nebo bezvodém prostředí a využívajících různé typy nízkomolekulárních prekurzorů reakce [67, 68, 71]. V současnosti nejvyužívanější je metoda založená na reakci alkoxidů. U materiálů na bázi křemíku jsou to tedy reakce využívající alkoxidy křemíku nebo alkoxyasilany, kdy se finální struktura skládá z anorganických polymerů provázaných pevnou siloxanovou vazbou. Jako prekurzory se nejčastěji používají tetraethoxysilan (tetraethylorthosilikát, TEOS) a tetramethoxysilan (tetramethylorthosilikát, TMOS).

Tato metoda zahrnuje několik kroků:

- i) syntézu solu hydrolyzou a částečnou kondenzací molekul alkoxidu, či alkoxyasilanu;
- ii) formování gelu prostřednictvím polykondenzace za vzniku siloxanové vazby;
- iii) synerezi nebo „stárnutí“ gelu, kdy pokračuje kondenzace vnitřní struktury gelu, často vedoucí k jeho srážení a vypuzení rozpouštědla;
- iv) sušení gelu a formování buď hutného xerogelu po zhroucení porézní struktury nebo aerogelu za použití např. superkritického sušení;
- v) odstranění povrchových silanolových skupin Si-OH, kalcifikací při teplotách do 800 °C (pokud je vyžadováno) [72].

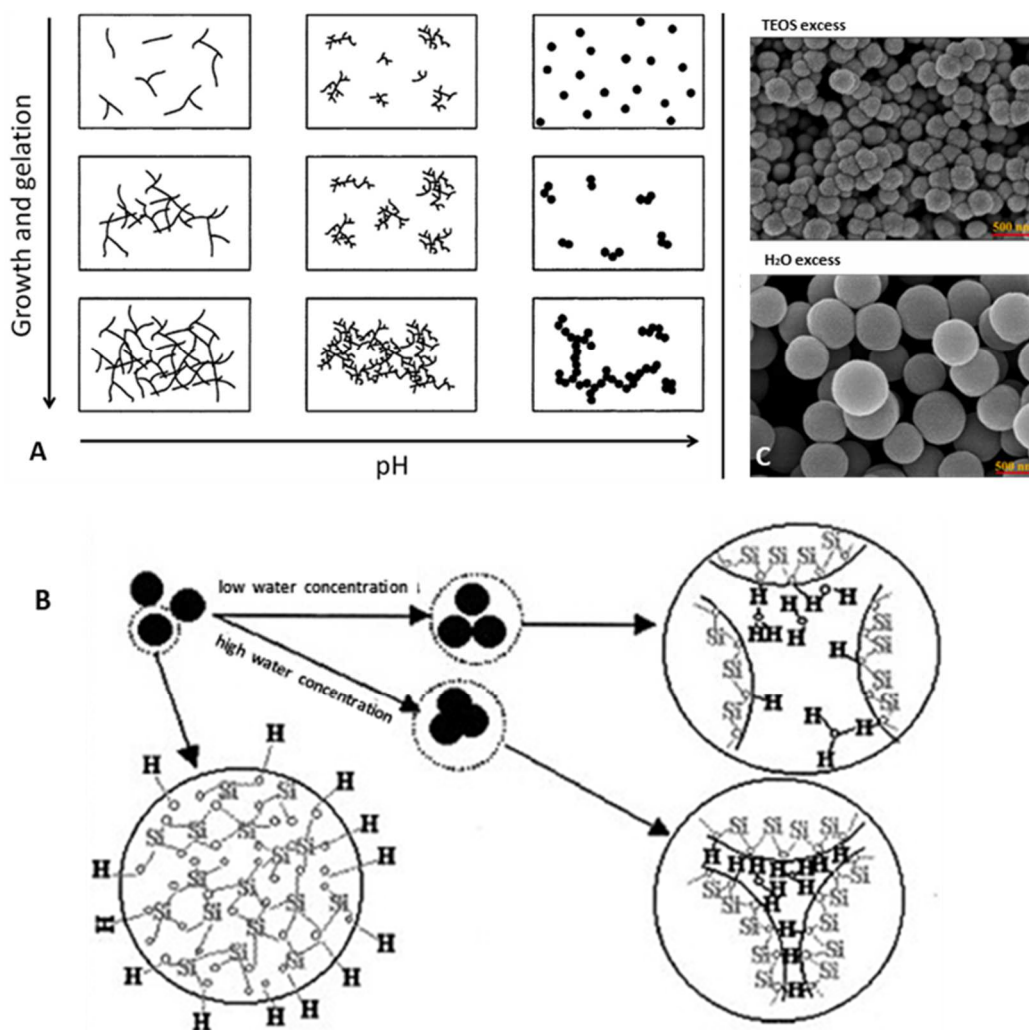
Výsledný produkt celého procesu sol-gel ovlivňuje několik parametrů jako je pH, zvolený katalyzátor, rozpouštědlo, koncentrace prekurzoru, molární poměr prekurzoru a vody a příměs aditiv. Tyto proměnné vstupují do procesu již v prvním kroku, kdy dochází k hydrolyze a následné kondenzaci prekurzorů. Z hlediska pH jsou sol-gel reakce rozlišovány na kyselé katalyzované či zásadité katalyzované v závislosti na typu připravovaného produktu. Při neutrálním pH je průběh sol-gel reakce velice pomalý. Při kyselé i zásadité katalyzované reakci je výsledkem hydrolyzy záměna alkoxy skupiny

za hydroxylovou, jak ukazují schémata na obrázcích 6A a 6B. Míra hydrolyzy v každém kroku závisí na stabilitě přechodového stavu odvislé od síly přítomného elektronakceptorního, či elektrondonorního substituentu. Z tohoto důvodu se navazující kroky hydrolyzy progresivně mění vlivem použitého substituentu. Většinou platí, že zpomalují v případě kyselého a zrychlují v případě zásaditého katalyzátoru. Navazující krok kondenzace (a následně polykondenzace), kdy je formována siloxanová vazba (sít'), se také liší v závislosti na pH reakce. Je-li hydrolyza dokončena před započítím kondenzace, má výsledný produkt $(OH)_3Si-O-Si(OH)_3$ šest míst pro následný kondenzační krok. Tento efekt bývá pozorován u reakce v zásaditých podmínkách a vede k malým, vysoce rozvětveným řetězcům a aglomerátům v solu, které následně tvoří koloidní gel. Tento postup se využívá zejména v přípravě křemičitých nanočástic.



Obr. 6 Reakční schémata průběhu hydrolyzy a následné kondenzace alkoxidů křemíku katalyzovaných (A) kyselinou a (B) zásadou [72].

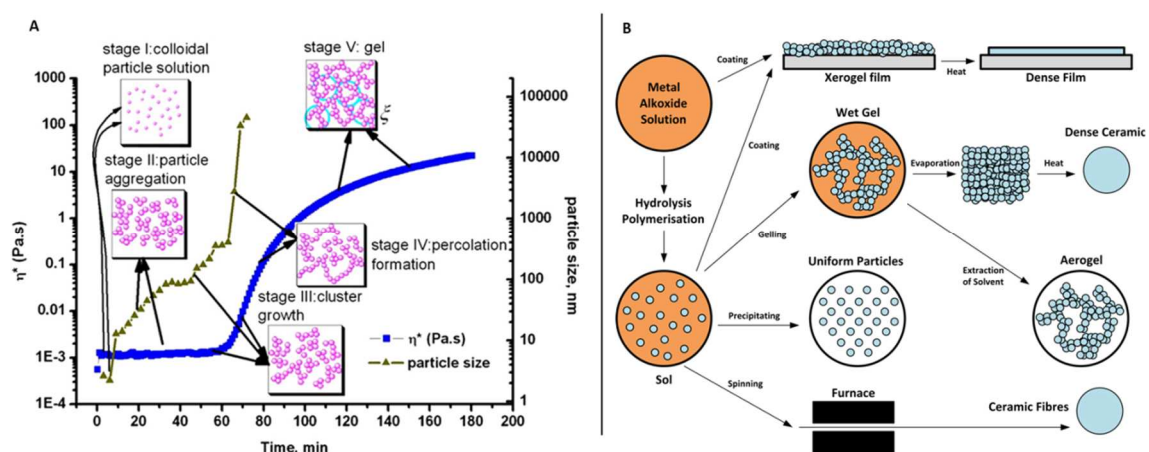
Při reakci v kyselém pH, kdy první krok hydrolyzy bývá tím nejrychlejším, začíná kondenzace ještě před nebo souběžně s dokončením hydrolyzy. Ke kondenzaci často dochází na koncových silanolech, což vede k řetězcům s nižší mírou rozvětvení v solu a síti podobným gelům. Vliv pH na struktury tvořené v gelu je na obrázku 7A [72].



Obr. 7 Schéma vlivu vybraných reakčních podmínek metody sol-gel. (A) Vliv pH na růst a vnitřní strukturu gelu při přechodu sol-gel. (B) Vliv koncentrace vody na velikost a interakce koloidních částic. (C) Vliv přebytku TEOS a H₂O v reakční směsi na povrch a velikost částic [72, 73, 74].

Míra rozvětvení řetězců je u sol-gel reakcí ovlivněna také molárním poměrem Si/H₂O. Snížení podílu vody v reakční směsi je využíváno zejména ke zpomalení hydrolyzy. Kromě toho nedávné studie potvrdily také, že podíl vody v reakční směsi ovlivňuje separační vzdálenost mezi monomery a růst aglomerátů a nanočástic [73, 74]. Vyšší podíl vody vede ke vzniku větších částic formovaných aglomeráty menších primárních částic. Tento jev byl popsán zejména u syntézy křemičitých nanočástic Stöberovou metodou katalyzovanou amoniakem a bývá připisován většímu podílu vodíkových můstků vedoucímu ke koalescenci částic. Tento jev je viditelný na obrázcích 7B a 7C. Rozměr a strukturu materiálů syntetizovaných metodou sol-gel ovlivňuje také volba a podíl rozpouštědla. To slouží k zajištění dostatečného promísení reakční směsi

(vzhledem k tomu, že řada alkoxidů je nemísitelná s vodou) a jeho volba ovlivňuje rozměr formovaných částic. Pro zajištění dobré mísitelnosti jsou jako rozpouštědla nejčastěji voleny alkoholy. Sadasivan et al. prokázali, že rozměr formovaných částic roste s rostoucí molekulovou hmotností rozpouštědla (butanol>2-propanol>1-propanol>ethanol>methanol). Volba rozpouštědla ovlivňuje také míru hydrolyzy a kondenzace a to v tomto pořadí: 1-butanol>methanol>1-propanol>ethanol>2-propanol. Tento efekt bývá připisován kombinaci stérického efektu a formování vodíkových můstků mezi rozpouštědlem a nukleofilem [72, 73].



Obr. 8 Schéma vlivu přechodových fází solu na gel na viskozitu, rozměr koloidních nanočástic a možnosti zpracování.

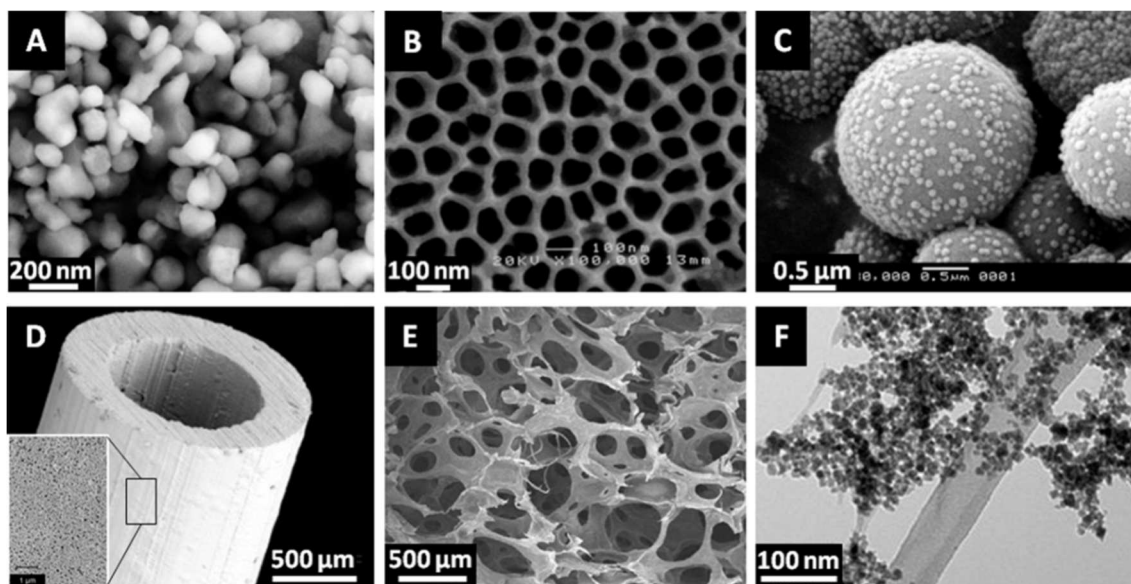
(A) Vývoj viskozity v průběhu přechodu solu na gel, rozměr koloidních částic a jejich agregátů v jednotlivých fázích. (B) Schéma zobrazující možnosti zpracování různých struktur metodou sol-gel v závislosti na fázi (roztok, sol, gel) [75, 76].

Všechny zmíněné parametry se tedy komplexně podílejí na rychlosti hydrolyzy a kondenzace a tím ovlivňují rychlost vzniku a strukturu finálního produktu (gelu). Zejména u kyselě katalyzovaného procesu sol-gel, který probíhá pomaleji, byly detailněji popsány fáze transformace přechodu mezi solem a finálním gelem. Jejich postup je hodnocen jednak změnami vnitřní struktury a dále vývojem viskozity. Příkladem popisu takového vývoje je diagram na obrázku 8A, kde v 1. fázi je koloidní roztok (sol) o nízké viskozitě a malém rozměru (nano)částic. Následuje 2. fáze, kdy dochází k agregaci primárních koloidních (nano)částic při zachování viskozity, ale nárůstu velikosti částic. Ve 3. fázi dochází k růstu klastrů a jejich spojování. Jedná se také o fázi, ve které dochází ke skokovému nárůstu viskozity. Ve fázi 4 se začíná formovat trojrozměrná struktura gelu a může docházet k perkolaci rozpouštědla. Toto je

fáze spojovaná s rychlým nárůstem viskozity. Pokračující gelace vede až k 5. fázi, kdy je formována plně provázaná homogenní struktura makrogelu [68, 75].

Rychlost přechodu mezi jednotlivými fázemi solu na gel je významná zejména z hlediska aplikovatelnosti a zpracovatelnosti různými metodami, jak ukazuje schéma na obrázku 8B. Pro získání vláken, částic anebo tenkých vrstev je nutné využití solu v prvních třech fázích. Parametry výsledného produktu jsou potom určeny koncentrací, viskozitou solu, mírou gelace a případným podílem aditiv. Příměs aditiv je významná zejména při tvorbě mezoporézních částic a vrstev [68, 70, 77].

Různými metodami zpracování solu/gelu je možné připravit makro, mikro i nanostruktury pro technické i medicínské aplikace. Přehled vybraných struktur je uvedený na obrázku 9. Pro medicínské aplikace jsou využitelné zejména porézní 3D struktury [77, 78, 79, 80], tenké vrstvy [77, 81, 82, 83, 84], vláknenné struktury [85, 86, 87, 88] a nanostruktury a nanočástice [89, 90, 91, 83, 92, 93, 94, 95].



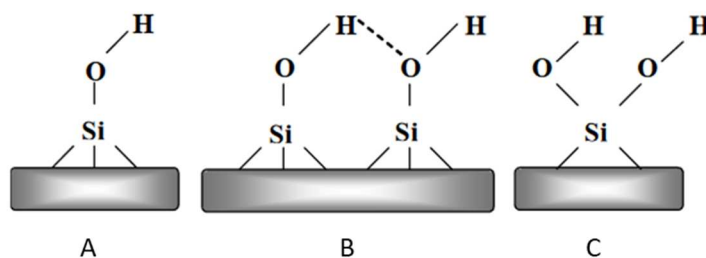
Obr. 9 Možnosti materiálů připravovaných metodou sol-gel. Snímky pořízené SEM. (A) koloidní částice, (B) nanoporézní membrána s rozměrem pórů 72 nm, (C) mezoporézní SiO₂ mikrokuličky, (D) duté vlákno/ tubulární membrána, (E) 3D vysoce porézní scaffold, (F) nanočástice (magnetické) [78].

3.1 Povrchová chemie křemičitých (nano)materiálů

Nezpochybnitelnou výhodou křemičitých (nano)materiálů je dostupnost jejich povrchu pro funkcionalizaci umožňující roubování celé řady funkčních skupin a molekul na

jeden typ materiálu. Tato vlastnost z nich dělá multifunkční nosiče pro konjugace biomolekul, katalyzátorů a dopravu léčiv.

Povrchové (adsorpční) vlastnosti materiálů závisí zejména na koncentraci hydroxyskupin, resp. silanolových skupin ($\equiv\text{Si-OH}$). Vedle silanolových skupin se na povrchu vyskytují i skupiny siloxanové ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$). Existuje několik různých typů silanolových skupin: izolované (volné) silanoly (a), kde je křemíkový atom na povrch nosiče vázán třemi vazbami a čtvrtou vazbou na $-\text{OH}$ skupinu, vicinální (můstkové) silanoly (b), kde jsou jednotlivé $-\text{OH}$ skupiny připojeny na různé křemíkové atomy, které jsou dostatečně blízko, aby mohly interagovat vodíkovými můstky, a geminální silanoly (c), které se skládají ze dvou hydroxyskupin na stejném křemíkovém atomu [9]. Uvedené varianty jsou na obrázku 10.



Obr. 10 Povrchové silanoly (A) izolované, (B) vicinální a (C) geminální.
Reprodukováno z [9].

Při dostatečné koncentraci silanolových skupin má povrch materiálu hydrofilní charakter. Tepelně neupravené silikátové materiály obsahují kromě siloxanových (Si-O) a silanolových (Si-OH) skupin i vodu, která se váže na silanolovou skupinu vodíkovými můstky. Při teplotách okolo $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ je všechna tato vázaná voda odstraněna, dalším zvyšováním teploty dochází k postupné přeměně silanolových skupin na siloxanové vazby, čímž získává povrch materiálu hydrofobní charakter. Při vyšších teplotách (nad $800\text{ }^{\circ}\text{C}$) nastává destrukce i porézní struktury materiálů. Vzhledem k významu hydroxyskupin silanolu, o jejichž koncentraci vypovídá silanolové číslo, pro další funkcionalizaci křemičitých povrchů, je jejich rovnoměrná distribuce nezbytná a dostatečná koncentrace na povrchu nezbytná. Silanolové číslo a stupeň pokrytí povrchu jsou silně závislé na teplotě úpravy materiálu. Jejich závislost uvádí tabulka 1.

Tab. 2 Hodnoty silanolového čísla a stupně pokrytí povrchu hydroxyskupinami v závislosti na teplotě [9].

Teplota [°C]	Silanolové číslo	Stupeň pokrytí povrchu hydroxyskupinami, Θ
180–200	4,6	1
300	3,55	0,77
400	2,35	0,5
500	1,80	0,4
600	1,50	0,33
700	1,15	0,25
800	0,70	0,15
900	0,40	0,09
1000	0,25	0,05
1100	<0,15	0,03

3.1.1 Funkcionalizace povrchu křemičitých materiálů

Výběr metody modifikace se řídí dle požadovaného rozsahu modifikace, typu a orientace povrchových skupin či molekul a typu interakce dané molekuly s povrchem. Možných metod modifikace povrchu křemičitých materiálů existuje celá řada. Metody založené na použití silanů se rozdělují na metodu kondenzační a metodu roubovací [9].

3.1.1.1 Kondenzační metoda

Tato metoda spočívá v přidavku modifikačního činidla – většinou funkčního ethoxysilanu - přímo do reakční směsi při syntéze materiálu. Představuje tedy jednostupňový postup, který umožňuje pevnější fixaci a lepší distribuci organických skupin než metoda roubovací. Nevýhodou je častá tvorba materiálů s méně uspořádanou strukturou, protože tato procedura neumožňuje přesné řízení morfologie vzniklého produktu. To má za následek často nereprodukovatelný postup funkcionalizace povrchu. Příklady této metody funkcionalizace uvádějí například Chong et al., kteří vytvořili mezoporézní materiál nesoucí thiolovou, vinylovou, fenylovou, karboxylovou, sulfoskupinu a aminoskupinu. Jako zdroj křemíku byl použit tetraethoxysilan (TEOS) a příslušný modifikátor nesoucí funkční skupinu v molárním poměru

modifikátor/TEOS=1/20. Připravené materiály byly testovány pro imobilizaci enzymu penicilin acylázy [9, 96].

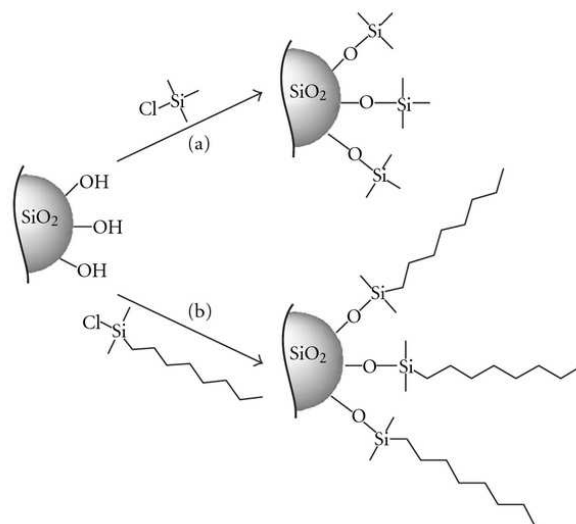
Shylesh at al. touto metodou připravili mezoporézní strukturu kombinací 1,2-bis(triethoxysilyl)ethanu (BTEE) a přídavku trimethoxy(3-sulfonyl)propylsilanu. Výsledný materiál s thiolovou funkční skupinou byl použit jako katalyzátor [9, 97].

3.1.1.2 Roubovací metoda

Metoda roubování spočívá ve vazbě modifikačního činidla na předem syntetizovaný nosič. Před modifikací může být materiál zbaven fyzisorbované vody, případně jiných rozpouštědel. Tento proces se nejčastěji provádí zahříváním materiálu při teplotách do 450 °C v proudu inertního plynu nebo za přítomnosti vzduchu. Modifikace je obvykle prováděna v kapalně fázi – a to buď v koncentrovaném silanu nebo v roztoku s vhodným rozpouštědlem. Vzhledem k finanční náročnosti se preferuje použití rozpouštědla [9]. Účinnost roubovací metody závisí nejen na počtu hydroxylů dostupných na povrchu materiálu, ale také na zvoleném modifikačním činidle, poměru vůči povrchu modifikovaného materiálu, pH a také na reakčních podmínkách [98].

3.1.2 Modifikační činidla a jejich vazba

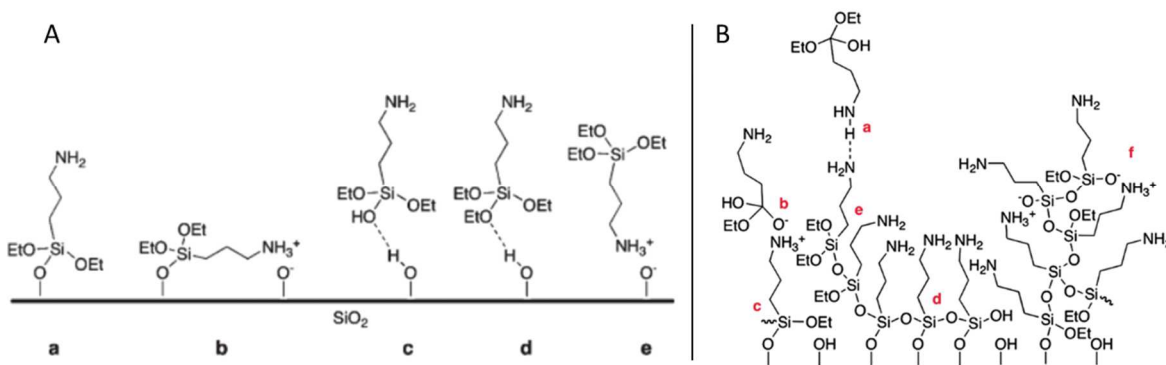
Výběr modifikačního činidla je velmi důležitý. Roubovaná funkční skupina silně ovlivňuje povrchové vlastnosti materiálu jako je náboj, reaktivita pro další reakce a hydrofilita či hydrofóbnost povrchu. Významný vliv na vlastnosti povrchu má také délka uhlíkatého řetězce použitého modifikačního činidla. Délka uhlíkového řetězce funkčního silanu ovlivňuje interakce mezi povrchem a konjugovanou látkou. Při silanizaci povrchu funkčním alkoxyasilanem s dlouhým uhlíkovým řetězcem se snižuje interakce mezi funkční skupinou a atomem křemíku, které mohou vést až k narušení siloxanové vazby a ztrátě funkčnosti povrchu [69]. Při silanizaci povrchu alkylalkoxyasilanem nebo silylací například oktyltrimethylchlorsilanem může délka alkyly ovlivňovat nejen hydrofóbnost povrchu ale i jeho antibakteriální vlastnosti [70, 182].



Obr. 11 Příklady silylace povrchu
 (a) chlortrimethylsilanem a (b) oktyltrimethylchlorsilanem [99].

V případě modifikace povrchu pomocí roubování jsou tedy možné dva typy reakcí v závislosti na použitém typu silanu. V případě využití funkčních alkylsilanů, jako jsou oktyltrimethylchlorsilanem a chlortrimethylsilan, dochází k jejich vazbě tzv. silylací, reakcí mezi hydroxyem silanolové skupiny na povrchu a chlorem, za vzniku siloxanové vazby a kyseliny chlorovodíkové jako vedlejšího produktu. Příklady schémat takových reakcí jsou uvedeny na obrázku 11. V případě častěji prováděné silanizace funkčními alkoxy silany, mezi které spadají také organo-mono-silylované prekurzory, dochází k hydrolyze alkoxy skupiny za vzniku vysoce reaktivního silanolu, kondenzační reakcí s povrchovými hydroxyly za vzniku a formování kovalentní siloxanové vazby. Vedlejšími produkty reakce jsou alkohol a voda. Voda je zároveň nutnou složkou silanizačního roztoku kvůli zahájení procesu hydrolyzy [9, 98, 100]. Její podíl je významný také vzhledem k vedlejším interakcím mezi modifikačním činidlem a povrchem, ke kterým může docházet především u aminoalkoxy silanů prostřednictvím vodíkových můstků, elektrostatických interakcí a siloxanových vazeb [9, 10, 100]. Příklady těchto interakcí jsou uvedeny na obrázku 12. K jejich vzniku dochází z důvodu nízké hustoty roubování modifikačního činidla (obr. 12Ab) a/nebo nedostatečné vazbě molekuly silanu (obr. 12Ac-e). U alkoxy silanů s větším počtem ethoxy skupin může docházet k polymeraci a vzniku oligomerů. Tím se zvyšuje počet možných strukturních nepravidlostí vznikajících na povrchu silanizací. Vertikální polymerací může docházet i k tvorbě vícevrstevných nepravidlostí. Přehled možných nepravidlostí

je na obrázku 12B. Jejich vznik významně ovlivňuje typ rozpouštědla, množství vody, koncentrace silanu, doba reakce a podmínky sušení [100].

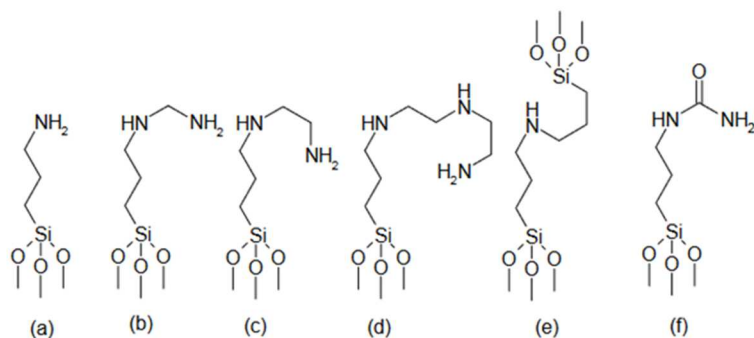


Obr. 12 Příklady různých vazeb a vícevrstevných nepravidelností vznikajících při vazbě 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES).

(A) a. kovalentní vazba, b. nekovalentní interakce silanu kovalentně vázaného na povrch, c-e. slabé vazby vodíkovými můstky a elektrostatické. (B) nepravidelnosti vrstvy připravené silanizací APTES, jeho molekuly mohou být do vrstvy zabudovány: a. vodíkovou vazbou, b. elektrostaticky, c. kovalentní vazbou k substrátu, d. horizontální a e. vertikální polymerací se sousedícím silanem, f. vazbou oligomerů/polymerů silanu [100].

Povrchovou úpravou funkčními alkylsilany a alkokoxysilany je možné na povrch křemičitých nanomateriálů roubovat celou škálu funkčních skupin včetně aminoskupin, thiolu, glycidylskupiny, a dalších. Vybrané příklady možných modifikací jsou uvedeny na obrázku 13. Nejčastěji se tato modifikační činidla dělí v závislosti na úrovni smáčivosti povrchu, ke které vedou. Mezi významné hydrofilizující modifikátory s aminoskupinou patří (3-aminopropyl)triethoxysilan, (3-aminopropyl)trimethoxysilan, N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamin, [3-(methylamino)propyl]trimethoxysilan, bis[3-(tri-ethoxysilyl)propyl]amin, 3-(trimethoxysilyl)propyltrimethylamonium chlorid a 3-(trimethoxysilyl)propyl močovina [9].

K dalším používaným modifikátorům, jež zajišťují hydrofilní povrch, patří alkokoxysilany nesoucí thiolovou či kyanoskupinu. Obě funkční skupiny lze snadno oxidovat na karboxylovou a sulfonovou kyselinu. K nejčastěji používaným modifikátorům patří (3-sulfonylpropyl)trimethoxysilan, (3-sulfonylpropyl)triethoxysilan, (3-kyanopropyl)trichlorosilan a 4- (trichlorsilyl)butannitril [9].

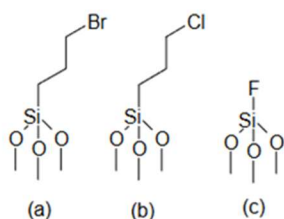


Modifikace povrchu primární (a) nebo sekundární (b-e) aminoskupinou a amidovouskupinou (f).

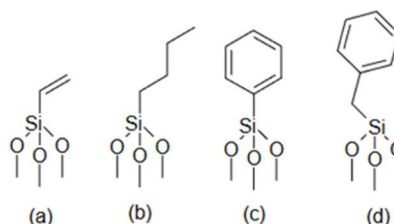


Modifikace povrchu (a) kyanovou skupinou a (b) thiolovou skupinou.

Modifikace povrchu nosiče glycidyl skupinou.



Modifikace povrchu (a) bromem, (b) chlorem a (c) fluorem.

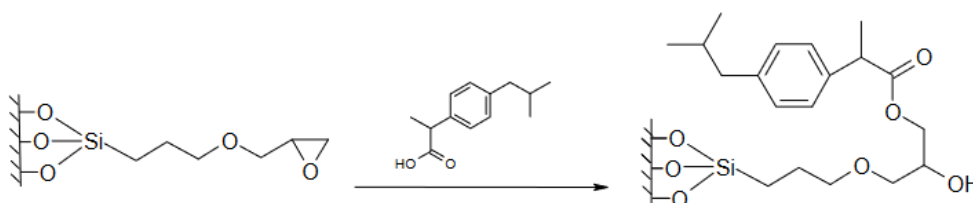


Modifikace povrchu (a, b) alkyly a (c, d) aryly.

*Obr. 13 Příklady modifikací povrchu různými funkčními skupinami proveditelné silanizací funkčními alkoxyasilany.
Reprodukováno z [9].*

Dalším často používaným typem modifikace je nahrazení silanolové skupiny epoxyskupinou. Pro tyto účely se používá komerčně dostupný modifikátor 3-(glycidyl)propyltrimethoxysilan (GPTMS) [9]. Příkladem jeho využití pro medicínské konjugace je práce Tourné-Péteilh et al. [101], kteří ho použili v reakční směsi obsahující roztok GPTMS v toluenu. Po 1,5 hodinách varu, byl oddestilován vzniklý methanol a suspenze byla opět 1,5 hodiny zahřívána k varu. Po ukončení byla pevná fáze odfiltrována a promyta toluenem a diethyletherem a sušena při teplotě 160 °C. Na modifikovaný materiál bylo zakotveno nesteroidní protizánětlivé léčivo – ibuprofen

(obr. 7). Schéma provedené vazby je uvedeno na obrázku 14. Další příklad využití GPTMS uvádí Pramabharan, kde konjugovaná skupina byla využita k vazbě chitosanu a následně ke konjugaci faktoru TNF- α pro protinádorovou terapii u rakoviny prsu [102].



Obr. 14 Příklad využití povrchu sililovaného 3-(glycidyl)propyltrimethoxysilanem ke konjugaci ibuprofenu.
Reprodukováno z [9].

Pro získání hydrofobního povrchu nosiče lze silikátové materiály modifikovat chlorem, fluorem či bromem (obr. 13). Příkladem modifikátorů může být trichlor(3-chlorpropyl)silan, triethoxyfluorsilan, dichlordimethylsilan, chlortrimethoxysilan a (brommethyl)chlordimethylsilan.

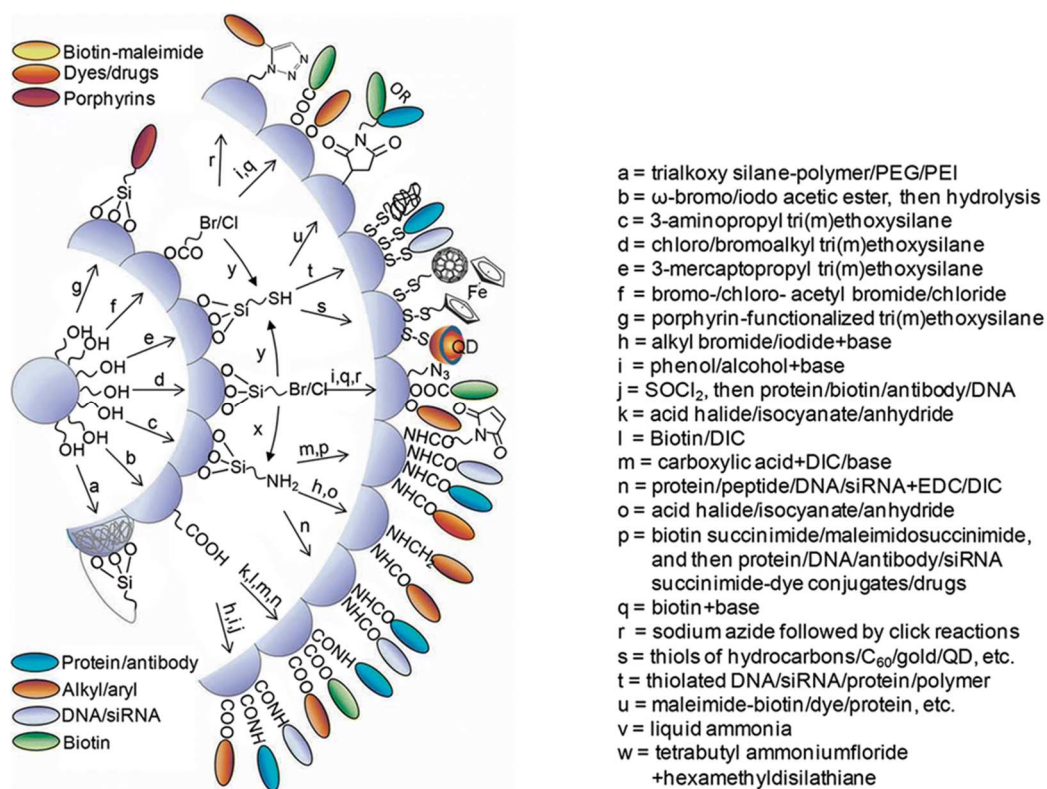
Hydrofobní povrch nosiče lze také získat jeho modifikací alkylem či arylem (obr. 13). K nejčastěji zmiňovaným modifikátorům patří trimethoxyvinylsilan, chlortrimethylsilan, benzyltrichlorsilan, fenyltrimethoxysilan, (1-fenylethyl)(3-aminopropyl)silan, triethoxyfenylsilan, (butyl)trichlorsilan, (terc-butyl)dimethylchlorsilan, trimethoxymethylsilan, trimethoxyoktylsilan a trimethoxyoktadecylsilan.

Příklad využití silylace pro medicínské účely uvádějí například Horcajada et al. [103]. Ti při imobilizaci ibuprofenu studovali možnosti modifikačních činidel trichlor(3-chlorpropyl)silan, trichlor(fenyl)silan, benzyltrichlorsilan, triethoxy(3-sulfonylpropyl)silan, trichlor(3-kyanpropyl)silan a butyltrichlorsilan. Silylace byla prováděna v roztoku toluenu v inertní atmosféře (Ar) za varu po dobu 16 h.

Bylo popsáno také dosažení vícefunkčních směsí kombinací dvou modifikačních činidel. Luechinger et al. [104] modifikovali křemičitý povrch (3-aminopropyl)trimethoxysilanem (APTMS) a methyltrimethoxysilanem (MTMS). Účinnost modifikace povrchu byla vyšší při použití směsi obou modifikačních činidel (APTMS a MTMS) než u materiálů modifikovaných pouze jedním z nich.

Tento jev byl vysvětlen tím, že (a) přítomná aminoskupina bazicky katalyzuje hydrolýzu trimethoxysilanů, a tak zvyšuje reaktivitu této skupiny vůči silanolům nosiče a (b) vzhledem k menší velikosti methylové skupiny je snadnější zaplnit mezery mezi 3-aminopropylóvými skupinami.

Funkcionalizace povrchu křemičitých (nano)materiálů ovlivňuje jejich biokompatibilitu, interakce s živou hmotou a také s proteiny krevního séra. Má obrovský potenciál pro využití v medicíně a to zejména v dopravě léčiv, protinádorové terapii, diagnostice a teranostice, kde je využívána zejména pro další konjugace léčiv, barviv, fluorescenčních značek, protilátek a enzymů [10, 102, 105, 106, 107]. Jejich vazba může být kovalentní esterová, amidová, dehydrogenázami redukovatelná disulfidová, iontová aj. Přehledné schéma možností různých kombinací je na obrázku 15.



Obr. 15 Přehled možností konjugace biomolekul na různě funkcionalizovaný povrch nanočástic oxidu křemičitého [10].

3.2 Biokompatibilita křemičitých materiálů

Materiály na bázi oxidu křemičitého jsou všeobecně považovány za biokompatibilní a jsou FDA zařazeny do kategorie GRAS (General Recognized As Safe) [108]. Přestože většina publikací potvrzuje biokompatibilitu křemičitých materiálů [106], buněčná odezva se silně liší v závislosti na struktuře materiálu, podmínkách jeho tepelné úpravy, reaktivitě povrchu a funkcionalizaci [108]. U nanovláken na bázi oxidu křemičitého jsou omezené informace týkající se studia jejich biokompatibility do hloubky. Vzhledem ke shodnému materiálovému složení lze předpokládat podobnost s dalšími typy nanomateriálů. Z nanomateriálů byla nejvíce studována toxicita nanočástic, u nichž je znám význam parametrů jako jsou koncentrace, rozměr a tvar. Například Demir and Castranova [109] potvrdili genotoxický efekt syntetických křemičitých nanočástic s průměrem <math><10\text{ nm}</math> při koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a vyšší. Z hlediska povrchové funkcionalizace byl popsán možný toxický efekt způsobený hydroxylovými skupinami silanolu na povrchu nanočástic. Ten je spojován s produkcí ROS fagocytickými buňkami NADPH oxidázou. Oxidativní stres potom může vést k zánětlivé odpovědi díky upregulaci redox-senzitivních transkripčních faktorů [110].

Vliv volných -OH skupin na povrchu na cytotoxicitu křemičitých nanočástic potvrdili například Li et al. [115] u makrofágů. Tento efekt byl odstraněn povrchovou funkcionalizací. Pozitivní efekt funkcionalizace potvrdili také Gomez et al. [111].

Významným testovaným parametrem byla vedle organické cytotoxicity a genotoxicity také hemokompatibilita. Díky negativnímu náboji na povrchu křemičitých materiálů může docházet k interakcím s lipidickou dvojvrstvou červených krvinek [108]. Případná hemolytická aktivita, která je nižší u mezoporézních SiO_2 nanočástic ve srovnání s kompaktními nanočásticemi [112], může být snížena funkcionalizací povrchu, například vazbou lipidů [106]. Interakce nanočástic s buňkami hematokrytu je po vstupu do krevního řečiště ovlivněna také adsorpcí proteinů krevního séra na jejich povrch [113].

Zároveň byly popsány významné pozitivní dopady křemičitých materiálů stimulujících například osteoindukci [77]. Pozitivní vliv křemičitých nanočástic byl také prokázán v případě hojení ran, byl potvrzen *in vitro* [8] i *in vivo* [31, 114]. V podmínkách *in vivo* Pan et al. prokázali pozitivní stimulaci zánětlivé fáze hojení křemičitými nanočásticemi [31].

3.3 Biodegradace

Křemičité materiály připravené metodou sol-gel mohou být, a většinou jsou, degradabilní. Jejich degradabilita závisí na složení, podmínkách výroby a stabilizace. Amorfni křemičité nanomateriály jsou všeobecně považovány za biodegradabilní. Při fyziologické teplotě a pH (36 – 37°C, pH: 7,35 – 7,45) byla popsána degradace 120 – 170 ppm. Degradacním produktem je kyselina orthokřemičitá (příp. polyorthokřemičitá) [108, 116]. Jedná se o netoxický, ve vodě rozpustný produkt, který je vyloučen renální cestou močí. Tímto způsobem jsou odstraňovány degradační produkty s molekulovou hmotností pod 5000 Da a nanočástice s hydrodynamickým průměrem pod 8 nm [116]. U nedegradabilních částic dochází k jejich kumulaci a eliminaci nejčastěji játry [112, 116]. Ta je rychlejší v případě pozitivně nabitých částic [106].

3.4 Nanovlákná připravená metodou sol-gel

Při přípravě anorganických křemičitých a hybridních nanovláken metodou sol-gel bylo popsáno několik postupů umožňujících jejich vznik. Bylo popsáno využití solů v různém stupni přechodu solu na gel, přičemž u solů s nižší viskozitou je zvláknování prováděno nejčastěji elektrostatickým zvláknováním. Dalšími možnostmi je zpracování odstředivým zvláknováním nebo u viskózních solů/gelů ve vyšším stupni přechodu mohou být vlákna zpracována spíše tažením [117, 118, 119].

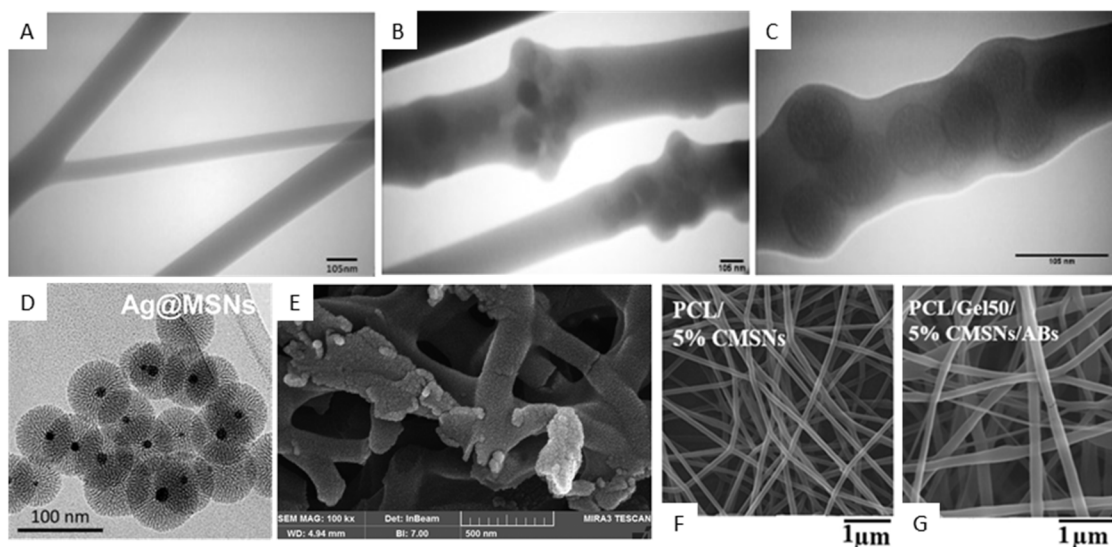
Vzhledem k obtížnosti elektrostatického zvláknování křemičitých solů, způsobené rozvětvením a zapletením makromolekul připravených metodou sol-gel, ve srovnání s lineárními makromolekulami syntetických polymerů mohou být při syntéze a následném zvláknění využity pomocné látky jako gelátory, plniva a nosné polymery [117, 120, 121, 122, 72]. Podmínkou jejich využití je především dobrá mísitelnost a optimální molekulová hmotnost. Právě díky ní jsou jako pomocné látky při zvláknování využívány nejčastěji syntetické polymery. Kombinace nosného polymeru a anorganické složky může být provedena dvěma způsoby – jednak (i) inkorporací již zformovaných koloidních nanočástic do hmoty nanovláken a dále (ii) zapojením nosného polymeru přímo do procesu syntézy sol-gel [123].

3.4.1 Nanovlákná s inkorporovanými anorganickými částicemi

Inkorporaci křemičitých nanočástic do hmoty nanovláken ve své práci popisují například Zhou et al [124], Qiu et al. [125], Ke et al. [126] a další. Struktura vytvořená Zhou et al. je založena na kombinaci nanovláken směsi kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) a chitosanu (CS). Inkorporované křemičité nanočástice jsou dopované kancerostatikem doxorubicin (DOX). Účelem inkorporace nanočástic bylo docílení prodloužené kinetiky uvolňování v protinádorové terapii [124]. Podobný systém pro protinádorovou terapii popisují ve své práci také Qui et al., kde doxorubicin je vázán v mezoporezních křemičitých nanočásticích (MSNPs) o průměru 110.19 nm a s rozměrem pórů 3.5 nm připravených z tetraethoxysilanu (TEOS) a cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB) jako porogenu [125]. Ve srovnání se Zhou et al. je zde kinetika uvolňování léčiva zpomalena díky absenci chitosanu ve hmotě nanovláken a tím způsobené snížené smáčivosti povrchu. Inkorporaci nanočástic do hmoty nanovláken za účelem dosažení prodlouženého uvolňování léčiva využili také Ke et al. Nosným polymerem byl v tomto případě poly- ϵ -kaprolakton (PCL) a enkapsulovaným léčivem alantoin [126].

Inkorporace křemičitých nanočástic do nanovláken byla testována také z hlediska využitelnosti pro tkáňové inženýrství. Mehrasa et al. ve své práci testovali vliv inkorporace MSNPs (70.9 nm \pm 9.45 nm) orientovaných nanovláken z kopolymeru PLGA a směsi PLGA s želatinou (PLGA/GE). V obou případech vedla inkorporace nanočástic ke zvýšení v pevnosti v tahu o 20 až 140 % v závislosti na podílu nanočástic. U příměsi 10% (hm.) MSNPs byl zaznamenán také pozitivní vliv na proliferaci buněk PC12 ve dnech 1 až 3 [127]. Pro aplikaci v tkáňovém inženýrství byla testována také inkorporace neporézních křemičitých nanočástic (SNPs) do uhlíkových nanovláken. Ta byla připravena elektrostatickým zvlákněním roztoku polyakrylonitrilu (PAN) s příměsí nanočástic a následnou karbonizací při 1000 °C po dobu 1 hodiny. Inkorporace SNPs vedla ke zlepšení smáčivosti povrchu, kdy 10% podíl SNPs vedl ke snížení kontaktního úhlu ze 120.3 ° na 81 °. Přítomnost SNPs (> 5%) také vedla, stejně jako v případě Mehrasa et al., ke zlepšení proliferace kostních buněk MG-63 [128]. Tento systém dále rozvinuli Xu et al. tvorbou nanovláken typu jádro/plášť s MSNPs inkorporovanými v polyvinylakoholovém (PVA) jádře obklopeného PCL pláštěm zajišťujícím stabilitu ve vodném prostředí. Bioaktivita tohoto systému byla zvýšena dopováním hmoty nanovláken antibiotikem gentamicin [129]. Možnost dopování MSNPs směsí antibiotik

a jejich následnou inkorporaci do PCL/GE nanovláken popsali Gounami et al. [130]. Dopování směsí vankomycinu a polymyxinu B vedlo při podílu 5% MSNPs ve hmotě nanovláken ke kompletní inhibici růstu populace bakterie *S. aureus* po 6 hodinách a bakterie *P. aeruginosa* po 12 hodinách expozice [130]. Silný antibakteriální účinek byl dosažen také inkorporací nanočástic Ag/SiO₂ typu jádro/plášť (SSNPs, obr. 16D) do hmoty PVA nanovláken, jak uvádějí Jatoi et al. [131]. SSNPs bývají tvořeny za účelem snížení silně cytotoxického účinku čistě stříbrných nanočástic. [132, 133, 134, 135] U tohoto systému vedla jejich inkorporace k prokazatelnému antibakteriálnímu účinku vůči gram pozitivním i gram negativním bakteriím [131]. Podobný, ale fotodynamicky indukovaný antibakteriální účinek byl zaznamenán v případě PCL nanovláken dopovaných MSNPs připravenými Stöberovou metodou z tetraethoxysilanu (TEOS) a modifikovanými trichloro(1H, 1H, 2H, 2H-heptadekafluorodecyl) silanem [136]. Popsána byla také inkorporace směsi křemičitých a stříbrných nanočástic do nanovláken na bázi chitosanu [137, 138]. Vybrané příklady připravených struktur jsou uvedeny na obrázku 16.



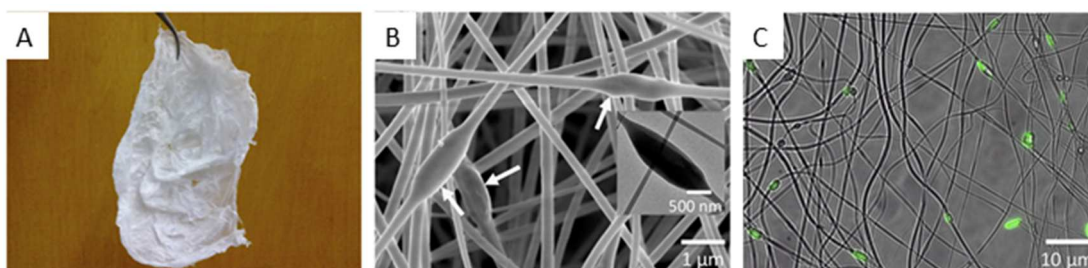
Obr. 16 Nanovlákná dopovaná křemičitými nanočásticemi. TEM snímky PLGA/GE orientovaných nanovláken čistých (A), PLGA nanovláken dopovaných 10% podílem nanovláken MSNPs (B) a PLAG/GE nanovláken dopovaných 10% MSNPs (C). (D) TEM snímek mezoporézních nanočástic typu jádro plášť Ag/Si (Ag-MSNs). SEM snímky (E) uhlíkových nanovláken dopovaných 5% podílem SNPs po karbonizaci (1000°C/ 1h), (F) PCL nanovláken dopovaných 5% MSNPs a (G) PCL/GE nanovláken dopovaných 5% MSNPs s inkorporovanými antibiotiky vankomycin a polymyxin B [127, 128, 135, 130].

3.4.2 Nanovlákna s nosným polymerem zapojeným do procesu sol-gel

Příkladem zapojení nosného polymeru přímo do procesu syntézy metodou sol-gel je práce Pirzada et al., která popisuje přípravu nanovláken kyselou katalýzou tetraethoxysilanu (TEOS) ve směsi ethanolu a vody. Jako pomocný polymer je zde využit polyvinylalkohol (PVA) o molekulové hmotnosti 205 kDa. Výsledná nanovlákna měla podíl anorganické složky až 35 % a jejich střední hodnota průměru se pohybovala mezi 48 a 330 nm v závislosti na podílu TEOS v reakční směsi. U nanovláken byl potvrzen vznik vnitřní molekulární sítě mezi PVA a TEOS prostřednictvím Si-O-C vazeb. Díky nim byla vytvořena hybridní organicko-anorganická nanovlákna stabilní ve vodném prostředí i přes vysoký podíl ve vodě rozpustného PVA [117].

Kombinaci prekurzoru tetraalkoxysilanu a nosného polymeru PVA ve svých pracích využívají také Shao et al. [120], Wu et al. [121], Veverková et al. [139], Yue et al. [140], Tong et al. [141] a Zucker et al. [142]. Ve všech uvedených případech byla reakce kyselou katalyzována – ať už kyselinou fosforečnou [120, 142], chlorovodíkovou [139, 141] nebo octovou [140], a jako prekurzor byl využit tetraethoxysilan (TEOS). Jedinou výjimku představuje práce Tong et al., kde byl využit pro zajištění rychlejšího průběhu hydrolyzy tetramethoxysilan (TMOS) [141]. Ve všech případech probíhala hydrolyza v oddělené reakční směsi před smísením s roztokem PVA. Molární poměr složek v reakční směsi TEOS: voda: kyselina byl nejčastěji udržován na hodnotách 1: 11: 0.001 (až 0.01) [120, 142]. V případě Tong et al. [141] byl molární poměr TMOS: voda: kyselina ve směsi 1: 2.8: 0.00024. Molekulová hmotnost nosného polymeru PVA se pohybovala mezi 89 a 98 kDa a koncentrace jeho vodného roztoku v rozmezí 8 % [140] a 18 % [141]. Tímto způsobem byla ve všech případech vyrobena ve vodě stálá organicko-anorganická nanovlákna. Shao et al. prokázali, že pouhých 22 % (hm.) podílu anorganické složky v nanovlákněch vede k výraznému snížení rozpustnosti nanovláken ve vodě - a to o 86.9 %. 40% podíl potom ke zcela nerozpustným nanovláknům [120]. Ta mají široké využití v medicíně [139, 141] i biotechnologiích, například jako membrány pro čištění vod [121, 140, 142]. Například Tong et al. testovali využití pozvolného a biokompatibilního síťování mezi molekulami PVA a TMOS k enkapsulaci živých bakteriálních buněk (*E. coli*). Pro dosažení dostatečné homogenizace a rovnoměrné distribuce bakterií v nanovlákněch bylo využito mísení mikrofluidním čipem (tvaru Y), kde byly smíseny roztok PVA obsahující bakteriální suspenzi a hydrolyzovaný TMOS. Po uplynutí reakčního času (3 až 9 minut)

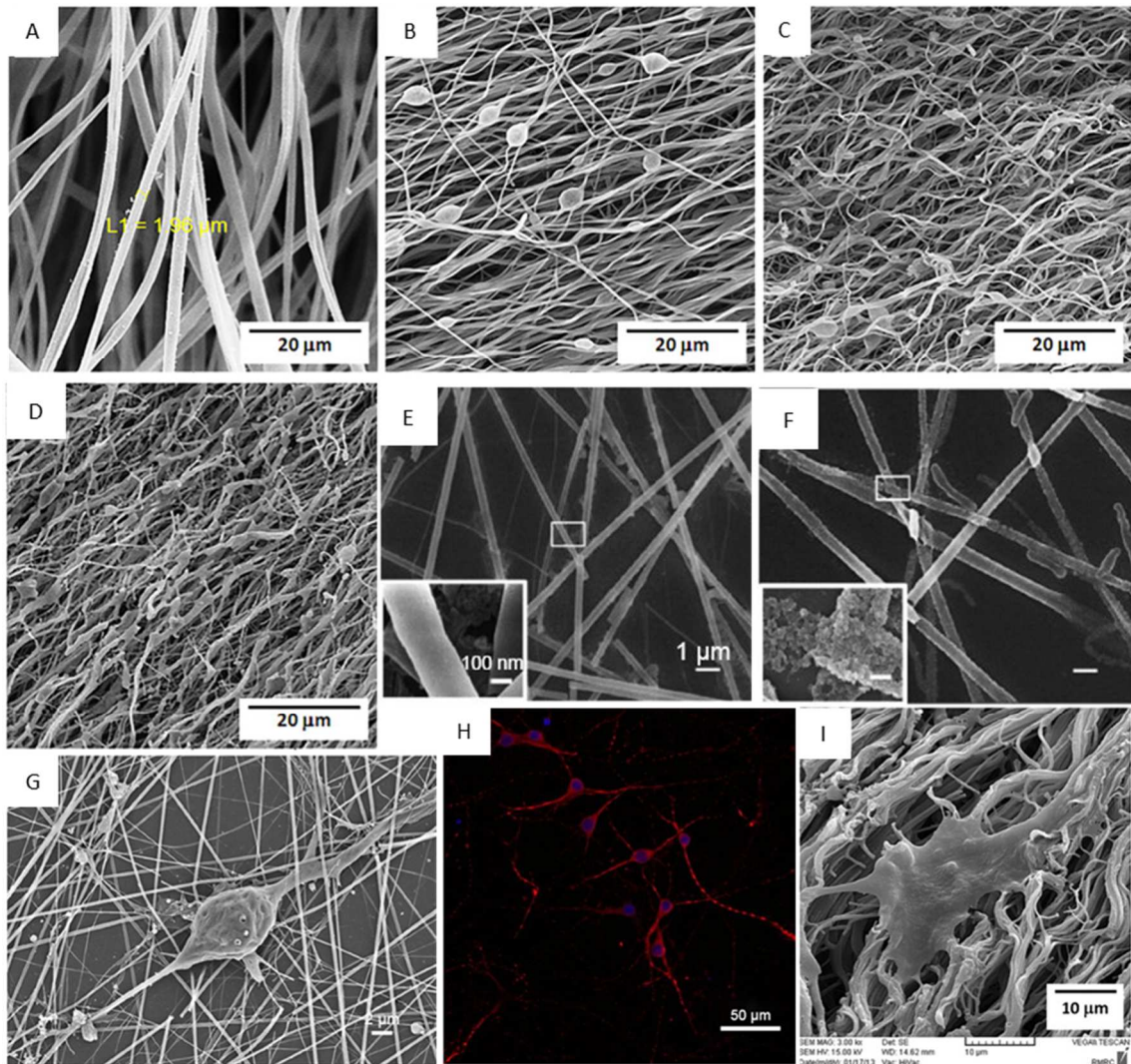
byla výsledná směs elektrostaticky zvlákněna v objemovém poměru PVA:TMOS 3:4 s výsledným průměrem nanovláken mezi 162 a 177 nm. Viabilita bakterií byla po enkapsulaci ověřena prostřednictvím exprese zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) [141], viz obrázek 17.



Obr. 17 Nanovlákná SiO_2/PVA připravená metodou sol-gel. (A) Snímek výsledné nanovláknenné vrstvy, (B) SEM snímek zobrazující enkapsulované bakterie *E. coli*, (C) průkaz životaschopnosti enkapsulovaných bakterií *E. coli* vizualizací produkce GFP [141].

Obdobné postupy přípravy uvádějí publikace využívající jako nosný polymer polyvinylpyrrolidon (PVP) [143, 144, 145, 146, 147]. Polyvinylpyrrolidon je stejně jako polyvinylalkohol snadno zvláknitelný biokompatibilní polymer se širokým využitím v medicíně. Stejně jako případě PVA, je i PVP kombinováno s reakční směsí skládající se z tetraalkoxysilanu, vody a alkoholu a k hydrolyze je využíván kyselý katalyzátor. Rozpustnost PVP v alkoholech (ethanol [143, 145], butanol [147]) umožňuje snížení podílu vody ve výsledném zvláknovacím roztoku a nedochází tedy ke skokové změně podílu vody ve směsi. Na rozdíl od hybridních PVA/SiO_2 nanovláken zde nedochází ke vzniku vnitřních sítí mezi molekulami TEOS a PVP. Vzhledem k rozpustnosti PVP ve vodě je stabilita nanovláken zajištěna následnou kalcifikací při teplotě $> 300\text{ }^\circ\text{C}$ [143, 145, 146]. Ta vede ke změně morfologie nanovláken a podporuje formování siloxanových vazeb. I přes změnu morfologie vlivem kalcifikace byly průměry získaných nanovláken spíše vyšší - a to především díky vysoké molekulové hmotnosti PVP (1.3 MDa). U takto připravených PVP/SiO_2 nanovláken byla popsána široká škála aplikací. Tepekiran et al. [145] se ve své práci zabývali výrobou a využitelností PVP/SiO_2 nanovláken pro filtraci plyných médií při vysokých teplotách. Molární poměr jejich reakční směsi TEOS: voda: kyselina 1: 0.65: 0.055 při podílu TEOS ve zvláknovacím roztoku max. 30 %. Vyšší podíl TEOS nebyl zvlákněn vzhledem ke snižující se viskozitě s jeho rostoucím podílem i přes pokračující polykondenzaci. Viskozita zvláknovacího roztoku s přidávkem TEOS klesla na 135.6 mPa.s z 192 mPa.s

a střední průměr nanovláken na $0.88 \pm 0.17 \mu\text{m}$ z $2.19 \pm 0.63 \mu\text{m}$ ve srovnání s čistým PVP. Celkově vyšší průměr nanovláken lze připisovat také použité zvlákňovací metodě, kterou bylo odstředivé zvlákňování (c-spin) na rotační kolektor vzdálený 200 mm při rychlosti otáčení emitoru 7000 ot/min. Tuto metodu úspěšně použili pro přípravu křemičitých nanovláken také Hromádka et al. [148]. V případě práce Tepekiran et al. byl popsán také vliv následné kalcifikace na průměr nanovláken. Ta vedla k jeho snížení o min. 40 % a měla významný vliv na filtrační účinnost a mechanické vlastnosti, stejně jako podíl TEOS v reakční směsi. V případě vzorku s 15% podílem TEOS kalcifikovaném při 600 °C byla dosažena filtrační účinnost přesahující 75 % [145]. Využitím tohoto typu nanovláken pro filtraci se zabývali také Wang et al. [149] a čistě křemičitých nanovláken Mercante et al. [150]. Možným využitím podobně připravených kalcifikovaných nanovláken v medicíně se zabývali například Feng et al. [143], Ravichandran et al. [144], Shahhosseininia et al. [146]. Feng et al. nanovlákná připravená elektrostatickým zvlákňováním na jehlové elektrodě nejprve kalcifikovali (450 °C/ 3 h), čímž dosáhli nanovláken se střední hodnotou průměru $254 \pm 79 \text{ nm}$. Kalcifikovaná nanovlákná byla následně povrchově modifikována pro zlepšení buněčné adheze a následně testována pro účely tkáňového inženýrství nervové tkáně. Nižší teplota kalcifikace umožnila tvorbu ve vodě stabilní ale stále biodegradabilní nanovláknenné vrstvy. U hipokampálních neuronů byla po pětidenní expozici prokázána viabilita přesahující 99 %. Po osmi dnech došlo u neuronů kultivovaných na těchto nanovlákních k úspěšné diferenciaci a formování protažených neuritů, jak ukazuje obrázek 18G [143]. PVP/SiO₂ nanovlákná připravená jehlovým elektrostatickým zvlákňováním a kalcifikací při teplotách >500 °C připravili Shahhosseininia et al. a u těchto nanovláken prokázali biokompatibilitu vůči myším fibroblastům L929 [146]. Využitelnost tohoto typu nanovláken pro tkáňové inženýrství kosti Ravichandran et al. [144]. Příklady dosažených struktur jsou uvedeny na obrázku 18. Kombinací TEOS, PVP a kopolymeru P123 byli schopni připravit mezoporézní nanovlákná s průměrem vláken 470 nm a pórů 5.97 nm. Kultivace lidských osteoblastů podobných buněk MG-63 na těchto nanovlákních vedla k upregulaci produkce kolagenu typu I, alkalické forfatázy, osteokalcinu, osteopontinu a sialoproteinu [144]. Polyvinylpyrrolidon byl jako nosný polymer využit také k tvorbě organicko-anorganických nanovláken s přísávkem TEOS a hydroxyapatitu (HAp) určených pro stomatologii [151, 152] nebo pro aplikaci ve spektrometrii [153].



Obr. 18 Nanovlákna připravená ze směsi TEOS/PVP.

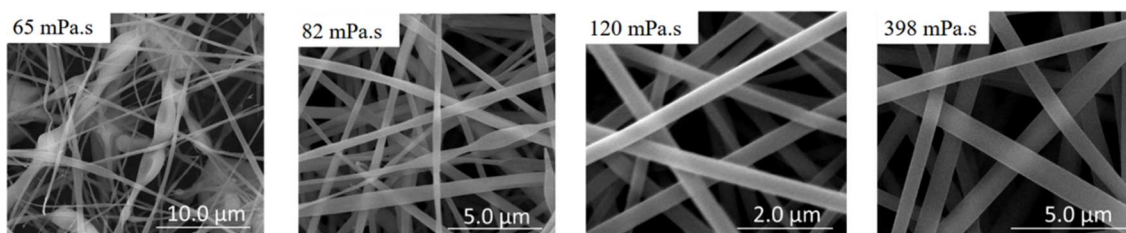
(A) Nanovlákna bez kalcifikace a po kalcifikaci při (B) 500 °C, (C) 700 °C, (D) 1000°C. Vliv biodegradace v simulovaných podmínkách (10 m PBS, 37 °C) na vzhled nanovláken kalcifikovaných při 450 °C po (E) 6 dnech a (F) 11 dnech. Proliferace lidských neuronů (G, H) a myších fibroblastů L929 (I) na povrchu kalcifikovaných nanovláken [143, 146].

Z dalších syntetických polymerů byly jako pomocné nosné polymery při tvorbě hybridních organicko-anorganických nanovláken použity také polyvinylidenfluorid (PVDF) [154], polyakrylonitril (PAN) [155, 156, 157, 158] Vzhledem k chemické povaze těchto polymerů jsou tato nanovlákna aplikovatelná především v technických oblastech.

3.4.3 Křemičitá nanovlákna připravená metodou sol-gel bez nosného polymeru

Přípravu čistých křemičitých nanovláken metodou sol-gel bez pomocného nosného polymeru popisuje hned několik autorů [154 – 159]. Již v roce 1980 formulovali Sakka et al. základní podmínky zvláknitelnosti čistě křemičitých vláken připravených z tetraethoxysilanu (TEOS) a tetramethoxysilanu (TMOS). Zvláknitelnost je možná při potlačení hydrolyzy, což vede k nižší rychlosti kondenzace i větvení vznikajících řetězců a zároveň umožňuje zvýšení koncentrace prekurzoru v reakční směsi a tím i viskozity solu bez předčasného přechodu na gel. Z toho vyplývá, že zvláknitelnost čistě křemičitých anorganických solů je možná při zapojení kyseliny katalyzované hydrolyzy a zároveň zachování molárního poměru voda/tetraalkoxysilan pod 2. Proces je samozřejmě ovlivňován i dalšími parametry reakce sol-gel, jako je rozpouštědlo, použitý katalyzátor a další [68, 11, 160, 161]. Tímto způsobem mohou být připraveny biokompatibilní vlákenné struktury se širokým uplatněním v medicíně. Probst et al. [162] například testovali aplikovatelnost křemičitých mikrovláken o průměru 10 – 100 μm , sestávajících z klastrů nanočástic o průměru 5 nm, pro regeneraci chrupavčité tkáně. Stejný materiál, jehož struktura může být popsána vzorcem $[\text{Si}(\text{OH})_{0.2}\text{O}_{1.9}]_n$ (vychází z $[\text{Si}(\text{OH})_y\text{O}_{2-y/2}]_n$) měl prokazatelně pozitivní účinek na hojení kožních poranění a angiogenezi díky uvolňování kyseliny orthokřemičité [114, 87].

Při optimalizaci koncentrace prekurzoru a viskozity pro podmínky elektrostatického zvláknění je možné metodou sol-gel připravit také nanovlákna s průměrem vláken pod 1000 nm. Choi et al. [163] byli při zachování molárního poměru TEOS: ethanol: voda: HCl 1: 2: 2: 0.01 v reakční směsi schopni jehlovým elektrostatickým zvlákněním připravit nanovlákna s průměrem zhruba 500 nm. Stejný molární poměr a metodu zvláknění ve své práci použili také Loccufier et al. [164]. Ti prokázali silnou závislost mezi viskozitou solu a morfologií a kvalitou nanovláken. Při viskozitě 65 mPa.s vykazovala jimi připravená nanovlákna nerovný povrch a početné koráلكové defekty, zatímco při viskozitě 398 mPa.s byla formována hladká mikrovlákna (viz obrázek 19.) Šlamborová et al. uvádějí širší rozpětí molárního poměru nutného pro elektrostatické zvláknění křemičitého solu – a to TEOS: voda: HCl 1: 1.6-3: 0.001-1 při zachování koncentrace solu 28 – 44%. Takové rozpětí podmínek by mělo umožňovat přípravu vláken s průměry v rozmezí 100 až 1000 nm. Dále uvádějí možnost tepelné úpravy při teplotách až do 850 °C bez změny morfologie vláken [159].

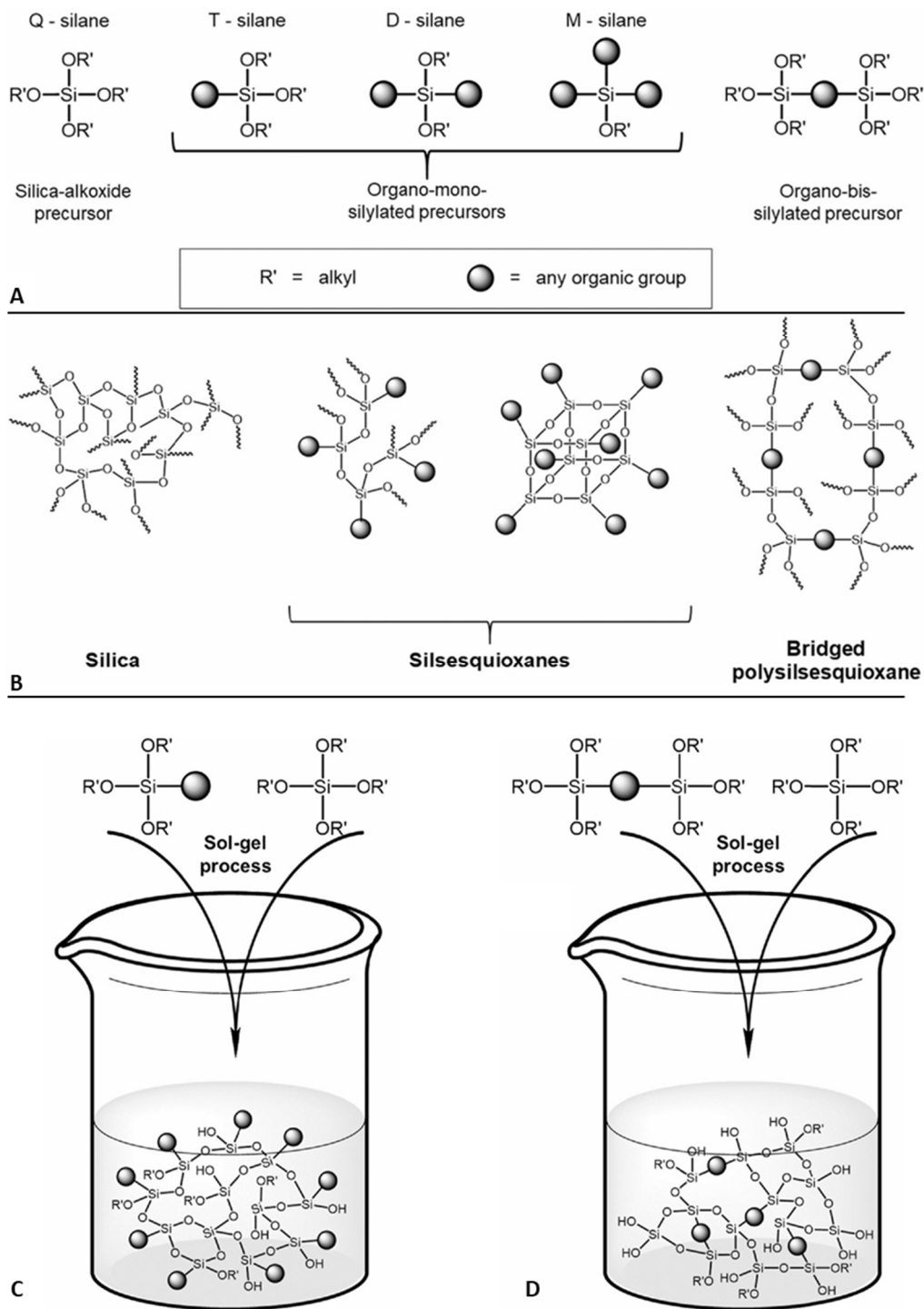


*Obr. 19 Vliv viskozity na morfologii čistě křemičitých nanovláken připravených jehlovým elektrostatickým zvlákněním.
Reprodukováno z [164].*

Zcela novou oblastí přípravy nanovláken metodou sol-gel je využití organoalkoxysilanů v podobě mono- či vícefunkčních organoalkoxysilanů k získání hybridních organicko-anorganických nanovláken s unikátní strukturou a vlastnostmi [11]. Prekurzory v tomto případě procházejí stejným procesem hydrolyzy a kondenzace jako v případě tetraalkoxysilanů TEOS a TMOS, ovšem jejich organické funkce jsou do vznikajících řetězců zapojovány v závislosti na struktuře molekuly prekursoru a nikoli pouze na základě pH reakce a molárních poměrů složek reakční směsi. Molekulární struktura prekursorů, souhrnně označovaných jako organo-mono-silylované prekurzory, je $\text{Si}(\text{OR}')_x\text{-R}_{4-x}$, kde $x = 1-3$, a obsahuje jak hydrolyzovatelné alkoxy $\text{Si-OR}'$ jednotky, tak i stabilní Si-R skupiny, kde R může být v principu jakákoli organická funkční skupina (alkyl, aryl, akryl, epoxy, aminoskupina a další) nebo molekula. Oproti tomu organo-bis-silylované prekurzory, tedy trialkoxysilany přemostěné organickou skupinou, mají strukturu $[(\text{R}'\text{O})_3\text{Si-R-Si}(\text{OR}')_3]$, kde R' je hydrolyzovatelná methoxy nebo ethoxy skupina, a R je přemostující bifunkční organická skupina či molekula. Využití organo-bis-silylovaných prekursorů při syntéze umožňuje vznik přemostěných silsesquioxanů a periodických mezoporézních organosilikátů (PMO) s vysoce porézní vnitřní strukturou [11]. Přehled možných struktur prekursorů a silsesquioxanů je uveden na obrázku 20.

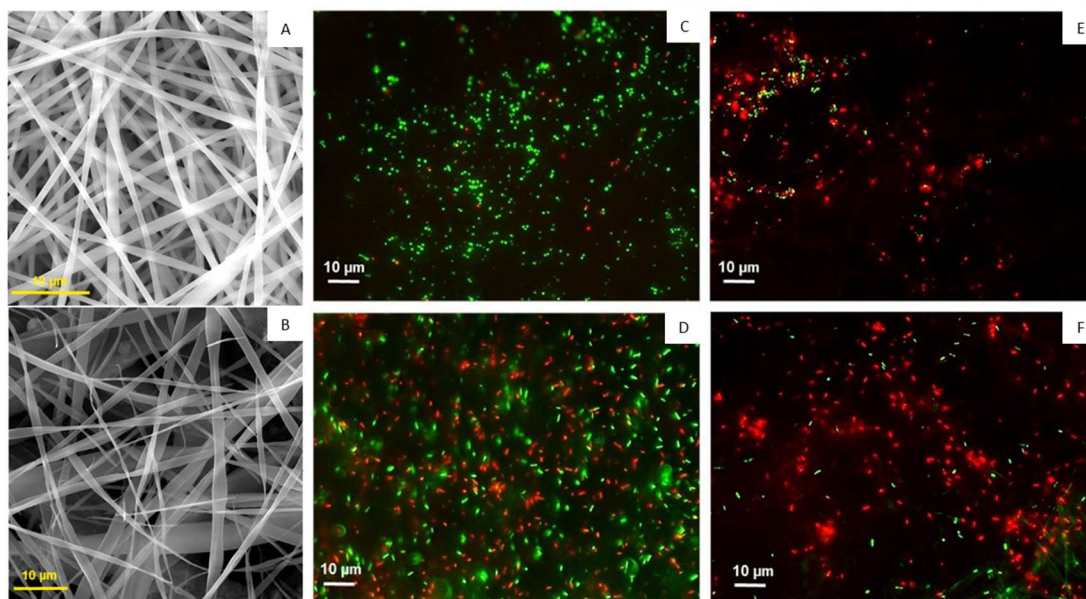
Organo-bis-silylované prekurzory byly v sol-gel syntéze testovány již v 50. letech 20. století, ovšem až v nedávné době bylo popsáno zpracování těchto molekul do nanovláken. Při přípravě čistě organosilanových nanovláken mohou být do reakční směsi přidávány tetraalkoxysilany za účelem zlepšení zvláknitelnosti solu. Nanovláčka mohou být připravena elektrostatickým zvlákněním, tažením nebo samoorganizací [11].

Tao et al. [88] popsali přípravu čistě organosilanových nanovláken připravených elektrostatickým zvlákněním trialkoxysilanu přemostěného porfyrinovou jednotkou.



Obr. 20 Schéma různých struktur organosilanů a struktur z nich vytvořených. (A) Srovnání struktury tetraalkoxysilanu (Q-silan) jako prekurzoru sol-gel syntézy, organo-mono-silylovaných prekurzorů – trialkoxysilan (T-silan), dialkoxysilan (D-silan), monoalkoxysilan (M-silan) a organo-bis-silylovaného prekurzoru. (B) Srovnání vnitřní struktury křemičitých materiálů připravených z tetraalkoxysilanu a silsesquioxanů připravených z organosilanů. Srovnání vnitřní struktury hybridních materiálů připravených (C) kombinací tetraalkoxysilanu s organo-mono-silylovaným prekurzorem a (D) kombinací tetraalkoxysilanu s organo-bis-silylovaným prekurzorem. [11].

Arslan et al. byli schopni připravit nanovláknna na bázi floroalkoxysilanu Dysilan F8261 se superhydrofóbním povrchem [11]. Holubová et al. [69] popsali přípravu nanovláken kombinujících 1,4-bis(triethoxysilyl)benzen ve směsi s TEOS, kterou provedli jehlovým i bezjehlovým elektrostatickým zvlákňováním. Hodnota molárního poměru silan: voda byl při sol-gel syntéze 2 při poměrech obou silanů 25:75, 50:50 a 75:25. Máková et al. [12] úspěšně připravili nanovláknna ze směsi TEOS a (1S, 2S)-cyklohexan-1,2-diamin-bis-silylovaného prekurzoru. Molárním poměr prekurzorů byl 57:43. Výsledná nanovláknna, označovaná jako DACH-silanová, měla průměr 330 ± 80 nm a byla prokazatelně biokompatibilní vůči myším fibroblastům 3T3-A31. Kromě toho vykazovala antibakteriální účinek vůči bakteriím *S. aureus* a *P. aeruginosa*, jak ukazuje obrázek 21. Tento nanovláknenný materiál je zajímavým kandidátem pro aplikaci v dermatovenerologii při léčbě kontaminovaných ran. Lai et al. popsali přípravu mezoporézních nanovláken ze směsi TEOS a chloropropyltriethoxysilanu (CPTES) určených k výrobě nanokompozitů [165].



Obr. 21 Organosilanová nanovláknna připravená elektrostatickým zvlákňováním (A) směsi TEOS s 1,4-bis(triethoxysilyl)benzenem a (B) TEOS s (1S,2S)-cyclohexane-1,2-diamine – bis – silylovaným prekurzorem. Viabilita bakterií *S. aureus* (C) a *P. aeruginosa* (D) na povrchu čistě tetraalkoxysilanových nanovláken ve srovnání s viabilitou bakterií *S. aureus* (E) a *P. aeruginosa* (F) na povrchu nanovláken ze směsi TEOS s (1S,2S)-cyclohexane-1,2-diamine – bis – silylovaným prekurzorem. (zelená = živé, červená = mrtvé bakterie) [43, 48].

Do skupiny křemičitých nanovláken připravovaných bez nosného polymeru lze zařadit také nanovláknna bioaktivních skel. Ta mohou být kromě jiných metod připravována i metodou sol-gel založenou na kombinaci tetraalkoxysilanu a anorganických solí, čímž

vzniká základní struktura $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, která je využitelná především při regeneraci kostí tkáně. Vzhledem k obtížné zvláknitelnosti však zvláknování bioskel často využije zapojení nosného polymeru – např. PVA, chitosanu nebo polyvinylbutyralu (PVB) [166, 167, 168, 169].

3.4.4 Funkcionalizace křemičitých nanovláken

Funkcionalizace křemičitých nanovláken popsané v dostupné literatuře je možné rozdělit do dvou skupin na (i) funkcionalizace prováděné ve hmotě nanovláken a (ii) funkcionalizace prováděné na jejich povrchu.

3.4.4.1 Funkcionalizace nanovláken ve hmotě

Funkcionalizace nanovláken ve hmotě je prováděna v průběhu procesu sol-gel před zvlákněním nebo při něm. Literatura popisuje funkcionalizaci inkorporací biologicky a katalyticky aktivních látek [71, 170, 171], nanočástic [172] i živých organismů [141]. Z antibakteriálně účinných látek byla popsána např. inkorporace dusičnanu stříbrného do reakční směsi ještě před zvlákněním. U takto připravených nanovláken byla prokázána antibakteriální účinnost vůči celé škále bakteriálních kmenů, včetně MRSA [71]. Oriero et al. popisují přípravu nanovláken PVA/SiO₂ obohacených o enzym tyrozinázu pro aplikaci v biosenzorice [171]. Xu et al. do hmoty křemičitých nanovláken úspěšně inkorporovali nanočástice yttria. Ty byly formovány až v procesu sol-gel syntézy z reakční směsi obsahující tetraalkoxysilan (TEOS), dusičnan yttritý, isopropanol, vodu a kyselinu dusičnou [172]. Již zmiňovanou inkorporaci bakteriálních buněk úspěšně provedli Tong et al. [141].

3.4.4.2 Povrchová funkcionalizace křemičitých nanovláken

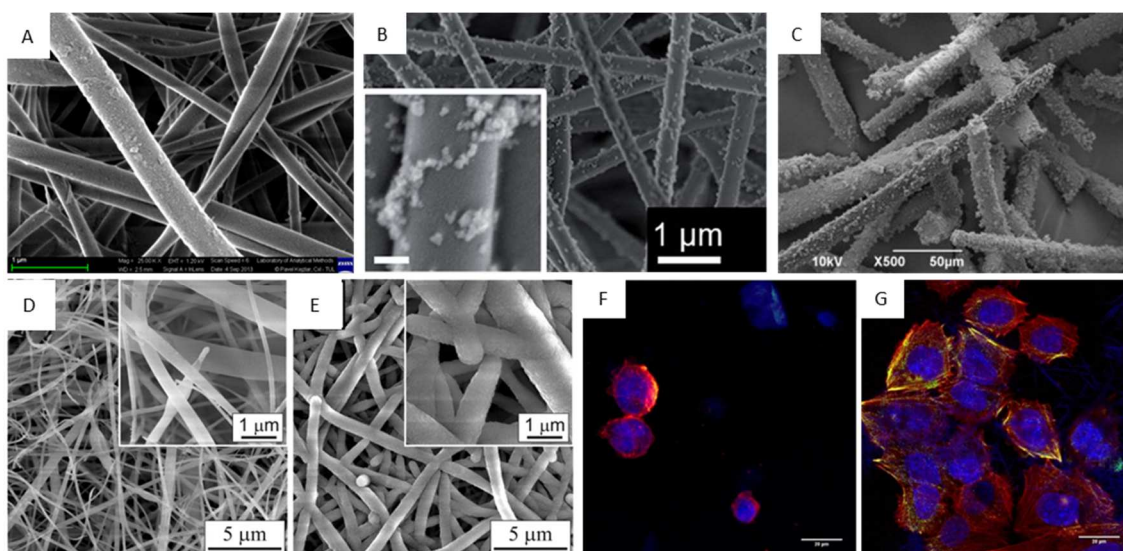
Daleko častěji je popisována funkcionalizace prováděná na povrchu čistě křemičitých i hybridních nanovláken. Povrch křemičitých nanovláken je, stejně jako u jiných materiálů tohoto typu, bohatým na silanolové skupiny, které jsou využívány k jeho další funkcionalizaci. V dostupné literatuře je popsána funkcionalizace jejich povrchu nanočásticemi [139, 142, 173], bioaktivními proteiny [143, 174, 175], organo-

sililyvanými prekurzory [140, 143, 159, 176, 177, 178, 179] i tenkými vrstvami [180, B65].

Nanočástice mohou být na povrch vázány prostou adsorpcí, jak popisují Zucker et al. [142], nebo pevnou vazbou. Trč et al. [173] popsali řešení umožňující dosažení prodlouženého uvolňování léčiva z křemičitých nanovláken díky jeho enkapsulaci do liposomů následně adsorbovaných na povrch křemičitých nanovláken. Tato struktura je vhodná například k ošetření kontaminovaných nehojících se ran. Veverková et al. [139] úspěšně vytvořili nanovláčenné substráty s nanočásticemi stříbra a mědi syntetizovanými přímo na povrchu nanovláken, kde volné silanolové skupiny sloužily jako výchozí body pro jejich nukleaci. U nanovláken pokrytých částicemi stříbra byla potvrzena inhibice bakterií *E. coli*. Povrchová úprava křemičitých nanovláken pro biotechnologické a medicínské účely je často prováděna silanizací funkčními alkoxysilan, nejčastěji aminoalkoxysilany. Několik autorů například popisuje silanizaci 3-aminopropyltriethoxysilanem (APTES). Ten je preferován zejména díky biokompatibilitě vedlejšího produktu hydrolyzy, kterým je ethanol. Možností zvýšení účinnosti silanizace APTES předúpravou povrchu nanovláken plazmatem se zabývají Růžek [176] a Tománková a Rysová [177]. Dalším využívaným aminoalkoxysilanem je APTMS. Silanizaci 3-aminopropyltrimethoxysilanem (APTMS) ve své práci využili například Feng et al. [143] ke zlepšení buněčné adheze k povrchu nanovláken. Aminoalkoxysilanem funkcionalizovaný povrch může být následně také využit k vazbě dalších molekul, ať už prostřednictvím kovalentní vazby, jako popisují Danilová et al. [175], nebo vodíkovými můstky. Vodíkové můstky byly využity k vazbě na povrch silanizovaný APTES například u kyseliny tříslové [178] nebo antibiotika tetracyklin [179]. V obou případech byla potvrzena antibakteriální účinnost funkcionalizovaných nanovláken vůči bakteriím *E. coli* a *S. gallinarum*. Vazba vodíkovými můstky byla popsána také u proteinů lysozymu, TGF- β 1 [174] a poly-L-lysinu [143]. Kovalentní vazbu enzymu esteráza na povrch nanovláken nejprve silanizovaný organoalkoxysilanem (APTES) potom popisují Danilová et al. [175]. Takto připravená katalyticky aktivní nanovláčna mají využití v léčbě ran při odstraňování nekrotické tkáně (debridementu). Využití funkcionalizace povrchu silanizací je využitelné i v biotechnologiích. Yue et al. [140] úspěšně silanizovali povrch nanovláken 3-bromopropyl-trichlorosilanem (BPTCS), což vedlo k jeho hydrofobizaci. Připravený

substrát byl testován pro selektivní odstraňování stopových množství insekticidu dieldrin z vody.

Modifikace povrchu křemičitých nanovláken může být prováděna také tvorbou tenkých vrstev chemickými a fyzikálními metodami. Merlini et al. [181] úspěšně povlakovali křemičitá nanovlákná tenkou vrstvou polypyrrolu (PPy) vytvořenou *in situ* oxidativní polymerací pro zvýšení vodivosti vláken. Steinerová et al. [180] úspěšně povlakovali křemičitá nanovlákná nanokrystalinní diamantovou vrstvou (NCD) prostřednictvím chemické depozice z plynné fáze. Terminace vrstvy kyslíkem (O-NCD) a vodíkem (H-NCD) byla dosažena následnou plazmatickou úpravou. Tato úprava vedla ke snížení biodegradability nanovláken zneprístupněním jejich povrchu a k významnému zlepšení adheze a proliferace lidských osteoblastních buněk Saos-2. U nanovláken $\text{SiO}_x\text{-NCD-O}$ došlo také k významné upregulaci produkce kolagenu typu I, alkalické fosfatázy a vinkulinu, což dělá z tohoto vlákenného scaffoldu zajímavého kandidáta pro tkáňové inženýrství kosti.

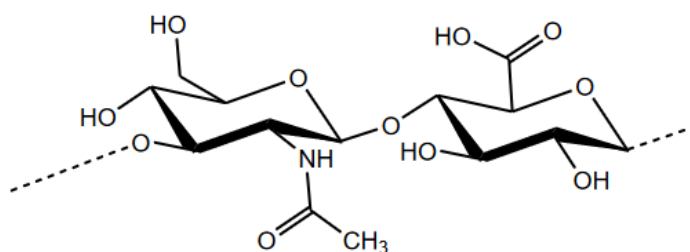


Obr. 22 Křemičitá nanovlákná povrchově funkcionalizovaná různými metodami. Nanovlákná s (A) kovalentně vázaným enzymem, (B) adsorbovanými nanočásticemi CeO_2 , (C) vrstvou polypyrrolu a nanovlákná před nánosem tenké nanokrystalinní diamantové vrstvy (SiO_x , D) a po něm ($\text{SiO}_x\text{-NCD-O}$, E). Vizualizace buněk Saos-2 kolonizujících neupravená nanovlákná (SiO_x , F) a O-NCD povrstvená nanovlákná (G). Vinkulin zobrazen červeně, F-aktin zeleně a jádra buněk modře [142, 181, 180].

4 Kyselina hyaluronová

4.1 Struktura kyseliny hyaluronové

Struktura kyseliny hyaluronové (HA) byla poprvé popsána Karlem Meyerem a Johnem Palmerem roku 1934 jako nový polysacharid izolovaný ze sklivce skotu. Dnes používanější název – hyaluronan, byl přijat v roce 1986. Jedná se o přírodní polysacharid spadající do rodiny glykosaminglykanů, jehož makromolekuly se skládají z opakující se disacharidové jednotky sestávající z (β -1-4)-D-glukuronové kyseliny (GlcA) a (β -1-3)-N-acetyl-D-glukosaminu (GlcNAc) (obr. 23) vzájemně vázaných přes glykosidickou vazbu.



Obr. 23 Struktura dvou disacharidových jednotek kyseliny hyaluronové. Každá jednotka je tvořena (β -1-4)-D-glukuronovou kyselinou a (β -1-3)-N-acetyl-D-glukosaminem [183].

Kyselina hyaluronová jako jediná z glykosaminglykanů neobsahuje sulfátovou skupinu a přirozeně se vyskytuje ve formě obřích makromolekul (přesahujících i 10 MDa). Její přirozený výskyt byl doložen v řadě tkání, kde zastává mnoho fyziologicky významných funkcí – reguluje množství vody v některých tkáních, je schopna lubrikace a má také řadu strukturních a výplňkových vlastností. Představuje hlavní makromolekulární složku mezibuněčné hmoty většiny pojivových tkání např. chrupavky, kde díky svým viskoelastickým vlastnostem napomáhá absorpci rázového šoku. V tkáních se většinou vyskytuje ve formě agregátů s dalšími složkami ECM (zejména proteoglykany). Nejčastějším z těchto agregátů je agrekan [15, 17, 184, 185, 186, 187].

Výskyt kyseliny hyaluronové v nativních tkáních a kapalinách je významně ovlivněn nejen živočišným druhem, ale také věkem jedince. Všeobecně je možné říci, že HA se vyskytuje v zastoupení 1 - 100 μ g HA/g hydratované tkáně u většiny orgánů a její podíl, stejně jako molekulová hmotnost, s věkem klesají. V některých typech pojivové tkáně

se pak vyskytuje podíl vyšší. Ten je typický například pro lidskou kůži obsahující 400 – 500 μg HA/g tkáně (převážně dermis), kde molekulová hmotnost HA dosahuje hodnot 4 - 6 MDa. Velmi vysoký podíl HA (500 – 2500 μg HA/g tkáně) se vyskytuje také v chrupavce, kde její molekulová hmotnost dosahuje 2 MDa. Většina dalších tkání lidského těla obsahuje molekuly HA o rozměru > 1000 kDa. Výskyt nízkomolekulární HA je typický pro některé tělní kapaliny jako sérum, které obsahuje < 40 ng HA/ml o rozměru 100-300 kDa. Nízkomolekulární kyselina hyaluronová se však vyskytuje také v mateřském mléce (~440 kDa), slinách či moči [188].

Díky své struktuře se kyselina hyaluronová přirozeně vyskytuje v nabitě formě. Jako polyelektrolyt ($\text{pK} \sim 3-4$, 2.5) nese její molekula negativní povrchový náboj -0.32 C/ m^2 , což ovlivňuje možnosti její zpracovatelnosti a také umožňuje elektrostatické interakce s dalšími molekulami. Struktura HA umožňuje různé modifikace výhodné zejména pro aplikaci v medicíně [183, 189, 190]. Současný rozsah komerčního využití kyseliny hyaluronové a jejích derivátů v medicíně a kosmetice umožnily nové metody její produkce. Zatímco dříve se využívala zejména extrakce z různých živočišných tkání – např. pupeční šňůry, kohoutích hřebenů, synoviální tekutiny nebo sklivce, což omezovalo možnosti její produkce, v dnešní době je HA produkována bakteriálně. Jedná se o snadno kontrolovatelnou produkci mikrobiální fermentací (např. druh *Streptococcus*). Její použití předchází nebezpečí obsahu zvířecích patogenů a také umožňuje získání široké škály derivátů. Metoda spočívá v přirozeném nebo umělém (transfekcí dosaženém) obsahu enzymů typu glykosyltransferáz zvaném HA syntetázou, které jsou schopny produkci HA v těle vybraných organismů katalyzovat [191].

4.2 Bioaktivita kyseliny hyaluronové

Využití kyseliny hyaluronové v medicínských aplikacích je široké zejména vzhledem k různorodosti efektů jejího působení. To je závislé nejen na místě aplikace, ale i formě HA a délce jejího řetězce. Stejně jako v případě fyziologického výskytu HA v tkáních [184, 186], tak i v případě biomedicínských a technologických aplikací hraje molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové významnou roli [13, 14].

Z pohledu biomedicínských aplikací hraje kyselina hyaluronová významnou roli jak v regenerativní ortopedii, tak i estetické chirurgii a tkáňovém inženýrství.

Pro řadu aplikací v regenerativní medicíně je významná schopnost lubrikace tkání a úpravy osmotické rovnováhy. Lubrikační schopnosti HA nacházejí využití zejména ve

- (i) viskochirurgii – za účelem ochrany jemných tkání mezi jednotlivými operacemi,
- (ii) viskoaugmentaci – jako výplň zejména kožní tkáně,
- (iii) viskoreparaci – jako oddělovací materiál zdravé a traumatizované tkáně,
- (iv) viskosuplementaci – jako náhrada tělních tekutin (zejména synoviální tekutiny) [184, 192].

V případě využití kyseliny hyaluronové v tkáňovém inženýrství a regeneraci tkání je využívána zejména lubrikační schopnost, protizánětlivý efekt, schopnost podpory angiogeneze a také její pozitivní vliv na proliferaci fibroblastů. Pro tkáňové inženýrství všech typů tkání potom kromě všeobecné podpory buněčné proliferace hraje roli také interakce HA s řadou buněčných receptorů. Například vazba receptoru CD44 na HA hraje významnou roli při buněčné adhezi ke složkám ECM a tím výrazně stimuluje buněčnou agregaci, proliferaci, migraci a také angiogenezi. Kromě receptoru CD44, jsou svou interakcí s HA známy také RHAMM a ICAM-1. ICAM-1 hraje významnou roli pro buněčnou adhezi u zdravé a zánětlivé tkáně. Interakce buněk s molekulami HA také aktivuje řadu proteinových a serinových kináz a kináz fokální adheze. Je třeba zmínit, že řada těchto dějů je na buněčné úrovni přísně selektivní a význam zde hraje také molekulová hmotnost interagující HA [187].

Již v 1973 potvrdili Antonos et al. možnost zlepšení stavu degenerované chrupavky aplikací roztoků nebo jiných forem HA. Efekt HA je při takové aplikaci dvojitý, neboť makromolekuly HA umožňují lubrikaci chrupavky a zároveň pozitivně působí na chondrocyty, u kterých podporuje syntézu proteoglykanů a redukuje produkci a aktivitu prozánětlivých mediátorů. Kromě toho byla prokázána schopnost kyseliny hyaluronové napomáhat při udržení fenotypu chondrocytů [184, 192]. V tkáňovém inženýrství meziobratlových plotének – konkrétně nucleus pulposus, se také využívá právě lubrikační a další schopnosti HA při konstrukci scaffoldů ve formě hydrogelu. Kromě toho bylo *in vitro* studii potvrzeno, že přítomnost makromolekul HA ve struktuře scaffoldu vede ke zvýšené produkci kolagenu typu II a agrekanu v nově produkované ECM nucleus pulposus [187].

Byl popsán také významný vliv kyseliny hyaluronové na imunitní systém, kde ovlivňuje chování buněk imunitního systému a redukuje prozánětlivé mediátory. V závislosti na molekulové hmotnosti modifikuje chování leukocytů a migraci a agregaci makrofágů

[13, 184, 192]. Komplexní přehled vlivu kyseliny hyaluronové na buňky imunitního systému poskytují Kaul et al. [193]. Lee et al. [14] prokázali vliv molekulové hmotnosti HA na polarizaci makrofágů. Expozice vysokomolekulární HA (> 1,250 kDa, 100 µg/ml) vedla k poklesu exprese prozánětlivých genů (TNF- α , IL-6, CCL2, IL-1 β) a zároveň došlo z nárůstu u genů spojovaných s protizánětlivým fenotypem M2 makrofágů (TGF- β 1, IL-10, IL-11, a Arg1). Byla tedy prokázána schopnost vysokomolekulární kyseliny hyaluronové inhibovat zánět a stimulovat protizánětlivou reakci. Oproti tomu u kyseliny hyaluronové se střední molekulovou hmotností (100-500 kDa) vedla expozice k zvýšení exprese prozánětlivých genů.

Význam molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové byl popsán také pro její využití při hojení ran. Pozitivní vliv HA na hojení kůže popsali již v roce 1999 Chen et al. [17] a stále jsou objevovány nové aspekty jejího účinku [13, 17, 15, 16]. Kyselina hyaluronová stimuluje při hojení ran různé procesy v závislosti na fázi hojení. V průběhu zánětlivé fáze váže fibrinogen a zahajuje signalizační kaskádu srážení, podporuje migraci prozánětlivých buněk a zároveň inhibuje migraci neutrofilů. V průběhu proliferační fáze podporuje proliferaci fibroblastů do rány, hydratuje nově formovanou ECM a stimuluje metaloproteinázy a podporuje migraci a proliferaci keratinocytů. V průběhu remodelační fáze potom ovlivňuje jizvení. Všechny tyto jsou ovlivňovány nejen koncentrací kyseliny hyaluronové, ale především molekulovou délkou jejího řetězce [15, 16]. Vysokomolekulární HA zlepšuje viabilitu fibroblastů a podporuje diferenciaci monocytů na fibroblasty, zatímco nízkomolekulární HA tento proces inhibuje [194, 195]. Vliv kyseliny hyaluronové na keratinocyty je také regulován její molekulovou délkou. S rostoucí molekulovou Ha délkou roste migrace a vysokomolekulární HA upreguluje expresi interleukinů IL-1 β , IL-8, VEGF, MMP-8 a MMP-13, což svědčí o podpoře re-epitelizace [196, 197].

V souvislosti s medicínskými aplikacemi kyseliny hyaluronové zejména v dopravě léčiv je pozornost věnována také vlivu vnějších podmínek na konformaci makromolekul HA. Xu et al. popsali schopnost makromolekul HA reagovat i na mírné změny pH a tedy měnit kinetiku uvolňování léčiva v závislosti na podmínkách v tkáni. Zaznamenali významné snížení rychlosti uvolňování léčiva při posunu pH k hodnotě 7.4 [198]. Podobným jevem se ve své práci zabývali také Torre and Castellano [199]. Tato schopnost makromolekul HA, daná především jejich povrchovým nábojem, představuje zajímavou možnost regulace dávkování léčiva například u kontaminovaných ran, kde míra kontaminace a fáze hojení přímo ovlivňují pH rány [200, 201, 202, 203].

4.3 Biomateriály na bázi kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je v tkáňovém inženýrství aplikována především v podobě hydrogelů a porézních struktur vytvořených např. metodou lyofilizace nebo 3D tisku. Využitelnost hydrogelů byla studována například pro tkáňové inženýrství kostí, myokardu a nervové tkáně [204, 205, 206, 207]. Rozsáhlý výčet forem a aplikací kyseliny hyaluronové v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně uvádějí Neuman et al. [208].

V dopravě se léčiv je kyselina hyaluronová využitelná především ve formě nanočástic [209], nanovláken, nanogelů [210] a konjugátů s léčivými nebo povrchem nanočástic [211].

Přípravou nanovláken kyseliny hyaluronové se zabývá celá řada prací. Omezujícím faktorem je zde molekulová hmotnost vedoucí k vysoce viskózním a obtížně zvláknitelným roztokům [212, 213, 214]. Vzhledem k vysoké viskozitě a gelaci není u vysokomolekulární HA možné dosáhnout dostatečně koncentrovaných vodných roztoků. Gelace vodného roztoku HA se projevuje již při nízkých koncentracích, kdy zapletení polymerních řetězců a vysoká elasticita roztoku znemožňují účinnou formaci polymerních trysek a následně i vláken. Řešením může být vhodná volba rozpouštědla, popřípadě zvláknění kyseliny hyaluronové ve směsi s jiným polymerem, který umožňuje elektrostatické zvláknění z roztoku. Jako pomocné polymery byly testovány například želatina [215, 216] a polyethylenoxid (PEO) [217, 218, 219]. Vzhledem k vlivu odpudivých sil mezi ionogenními skupinami a přítomnosti vodíkových můstků na viskozitu roztoku ve vodě, byly studovány také zvláknovací roztoky s použitím alternativního rozpouštědla, které tyto interakce oslabují. Použití směsi dimethylformamidu (DMF) ve směsi s vodou a kyselinou mravenčí vedlo k úspěšnému zvláknění kyseliny hyaluronové [220].

Vzhledem k vysoké rozpustnosti HA ve vodě je pro zajištění stability při fyziologických podmínkách nutné síťování. To je možné provádět různými metodami na neupravených molekulách HA nebo na jejích derivátech.

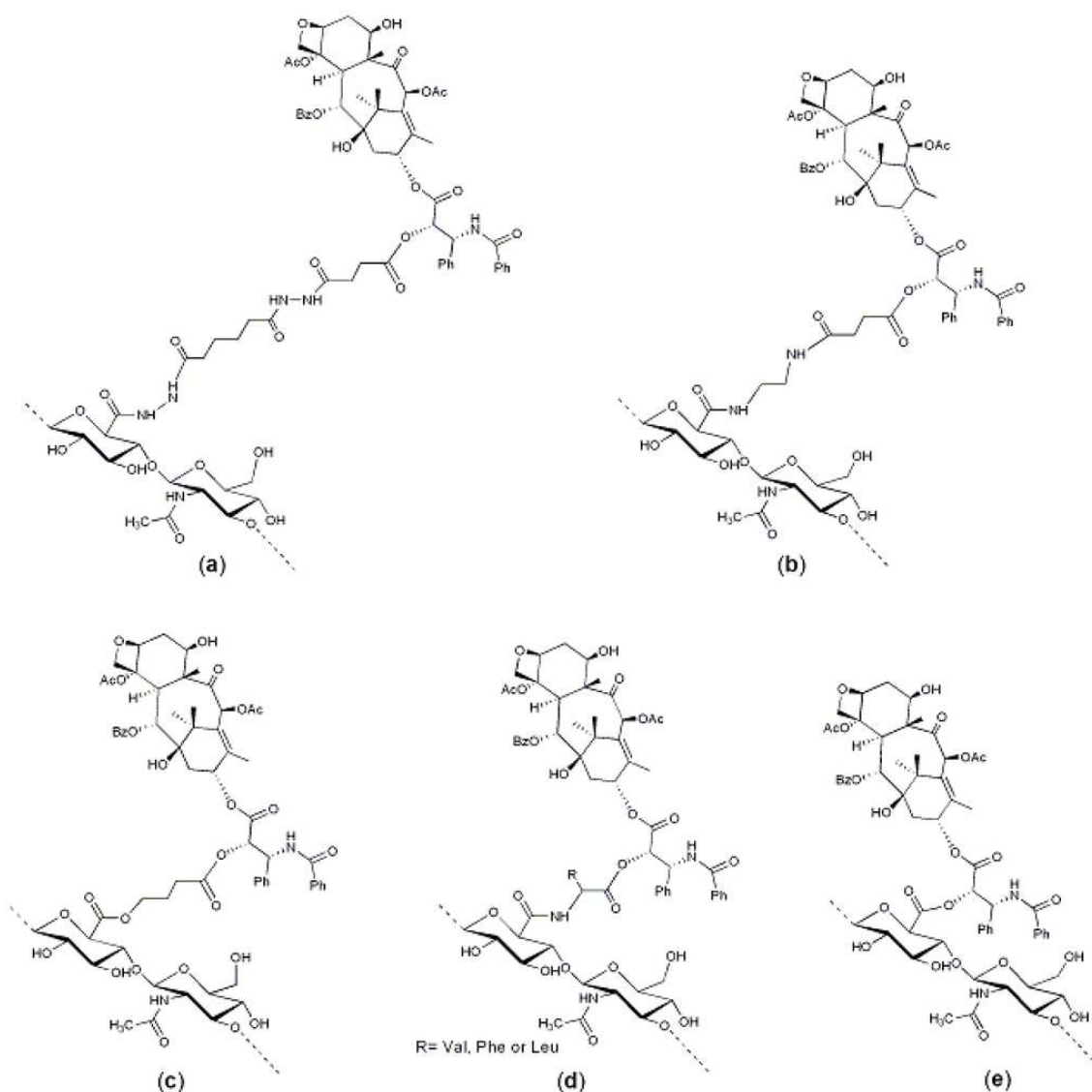
4.4 Modifikace kyseliny hyaluronové

Pro sítování, konjugace a modifikace kyseliny hyaluronové jsou využívány reakce na hydroxylových (-OH), karboxylových (-COOH) skupinách a na N-acetylu acetamidových skupin (-NHCOCH₃). Tyto děje využívají shodné chemické reakce k dosažení specifických struktur se zlepšenou stabilitou ve vodném prostředí a nižší degradací (sítování) [221, 222], modifikovanou chemickou strukturou a novými vlastnostmi (např. thiolace) [223], nebo ke konjugaci dalších molekul se specifickým účinkem (většinou léčivem) [221, 185, 211, 183] Tyto modifikační reakce probíhají ve vodném prostředí nebo v organickém rozpouštědle. Ta se využívají v případě konjugace sloučenin citlivých na hydrolýzu. Většinou se jedná o dimethylformamid (DMF) nebo dimethylsulfoxid (DMSO) [221].

Mezi reakce prováděné na karboxylové funkční skupině kyseliny hyaluronové patří amidace, Ugiho kondenzace, esterifikace a oxidace. Hydroxylové skupiny jsou potom využívány k modifikacím prostřednictvím tvorby etherů, hemiacetalů, karbamátů a k esterifikaci. Acetamidová skupina může být modifikována deacetylací a následně využita k amidaci. Kompletní přehled možností modifikací řetězce kyseliny hyaluronové poskytují Schanté et al. [221].

4.4.1 Konjugace kyseliny hyaluronové pro dopravu léčiv

V dopravě léčiv má konjugace několik důvodů. Jsou jimi (i) zlepšení stability léčiva, (ii) zlepšení rozpustnosti a biodostupnosti ve vodě nerozpustných léčiv, (iii) zlepšení biokompatibility a (iv) cílený transport a prodloužené uvolňování. Cílený transport s využitím řetězců HA konjugovaných přímo s léčivem nebo s nanočásticemi nesoucími enkapsulované léčivo využívá specifické interakce HA s řadou buněčných membránových receptorů. Ty jsou využívány zejména v protinádorové terapii. Důvodem je zvýšené množství receptorů kyseliny hyaluronové (CD44, RHAMM)u řady typů nádorů. To umožňuje selektivní interakce konjugátů s vybraným typem buněk a zvýšenou internalizací léčiva do jejich hmoty [221, 185, 211, 183]. Konjugace kyseliny hyaluronové byla popsána u řady léčiv i nanočástic. Ucelený přehled konjugátů kyseliny hyaluronové pro dopravu léčiv a genovou terapii uvádějí Arpicco et al. [224].



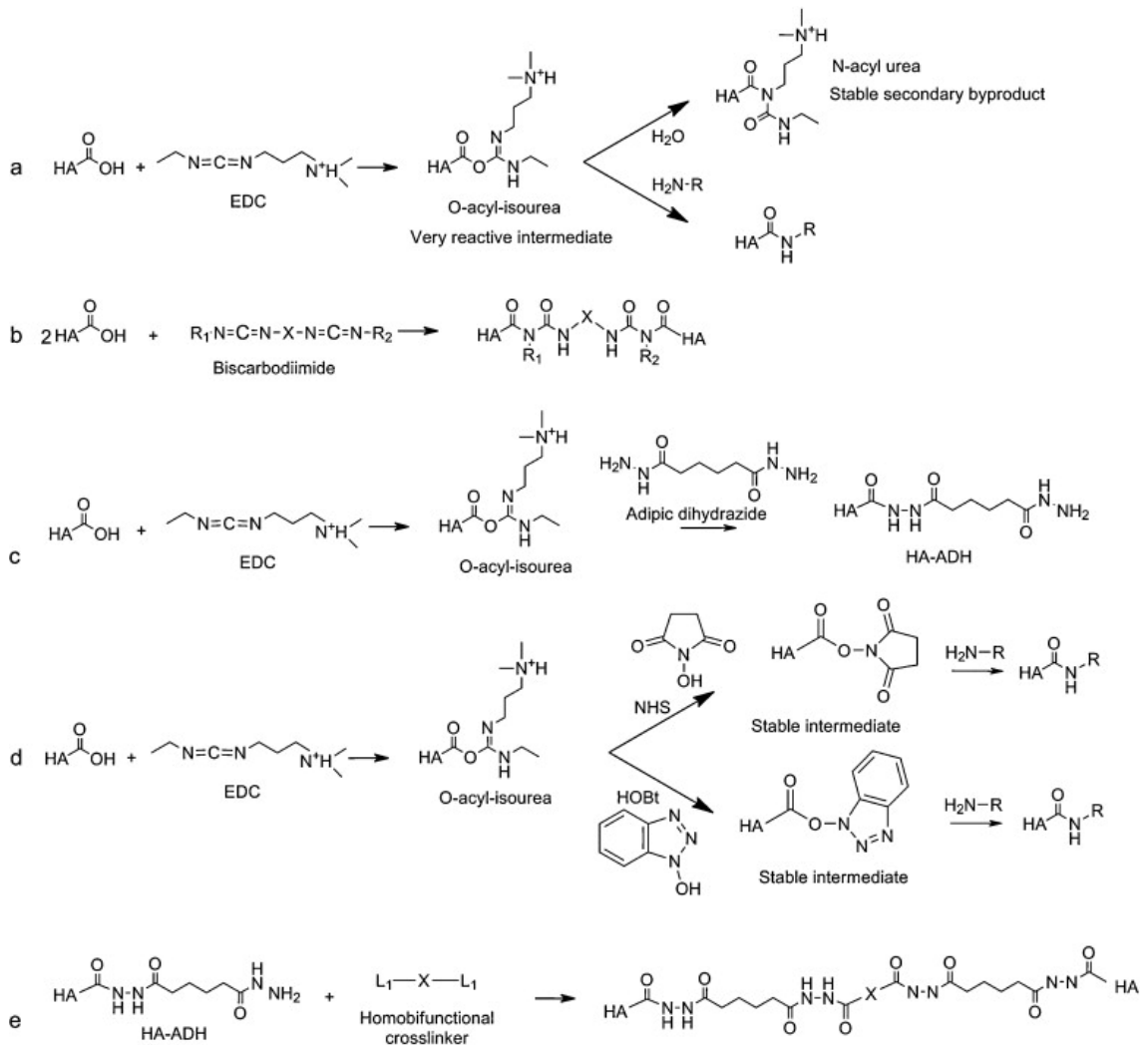
Obr. 24 Příklady struktur konjugátů HA a léčiva paclitaxel s různou délkou linkeru. (a) konjugát vytvořený vazbou hemisuccinátem NHS aktivovaného esteru paclitaxelu a HA-ADH derivátu, (b) konjugát vytvořený vazbou hemisuccinátem NHS aktivovaného esteru paclitaxelu a HA-ADA derivátu, (c) konjugát 2'-paclitaxel-4-bromobutyrátu a HA, (d) konjugace derivátu paclitaxelu s aminokyselinou k HA aktivované karbodiimidem, (e) konjugace paclitaxelu na HA-COOH prostřednictvím dicyclohexylcarbodiimidu (DCC)/dimethylaminopyridinu (DMAP) [183].

Volba konkrétní metody konjugace je dána funkčními skupinami dostupnými na molekule léčiva či nanočástici. Ke konjugaci HA v dopravě léčiv se nejčastěji využívá konjugace přes karboxyl (HA-COOH) prostřednictvím esterifikace nebo amidace. Esterifikace je prováděna v bezvodém prostředí (většinou DMSO) s použitím například halogenalkanů, epoxydů nebo diazomethanu [221]. Oproti tomu rozpouštědlový systém pro amidaci je volen na základě použitého aktivačního činidla. V případě použití 2-

chloro-1-methylpyridium iodidu (CMPI) je to organické rozpouštědlo, což umožňuje konjugace ve vodě špatně rozpustných léčiv. Konjugaci ve vodném prostředí umožňuje amidace prostřednictvím karbodiimidů. Z nich je nejčastěji využíván 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC). Reakční mechanismus spočívá v aktivaci karboxylu (HA-COOH) pomocí EDC ze vzniku nestabilní O-acylisomočoviny. Následuje nukleofilní atak aminem na aktivovanou HA, který vede ke vzniku amidické vazby. Vysoká reaktivita O-acylisomočoviny vede k její reakci s vodou za vzniku stabilní N-acylmočoviny a znemožňuje další konjugaci s aminem. Vzhledem k tomu jsou do reakce zapojovány pomocné látky umožňující vznik přechodných produktů odolných k hydrolýze, které zvyšují stabilitu reakce a její výtěžnost. Jsou jimi N-hydroxysuccinimid (NHS) N-hydroxysulfosuccinimid (sulfo-NHS) a 1-hydroxybenzotriazol (HOBT). I s jejich zapojením je konjugace prostřednictvím karbodiimidů citlivá na podmínky a silně závislá na pH jednotlivých reakčních kroků. Pro aktivaci HA EDC jsou vhodné kyselé podmínky, zatímco amidace je nejúspěšnější při použití vyššího pH, kdy je amin deprotonovaný. Pro překonání tohoto rozporu mohou být použity dvoukrokové reakce, umožní-li to konjugovaný materiál a stabilita meziprojektu formovaného na karboxylu. V případě jednokrokové konjugace je nutná optimalizace podmínek reakce – zejména s ohledem na pH. Bylo prokázáno, že použití pH kolem 4.75 může díky protonaci aminu vést ke vzniku N-acylmočoviny [221]. Příklady reakčních schémat konjugace kyseliny hyaluronové s použitím EDC a aditiv je uvedena na obrázku 25 A, D.

Literatura uvádí řadu příkladů konjugace kyseliny hyaluronové na nanomateriály s použitím karbodiimidové chemie. Pandolfi et al. [225] popisují konjugaci HA na povrch liposomů, kdy HA byla nejprve konjugována k řetězcům 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholinu (DPPC) s použitím dvoukrokové reakce. Aktivace EDC/NHS probíhala po dobu 2 hodina, navazovala na ni konjugace po dobu 6 hodin ve směsi voda/butanol. Připravený konjugát byl následně použit ke konstrukci liposomů pro ošetření plicní fibrózy. Byly popsány také konjugace HA na povrch polymerních a anorganických nanočástic [226, 227, 228]. Konjugaci kyseliny hyaluronové na povrch zlatých nanočástic (Au NPs) prostřednictvím EDC/NHS pro cílenou dopravu doxorubicinu popisují Lie et al. [228]. Funkcionalizaci křemičitých nanočástic konjugací HA popisují například Almeida et al. [229], Park et al. [230] a Yu et al. [231].

Všechny uvedené typy nanomateriálů byly testovány pro využití v protinádorové terapii.



Obr. 25 Příkladů amidací konjugací kyseliny hyaluronové.

Reakční schémata (a) amidace s aktivací EDC, (b) síťování HA s použitím biskarbodiimidu, (c) amidace HA s použitím EDC a dyhydrazidu kyseliny adipové, (d) amidace s použitím EDC a aditiv (NHS a HOBt) a (e) síťování HA amidací bifunkčním síťovacím činidlem [221].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Anorganická nanovláčna na bázi oxidu křemičitého představují zajímavý elektrostaticky zvláknitelný materiál s potenciálním využitím v hojení ran a dopravě léčiv, stejně jako další nanomateriály tohoto typu připravené metodou sol-gel [31, 79, 179]. Jejich nespornou výhodou jsou široké možnosti jejich povrchových modifikací, které umožňují roubování funkčních skupin na povrch bez narušení jejich vnitřní struktury [175, 179, 177] a mohou být využity k vazbě dalších molekul na jejich povrch – a to zejména léčiv [159, 175, 179]. Jejich nevýhodou je silně hydrofobní povrch omezující možnosti vazby a dopravy ve vodě rozpustných léčiv.

Kyselina hyaluronová představuje zajímavý, silně hydrofobický polysacharid s unikátními vlastnostmi a bioaktivitou spojovanou zejména s její molekulovou hmotností [195-197] a nábojem [199, 201].

Cílem této disertační práce bylo vyvinout biodegradabilní nanovláknenný systém využívající kombinaci těchto dvou materiálů a vyhodnotit jeho využitelnost při dopravě a *in situ* uvolňování kationních ve vodě rozpustných léčiv při zachování dalších relevantních charakteristik křemičitých nanovláken.

Experimentální část práce je rozdělena do tří kapitol, které na sebe vzájemně navazují a dokumentují vývoj materiálu včetně hodnocení relevantních charakteristik. Jsou jimi:

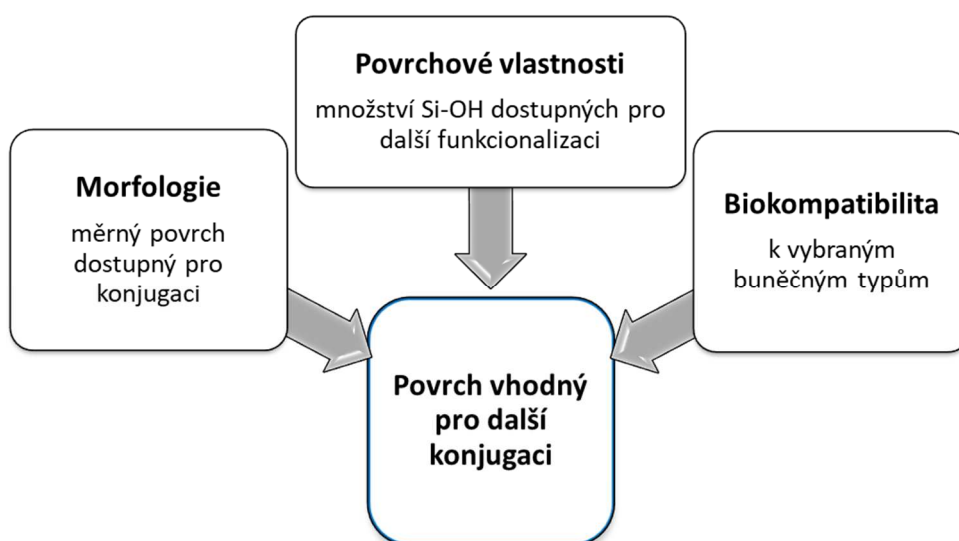
1. Příprava a charakterizace křemičitých nanovláken;
2. Konjugace kyseliny hyaluronové a charakterizace a
3. Hodnocení interakcí nanovláknenného systému s modelovými léčivy.

5 Příprava a charakterizace křemičitých nanovláken

5.1 Cíle

Jako nosný substrát pro další konjugaci a vazbu léčiv by měla křemičitá nanovláknina poskytovat co nejvyšší dostupný měrný povrch. Ten je dán morfologií nanovláken, zejména jejich průměrem, a je ovlivnitelný procesními parametry zvláknování a koncentrací polymerního roztoku. V případě křemičitých nanovláken připravených metodou sol-gel dochází při přechodu solu na gel ke změnám vnitřního uspořádání, které se projevují změnou viskozity bez změny koncentrace a mají vliv na morfologii nanovláken. Dalším parametrem významným pro povrchové funkcionalizace je stabilita nanovláken a množství silanolových skupin na povrchu. Ty jsou využívány při silanizaci k roubování funkčních skupin. Třetím významným parametrem kladeným na jakýkoli systém pro dopravu léčiv je jeho biokompatibilita, jak ukazuje schéma na obrázku 26. Všechny tyto parametry hrají významnou roli při volbě optimálních podmínek přípravy křemičitých nanovláken.

Cílem této kapitoly je ověřit a popsat vliv viskozity zvláknovacího solu a vybraných procesních parametrů elektrostatického zvláknování na morfologii připravených křemičitých nanovláken a jejich měrný povrch. Dále ověřit vliv teplotní stabilizace na jejich morfologii a chemické složení nanovláken a také na jejich biokompatibilitu a biodegradaci. A na základě výsledků zvolit optimální podmínky přípravy homogenní opakovatelné nanovláknenné vrstvy vhodné pro další konjugace.



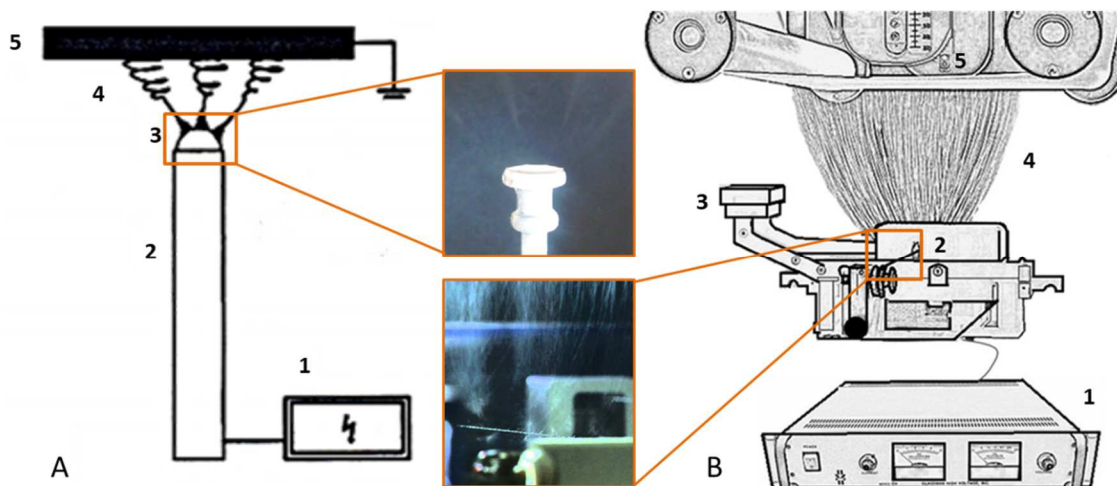
Obr. 26 Schéma vlivů jednotlivých parametrů při výběru substrátu pro další konjugaci.

5.2 Materiály a metody

5.2.1 Příprava nanovláken

Sol pro elektrostatické zvlákňování byl připraven metodou sol-gel katalyzovanou v kyselém prostředí. Nízkomolekulární prekurzor reakce tetraethoxysilan (TEOS, 98 %, CAS:78-10-4, Merc Milipore) byl rozpuštěn v isopropylalkoholu (IPA, 99 % p.a., CAS:67-63-0, Penta). Hydrolyza byla iniciována přidávkem vody a kyseliny chlorovodíkové (HCl, 35 %, CAS:7647-01-0, Penta). Molární poměr složek reakční směsi byl přitom $n(\text{TEOS})/n(\text{H}_2\text{O}) = 0.45$ a $n(\text{TEOS})/n(\text{IPA}) = 0.42$. Tato metoda byla již dříve zavedena na TUL [71, 159], ovšem v tomto případě byl zvlákňovací sol připraven bez dalších aditiv. Po průběhu hydrolyzy a polykondenzační reakce (120 °C/2 h) byl sol skladován při stabilní teplotě 22 °C až do zahuštění destilací při atmosférickém tlaku. Finální koncentrace sušiny v solu tvořila 35 %(hm.). Následně byl sol skladován opět při konstantní teplotě 22 °C. V pravidelných intervalech probíhalo měření viskozity a odběr vzorků pro elektrostatické zvlákňování. Při něm byl ověřován vliv viskozity a procesních parametrů na morfologii nanovláken. Zvlákňování bylo prováděno bezjehlovou metodou. V prvních fázích na laboratorním zvlákňovacím zařízení vybaveném tyčovou elektrodou a následně na poloprovozním zvlákňovacím zařízení Nanospider NS line 1WS500U (Elmarco, Česká republika) vybaveném elektrodou strunovou (viz schéma na obr. 27). V průběhu zvlákňování byly měněny dva procesní parametry – a to zvlákňovací vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem a zvlákňovací napětí. Na základě dosažených výsledků byly následně stanoveny optimální parametry zvlákňování pro přípravu homogenních vzorků pro další studie.

Nanovláknenné membrány pro studium vlivu teplotní stabilizace a další analýzy byly připraveny při již optimalizovaných podmínkách na zařízení NanospiderTM při zachování vzdálenost elektrod 175 mm, rychlosti pojezdu struny: 0,2 mm/s, rozdílu napětí 70 kV (kolektor -10 kV, zvlákňující elektroda (struna) 60 kV). Tímto způsobem bylo dosaženo homogenních nanovláknenných vrstev s plošnou hmotností pohybující se mezi 19,5 a 26 g/m².



Obr. 27 Schémata zařízení využitých pro přípravu křemičitých nanovláken.
 (A) Laboratorní zařízení vybavené tyčkovou elektrodou: 1- zdroj vysokého napětí, 2- zvláknovací elektroda, 3- zvláknovaný roztok (sol), 4- oblast zvláknování, 5- uzemněný kolektor.
 (B) Poloprůmyslové zařízení Nanospider vybavené 1- zdrojem vysokého napětí, 2- drátovou elektrodou, 3- stírací hlavou se zásobníkem, 4- zvláknovací oblastí, a 5- protielektrodou s odvíjenou záchytnou textilií [232].

Nanovláknenné vrstvy byly do 24 hodin od přípravy tepelně stabilizovány. Tepelná stabilizace se provádí za účelem zajištění lepších mechanických vlastností a odstranění vody sorbované na povrch nanovláken. Pro stabilizaci byl zvolen teplotní rozsah do 750°C. Vyšší teploty nebyly použity vzhledem k riziku destrukce vnitřní porozity materiálu [9] a bezpečnostním rizikům spojeným s vdechováním nebiodegradabilních křemičitých částic [159]. Teplotní úprava probíhala po dobu dvou hodin s cirkulací vzduchu v peci Binder ED240 (Binder, Německo) u vzorků stabilizovaných do 300 °C a v peci Nabertherm B130 N40/ER (Nabertherm, Německo) u vzorků stabilizovaných při vyšších teplotách.

5.2.2 Měření viskozity

Měření viskozity probíhalo v pravidelných intervalech na rotačním viskozimetru Fungilab™ Expert V301003 (Fungilab S.A., USA) v použití nastavců L1 a L2 při spolehlivosti min. 80 %. Hodnocen byl jednak vývoj viskozity v čase a zároveň opakovatelnost přípravy solu. Vzorky byly skladovány a měřeny při konstantní teplotě 22 °C. Měření byla provedena u šarží M02/07, M02/14, M02/15, M02/16, M02/33.

5.2.3 Charakterizace nanovláken

5.2.3.1 Elektronová mikroskopie

Pro morfologickou charakterizaci nanovláken byla použita skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Základní přehledové snímky maximálně s 25.000 násobným zvětšením byly pořízeny na zařízení Tescan Vega 3 (Tescan Orsay Holding, Česká republika) při použitím urychlovacím napětí 20 kV. Snímky pro studie vyžadující větší zvětšení byly pořízeny na FE-SEM Zeiss Ultra Plus (ZEISS, Sigma Family - Jena, Německo) vybaveném InLens detektorem a SE2 sekundárním detektorem elektronů při urychlovacím napětí 1-5 kV. Před vlastní analýzou byly vzorky zvodivěny nanosením vrstvy zlata o tloušťce 1-6 nm v přístroji Quorum Q150RES (Quorum Technologies, UK). Při dohodnocení průměrů nanovláken bylo u každé nanovláčenné vrstvy měřeno $n=100$ hodnot. Specifický měrný povrch (P_{spec}) nanovláken byl kalkulován na základě rovnice

$$P_{spec} = \frac{P}{M} = \frac{\pi \cdot D \cdot L}{\frac{\pi \cdot D^2}{4} \cdot L \cdot \rho} = \frac{4}{D \cdot \rho}, \quad (1)$$

kde P je povrch nanovláken [m^2], M je hmotnost [kg], D je průměr vlákna [m], L je délka vlákna [m], ρ je hustota zvláknovaného roztoku [kg/m^3] [239]. Zjednodušená rovnice po dosazení hustoty [179] je následující

$$P_{spec} = \frac{4}{D \cdot 2000}. \quad (2)$$

5.2.3.2 Hodnocení chemického složení nanovláken

5.2.3.2.1 Termogravimetrická analýza (TGA)

Vliv teplotní stabilizace na chemickou strukturu nanovláken byl hodnocen nejprve termogravimetrickou analýzou. Testována byla degradační stabilita v teplotním rozsahu do 850 °C u neupravených a tepelně stabilizovaných nanovláken. Nanovláčka byla před provedením analýzy uložena v exsikátoru. Analýza byla provedena na termogravimetrickém analyzátoru TGA Q500 (TA Instrumenst, USA). Analýzy probíhaly na platinové pánvičce v atmosféře syntetického vzduchu (SA) se složením 80 % dusíku a 20 % kyslíku a průtokem 60 ml/min, kdy ohřev probíhal z laboratorní teploty do 850 °C při rychlosti 10 °C/min.

5.2.3.2.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR)

Příprava vzorků probíhala shodně jako v případě TGA analýzy. Měření bylo provedeno na FTIR spektrometru iZ10 (Thermo Fischer Scientific) ATR technikou na krystalu ze ZnSe. Spektra byla korigována na okolní atmosféru, baselinu a normalizována na intenzitu 1. Rozsah měřeného vlnočtu 4000-700 cm^{-1} .

5.2.3.3 *Hodnocení biokompatibility vláken*

5.2.3.3.1 *Biokompatibilita in vitro*

Základní biokompatibilita *in vitro* byla hodnocena v návaznosti na studii vlivu teplotní stabilizace. Hodnocení bylo provedeno tzv. v přímém kontaktu v souladu s normou EN ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Myší fibroblasty 3T3 byly kultivovány v kompletním kultivačním médiu skládajícím se z Dulbeccova modifikovaného Eaglova média (DMEM, glukóza 4.5 g/l, L-glutamin, Sigma-Aldrich) s přidavkem 5 % fetálního bovinního séra (FBS, Biosera), 5% novorozeckého telecího séra (NBCS, Sigma-Aldrich), 1% směsi antibiotik/antimykotik (10 kU penicilin/10 mg streptomycin/ 25 μg amphotericin B/ml, Sigma-Aldrich). Po dosažení 80 % konfluence v pasáži 11 byly roztokem trypsinu (0.25% trypsin/0.02% EDTA) uvolněny z povrchu kultivační lahve a nasazeny na 24-jamkovou kultivační destičku v počtu 40 tisíc buněk na jamku. Po 24 hodinách kultivace byly před výměnou média na dno jamky přiloženy testované vzorky ($d = 6$ mm, $n = 6$). Biokompatibilita vzorků byla vyhodnocena po dalších 24 hodinách kultivace prostřednictvím metabolického testu založeného na poměrné kvantifikaci viabilních buněk. Po odstranění kultivačního média bylo přidáno 320 μl 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT, 1mg/ml, Sigma-Aldrich). V průběhu 2 hodin byl prostřednictvím NADPH-dependentních oxidoreduktáz v mitochondriích živých buněk MTT přeměňován na nerozpustný MTT formazan. Ten byl po odstranění nevyužitého roztoku MTT rozpuštěn v 640 μl isopropylalkoholu. Absorbance byla následně na vlnové délce 570 nm při odečtení pozadí (650 nm) na multidetekčním readeru Synergy HTX (BioTek Instruments, Kanada). Výsledné hodnoty byly porovnány s buněčnou kontrolou. Výsledná viabilita buněk byla vyjádřena jako procentuální podíl absorbance neovlivněné buněčné kontroly a absorbance vzorku.

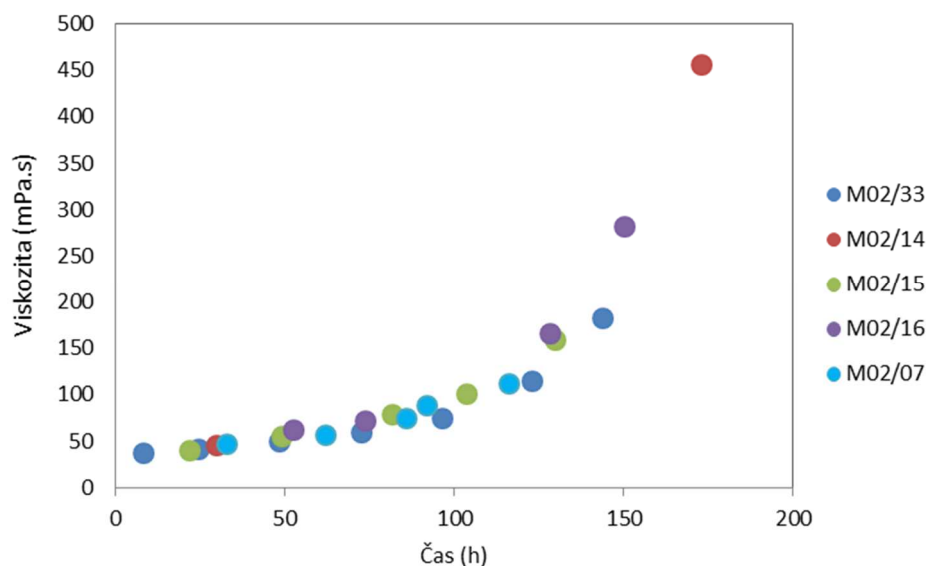
Významnost rozdílů mezi jednotlivými skupinami byla hodnocena jednosměrnou analýzou rozptylu (ANOVA) v softwaru GraphPad,

5.3 Výsledky a diskuse

5.3.1 Vliv viskozity a procesních parametrů

5.3.1.1 Vývoj viskozity v čase

Výsledky měření vývoje viskozity v čase jsou na obrázku 28. U všech testovaných vzorků vykazoval vývoj viskozity v čase stejný trend, což svědčí o dobré opakovatelnosti přípravy solů. Jak je patrné, kombinace isopropylalkoholu jako rozpouštědla a kyselá hydrolyza a molárního poměru TEOS/H₂O [233] vedla k pomalé kondenzaci a pozvolnému zvyšování viskozity v čase. Z vývoje viskozity vyplývá, že 3. fáze přechodu solů na gel nastává zhruba po 120 hodinách od destilace. Do té doby dochází k agregaci primárních koloidních řetězců a nanočástic. Po 120 hodinách dochází k růstu klastrů a jejich spojování což vede k rychlejšímu nárůstu viskozity. Vzhledem k těmto výsledkům bylo elektrostatické zvlákňování prováděné u solů v 1. a 2. fázi přechodu solů na gel. U vyšších fází by zvlákňování vzhledem k formování gelu bylo obtížné.



Obr. 28 Vývoj viskozity solů připraveného metodou sol-gel v čase u různých šarží (M02/07, M02/14, M02/15, M02/16, M02/33). Teplota 22 °C.

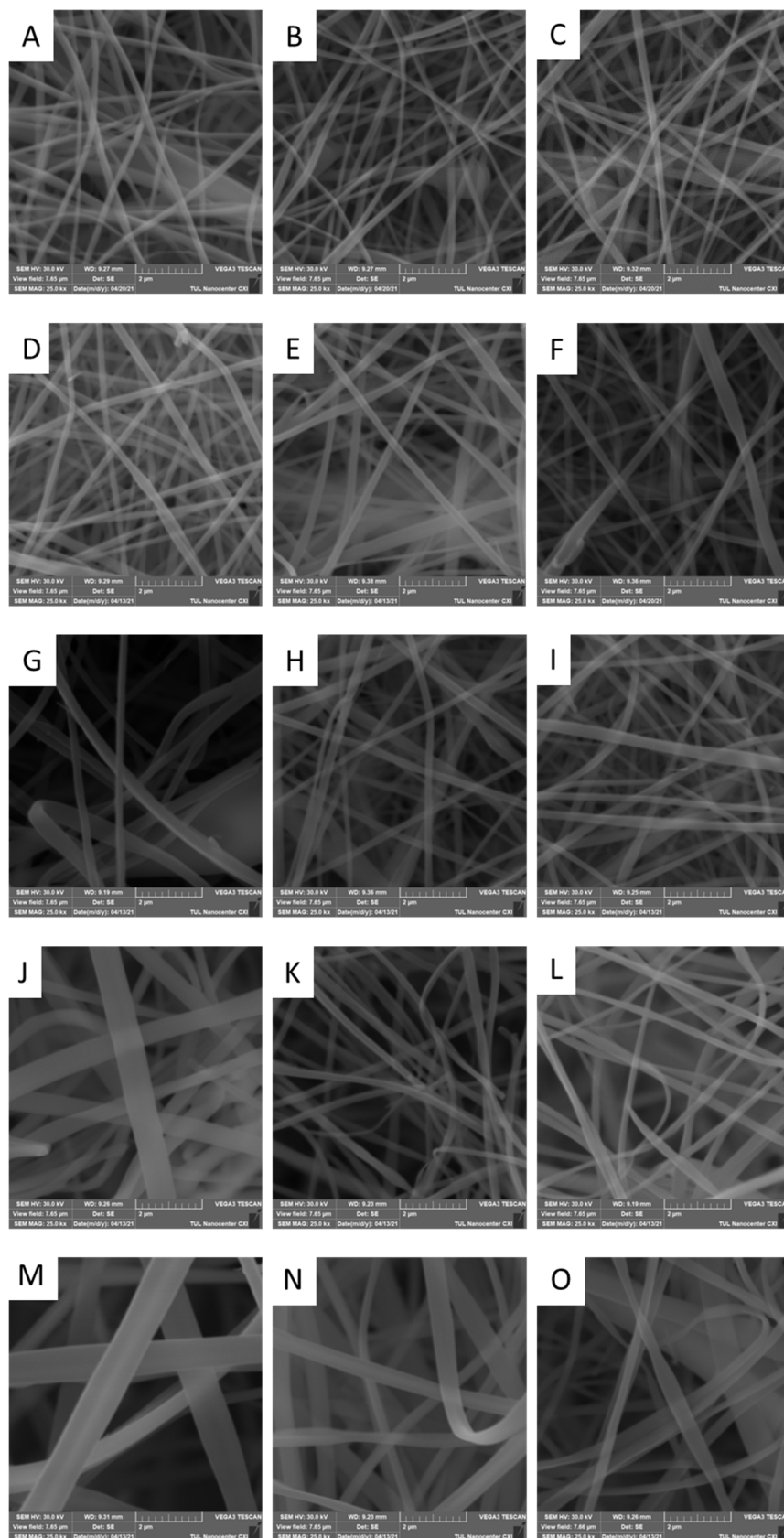
5.3.1.2 Vliv viskozity a procesních parametrů na morfologii nanovláken

Vliv všech testovaných parametrů byl patrný u obou zvláknovacích metod. V případě laboratorní aparatury s tyčkovou elektrodou byla pozornost věnována vlivu viskozity a zvláknovací vzdálenosti. Napětí bylo udržováno konstantní. Ukázky morfologie nanovláken připravených zvláknováním na laboratorní aparatuře jsou na obrázku 29. Vyhodnocení zjištěných závislostí je potom graficky znázorněno na obrázku 30. Jak je patrné, nárůst viskozity bez změny koncentrace solu vedl ke zvyšování průměru nanovláken. Závislost průměru nanovláken na viskozitě prokázali také Luccufier et al. [164]. U nejnižší testované viskozity (41.3 mPa.s) nebyly pozorovány koráلكové defekty, které jsou při elektrostatickém zvláknování způsobovány příliš nízkou koncentrací roztoku. Nižší viskozita (41.3 mPa.s) vedla k formování tenkých hladkých nanovláken s průměrem 216.7 ± 44 nm (obr. 28A), zatímco u nejvyšší testované viskozity 115.3 mPa.s byla pozorována vlákna stužkovitého tvaru s průměrem 674.5 ± 234 nm (obr. 29M). Při zvláknování solů s viskozitou < 50 mPa.s byl vliv vzdálenosti elektrod na průměr nanovláken (obr. 29A,B,F) i jejich morfologii (obr. 29A-F) zanedbatelný. K odlišným výsledkům s ohledem na morfologii došli Luccufier et al., kteří s použitím jehlového zvláknování získali při viskozitě 65 mPa.s tenká vlákna s řadou kuličkových defektů. Nejlepší zvláknitelnost zaznamenali u solu s viskozitou 120 mPa.s [164].

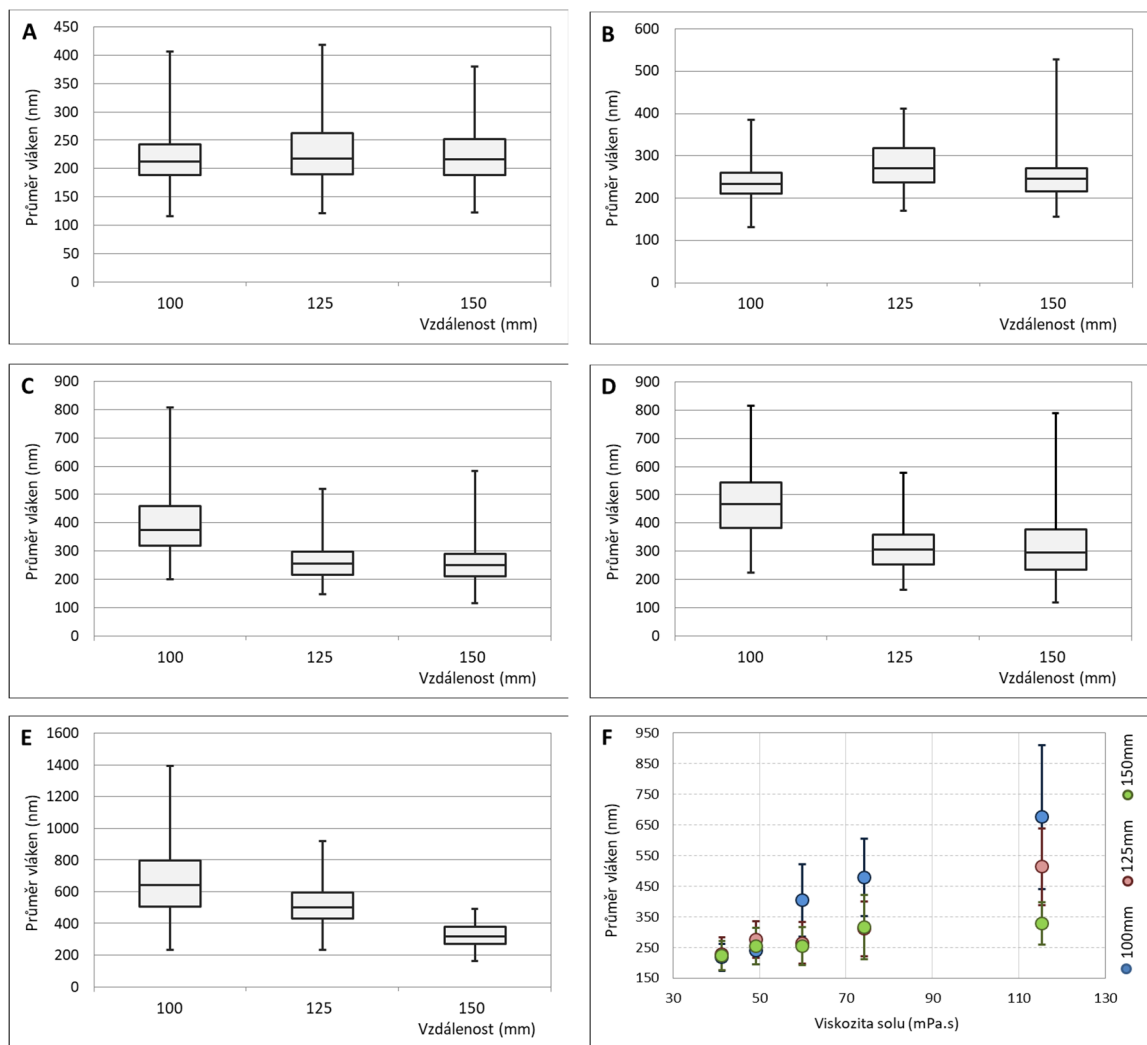
Při zvláknování solů s vyšší viskozitou prostřednictvím tyčkové elektrody byl pozorován rostoucí průměr nanovláken silněji závislý na zvláknovací vzdálenosti. Tento jev lze spojit s postupem fází přechodu solu na gel a s ním spojenou strukturou křemičitých řetězců. Zatímco v 1. fázi přechodu solu, s viskozitou pod 50 mPa.s, se v solu vyskytují kratší a méně rozvětvené řetězce, ve 2. fázi přechodu dochází k růstu a rozvětvení těchto řetězců a postupnému spojování do více rozvětvených celků. Tento jev souvisí také s pozorováním stužkovitých nanovláken. Výskyt stužkovitých nanovláken popsali například Topuz a Uyar [234] a Koombhongse et al. [235] a je spojován s rychlým odparem rozpouštědla při zvláknování polymerních roztoků s vyšší než optimální viskozitou. U některých polymerů byl pozorován také při zvyšování napětí [234]. Ačkoli v případě křemičitého solu nedošlo ke změně koncentrace, lze tento efekt připsat většímu rozvětvení řetězců a vyšší viskozitě. Zároveň vzdálenost elektrod ovlivňuje intenzitu elektrického pole [236, 237]. Již u viskozity 59.9 mPa.s byla pozorována ojedinělá stužkovitá nanovlákna ve vrstvě při použití kratší

zvlákňovací vzdálenosti (100 mm, obr. 29G). Zároveň významně vzrostl průměr nanovláken ve srovnání s nanovláknými zvlákňovanými na 125 mm a 150 mm. Tento efekt je dobře patrný na obrázcích 30C a 30F. Významný rozdíl průměrů nanovláken vlivem zvlákňovací vzdálenosti byl pozorován u nanovláken připravených ze solu na počátku 3. fáze přechodu sol-gel (viskozita 115.3 mPa.s). Tam vzrostla střední hodnota průměru nanovláken z 327 ± 69.8 nm (150 mm, obr. 29O) na 674.5 ± 234 nm (100 mm, obr. 29M), jak ukazují grafy na obrázcích 30E a F. 3D graf kombinovaného vlivu viskozity solu a zvlákňovací vzdálenosti je na obrázku 34A.

Použitím vyšší zvlákňovací vzdálenosti lze tento efekt snížit a zároveň docílit nanovláken s nižším průměrem. Zvyšování zvlákňovací vzdálenosti však vede ke snižování intenzity zvlákňovacího procesu a tím i jeho výrobnosti.



Obr. 29 Morfologie nanovláken připravených na laboratorní aparatuře vybavené tyč. elektrodou. Sledován vliv viskozity solu a vzdálenosti elektrod na průměr vláken při zachování konstantního napětí (50 kV). Viskozita solu byla 41.3 mPa.s (A-C), 49.2 mPa.s (D-F), 59.9 mPa.s (G-I), 72.2 mPa.s (J-L) a 115.3 mPa.s (M-O). Vzdálenost mezi elektrodami byla měněna mezi 100 mm (A, D, G, J, M), 125 mm (B, E, H, K, N) a 150 mm (C, F, I, L, O). Zvětšení 25.000x.



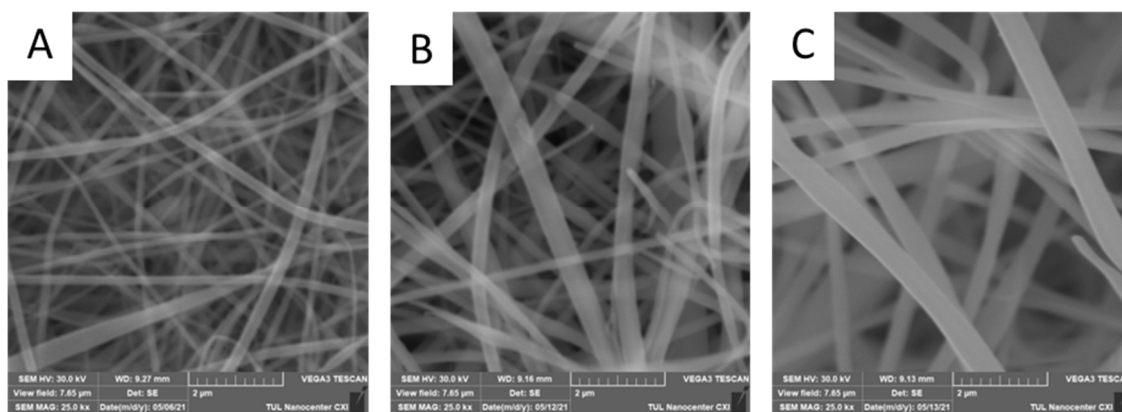
Obr. 30 Grafické porovnání průměrů nanovláken připravených na laboratorní aparatuře s tyčkovou elektrodou při změně zvlákňovací vzdálenosti a zachování konstantního napětí (50 kV). Krabičkové grafy průměrů nanovláken ($n=100$) připravených ze solu o viskozitách (A) 41.3 mPa.s, (B) 49.2 mPa.s, (C) 59.9 mPa.s, (D) 74.2 mPa.s a (E) 115.3 mPa.s. (F) Grafické znázornění vlivu viskozity solu na střední hodnotu průměru nanovláken ($\pm S.D.$, $n=100$) u vybraných zvlákňovacích vzdáleností.

Zvlákňování na poloprovodní zařízení Nanospider s použitím strunové elektrody ukázalo stejný efekt vývoje viskozity na průměr připravovaných nanovláken, jako v případě tyčkové elektrody. U nanovláken připravených při nejvyšší viskozitě – v tomto případě 112 mPa.s, dosažené po 122 hodinách od destilace, byl pozorován menší podíl stužkovitých nanovláken. Tento efekt může být připsán použití drátové elektrody, jejíž malý průměr vede k formování rovnoměrného, koncentrovaného elektrického pole po celé její délce, což vede ke vzniku uniformnějších nanovláken [238]. Při srovnání kombinovaného efektu zvlákňovací vzdálenosti a elektrického napětí se jako významnější projevil efekt napětí. Aplikace 70 kV vedla při viskozitě

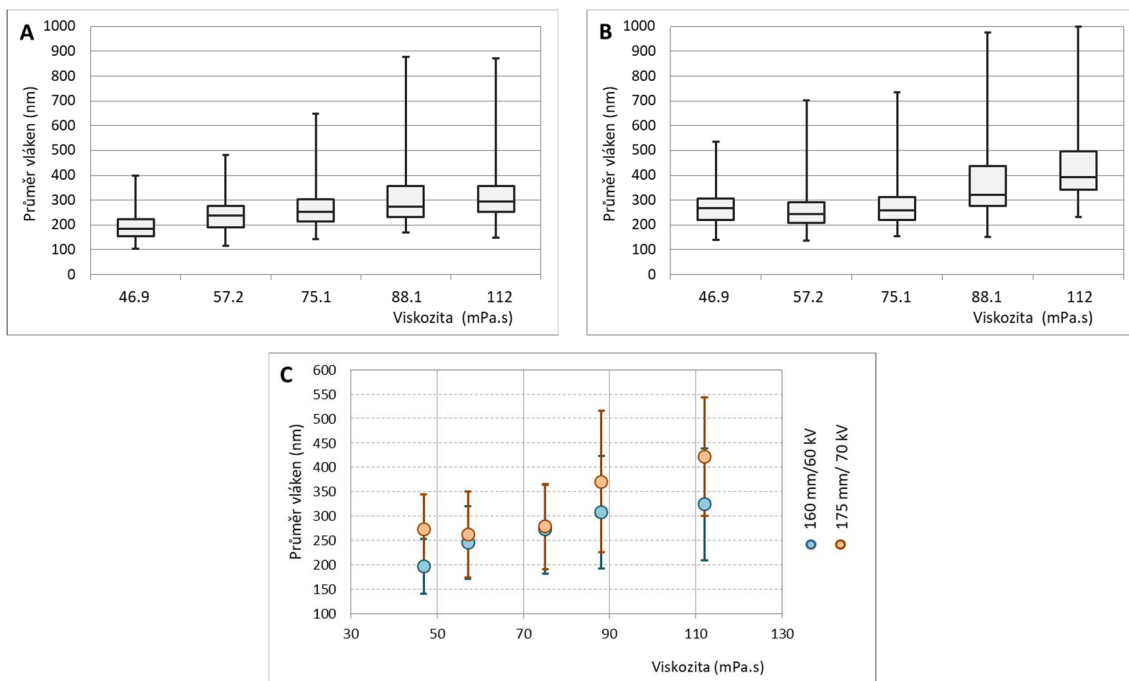
solu 112 mPa.s k formování nanovláken se střední hodnotou průměru 421.1 ± 121.5 mPa.s, na rozdíl průměru 324.4 ± 114 nm, který byl dosažen při aplikaci 60 kV. A to i přes větší zvlákňovací vzdálenost. Jak je patrné z grafu na obrázku 32C, tento efekt napětí vykazoval stoupající trend jako v případě vzdálenosti při zvlákňování z tyčkové elektrody. S rostoucí viskozitou roztoku se rozdíl mezi průměrem nanovláken připravených při 60 kV a 70 kV zvyšoval. Srovnání vlivu viskozity a aplikovaného napětí je v grafech na obrázku 32, graf vlivu kombinace viskozity solu a zvlákňovacího napětí je potom na obrázku 34B.

Srovnání vlivu zvlákňovací vzdálenosti a aplikovaného napětí bylo provedeno zvlákňováním solu o viskozitě 57.2 mPa.s, (viz obr. 33; kompletní soubor viz Příloha 1, obr. 2). 3D graf zobrazující závislost kombinací parametrů je potom na obrázku 34C. Ukazuje kombinovaný efekt, kterým je možné řídit průměr nanovláken i při zvlákňování křemičitého solu s nízkou viskozitou.

Z výsledků vyplývá, že elektrostatické zvlákňování solů s nižší viskozitou, do 70 mPa.s vede k vláknům se střední hodnotou průměru pod 300 nm. Zvlákňovací podmínky ovlivňují u těchto solů morfologii jen omezeně. U solů s vyšší viskozitou je možné řídit průměr nanovláken především aplikovaným napětím. Jeho snížení umožňuje získat nanovláčka s nižším průměrem, nižší frekvencí stužkových vláken a homogennější strukturou.

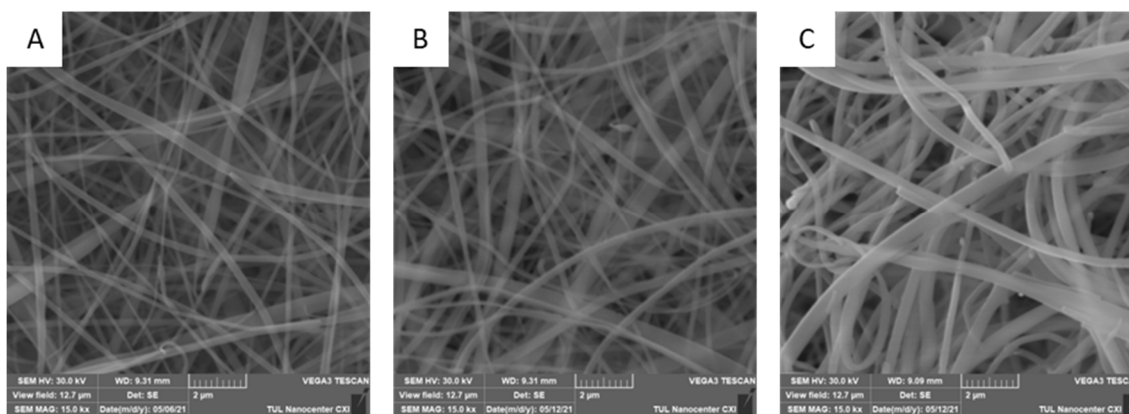


Obr. 31 Morfologie nanovláken připravených na zařízení Nanospider NS 1W500U vybaveném drátovou elektrodou. Sledován vliv viskozity solu na morfologii nanovláken. Nanovláčka byla připravena ze solů o viskozitě (A) 46.9 mPa.s, (B) 75.1 mPa.s a (C) 112 mPa.s. Procesní parametry byly nastaveny na (A, B) 160 mm a 60 kV a (C) 175 mm a 70 kV. Zvětšení 25.000x.



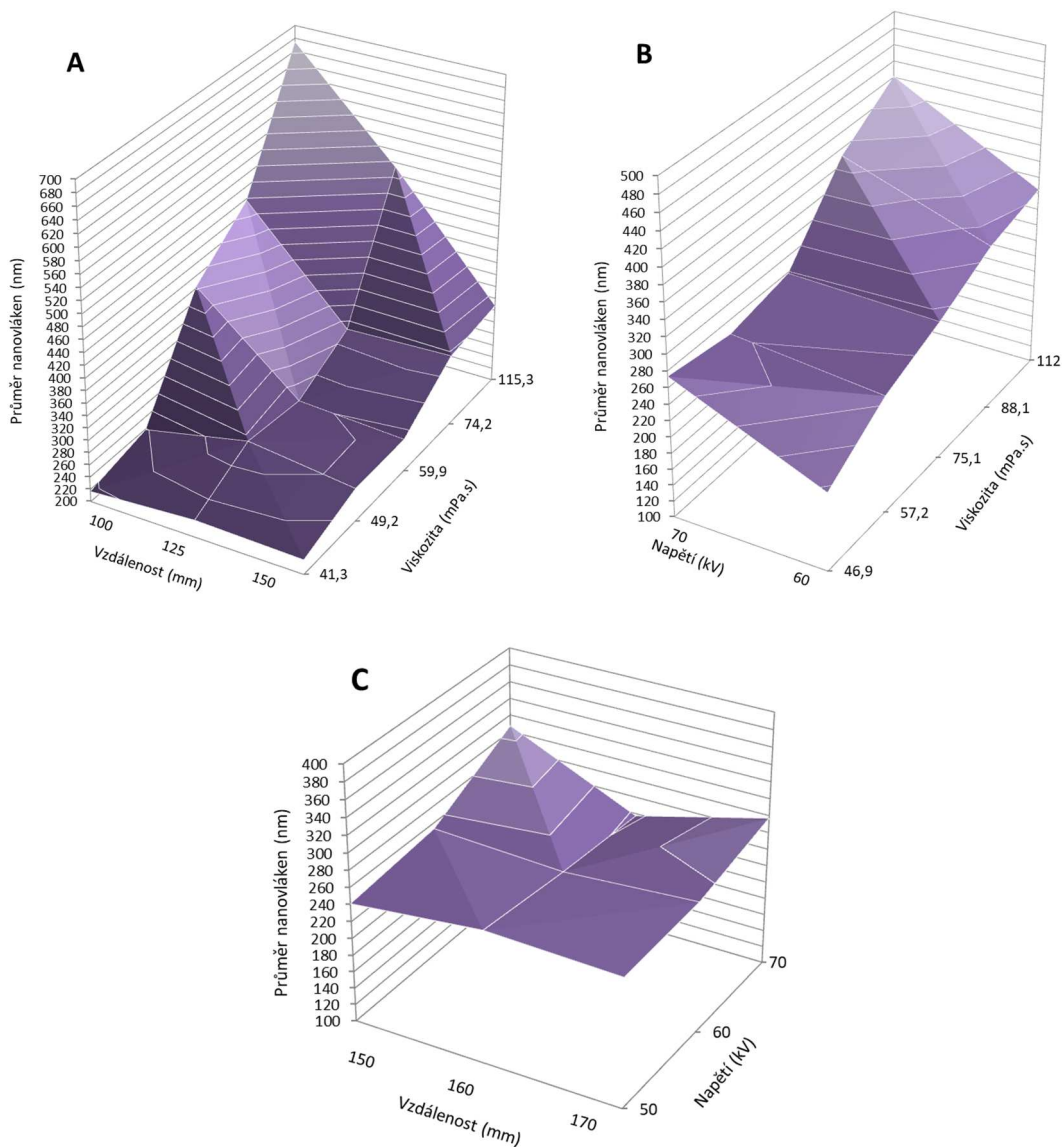
Obr. 32 Grafické vyhodnocení a srovnání průměrů nanovláken připravených na zařízení Nanospider.

Hodnocen vliv viskozity solu a vybraných procesních parametrů na morfologii nanovláken. Krabičkové grafy průměrů nanovláken ($n=100$) připravených ze solů různé viskozitě při A. 160 mm a 60 kV a B. 175 mm a 70 kV. C. Grafické znázornění vlivu viskozity solu na střední hodnotu průměru nanovláken ($\pm S.D.$, $n=100$).



Obr. 33 Morfologie nanovláken připravených na zařízení Nanospider NS 1W500U vybaveném drátovou elektrodou.

Sledován vliv procesních parametrů při zachování konstantní viskozity (57.2 mPa.s). Vzdálenost mezi elektrodami byla měněna mezi 150 mm. Pro přípravu jednotlivých vzorků bylo napětí měněno mezi 50 kV (A), 60 kV (B) a 70 kV (C). Zvětšení 15.000x



Obr. 34 3D grafy kombinovaného vlivu vybraných parametrů zvlákňování. Hodnocen vliv na střední hodnotu průměru nanovláken. (A) Kombinovaný efekt viskozity solu a zvlákňovací vzdálenosti u zvlákňování z tyčkové elektrody. (B) Kombinovaný efekt viskozity solu a zvlákňovací napětí u zvlákňování z drátové elektrody zařízení Nanospider. (C) Kombinovaný efekt zvlákňovací napětí a vzdálenosti mezi elektrodou a kolektorem u zvlákňování z drátové elektrody zařízení Nanospider při zachování konstantní viskozity (57.2 mPa.s).

Tab. 3 Závislost kalkulovaného specifického povrchu nanovláken na průměru nanovláken připravených elektrostatickým zvláknováním na zařízení Nanospider.

Viskozita (mPa.s)	Napětí (kV)	Průměr vláken <i>průměr ± S.D.</i> (nm)	Specifický povrch <i>průměr ± S.D.</i> (m ² /g)
46.9	60	196.5 ± 55.9	10.2 ± 2.3
57.2	60	245.2 ± 74.7	8.15 ± 1.86
75.1	60	273 ± 91.3	7.33 ± 1.84
88.1	60	307 ± 115.3	6.51 ± 1.77
88.1	70	370.8 ± 145.2	5.39 ± 1.51
112	60	324.4 ± 114.7	6.16 ± 1.6
112	70	421.1 ± 121.5	4.75 ± 1.06

Na základě dosažených výsledků byly zvoleny zvláknovací podmínky pro přípravu homogenních vrstev plošnou hmotností 19.5 – 26 g/m². Pro dosažení nižšího průměru nanovláken a tím vysokého měrného povrchu byla zvolena viskozita solu pod 50 mPa.s. Konkrétně byl zvlákněn sol o viskozitě 43.2 mPa.s při použití zvláknovací vzdálenosti 175 mm a napětí 70 kV. Tímto způsobem byla připravena nanovláknenná vrstva se střední hodnotou průměru vláken 241.3 ± 76.3 nm.

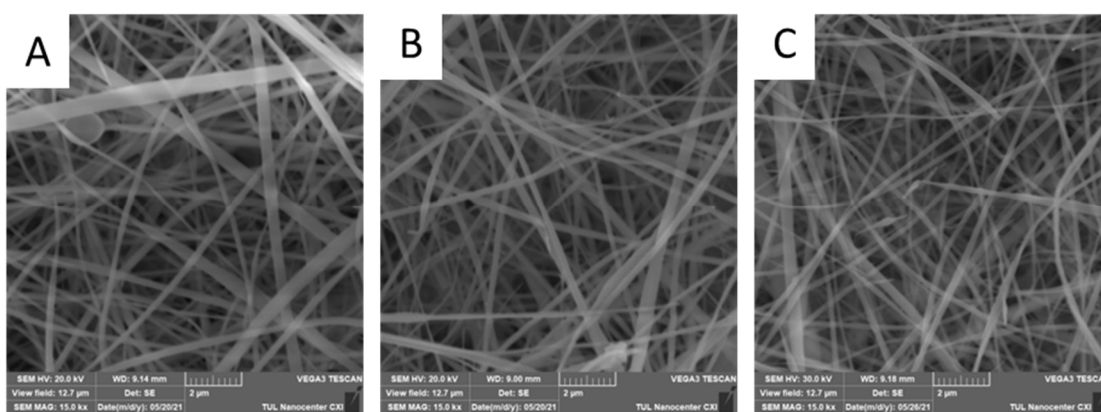
5.3.2 Vliv podmínek stabilizace na vlastnosti nanovláken

5.3.2.1 Vliv teplotní stabilizace na morfologii nanovláknenné vrstvy

U nanovláken tepelně stabilizovaných při teplotě přesahující 300 °C byly při vizuálním hodnocení pozorovány mírné změny zbarvení (viz obr. 35). Tento jev může být přisuzován degradaci organických zbytků (ethoxy skupin) nezapojených do reakce sol-gel. Hodnocení elektronovou mikroskopií (SEM) neodhalilo zásadní vliv teplotní stabilizace na morfologii nanovláken. Nebyly pozorovány zlomy vláken ani narušení povrchu jednotlivých nanovláken. Teplotní stabilizace také neměla v celém testovaném rozsahu zásadní vliv na průměr nanovláken. Tepelnou stabilizací sice došlo ke snížení střední hodnoty průměru ve srovnání s neupravenými nanovláknem, ale vzhledem k rozptylu hodnot v jednotlivých souborech nelze tyto změny považovat za signifikantní. Výběr snímků nanovláknenné vrstvy před a po stabilizaci jsou na obrázku 36 (kompletní soubor viz Příloha 1, obr. 3).

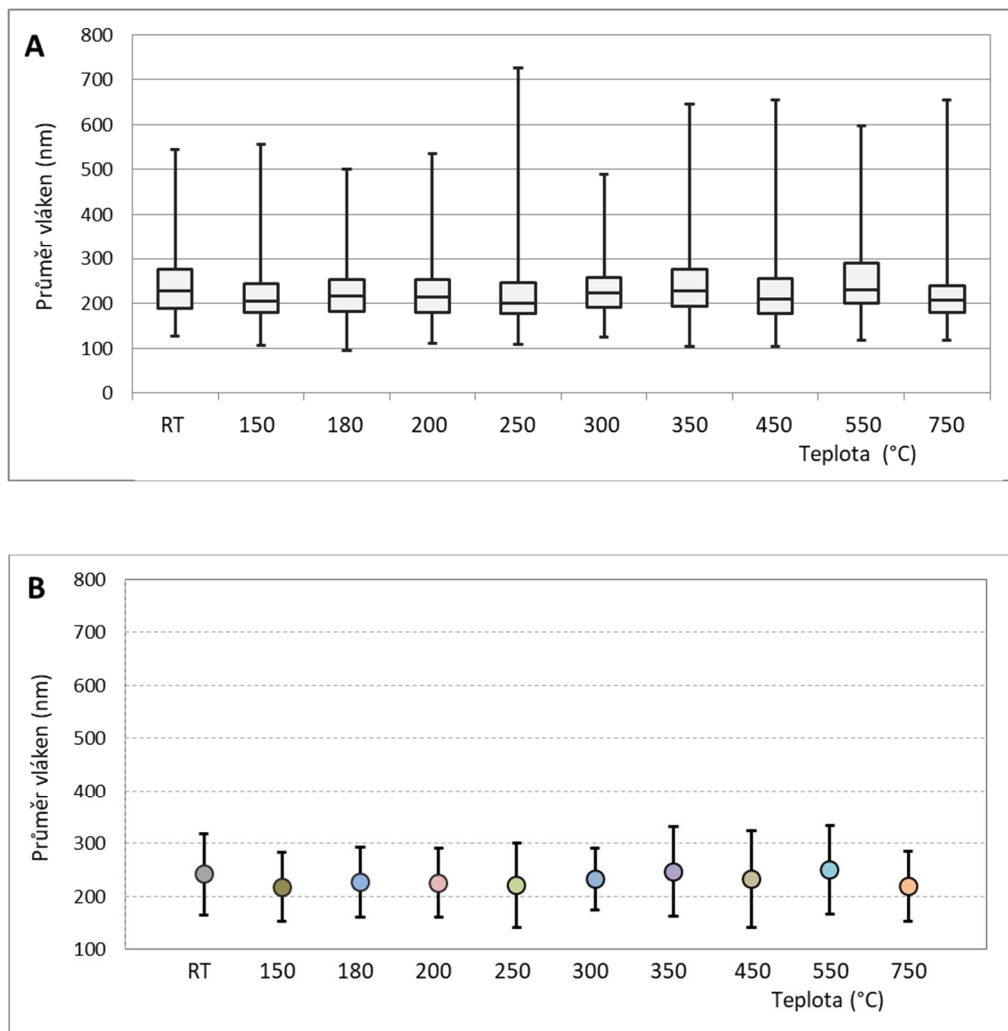


Obr. 35 Vizualní hodnocení vlivu tepelné stabilizace na barvu a makroskopický vzhled křemičitých nanovláken.



Obr. 36 Vliv tepelné úpravy na morfologii nanovláken. Nanovláknna bez tepelné úpravy (A) a tepelně stabilizovaná po dobu 2 hodin při teplotách 180 °C (B) a 750 °C (C). Zvětšení 15.000x.

Grafické srovnání zjištěných průměrných hodnot je uvedeno na obrázku 37.



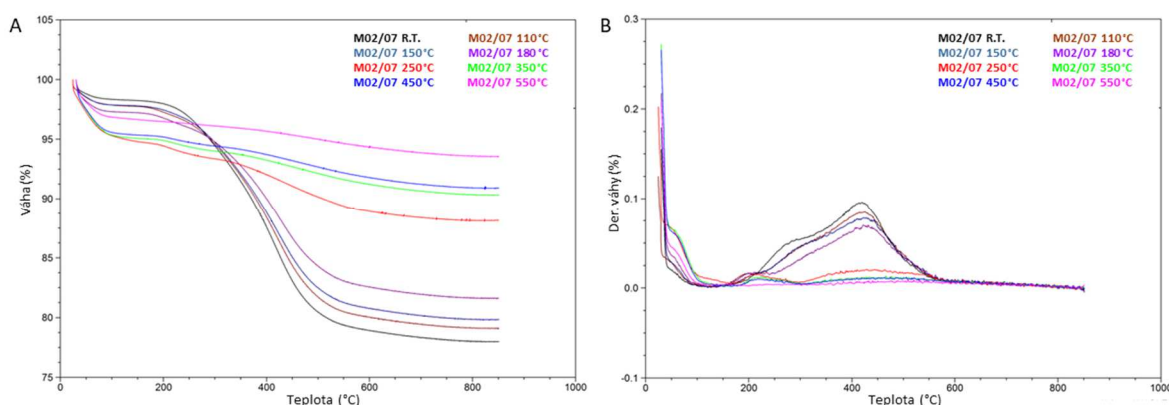
Obr. 37 Grafické srovnání vlivu tepelné úpravy na průměr nanovláken. Vyjádřeno formou (A) krabicových grafů a (B) srovnáním střední hodnoty průměru (\pm S.D.)

5.3.2.2 Vliv teplotní stabilizace na chemické složení

Termogravimetrická analýza (TGA), jejíž výsledky jsou graficky na obrázku 38, prokázala významný vliv podmínek tepelné stabilizace na další tepelnou degradaci nanovláken. U všech vzorků byl zaznamenán první pokles váhy v oblasti do 125 °C – a to v rozmezí 1.7 % do 5 %, který bývá připisován ztrátě adsorbované vlhkosti a případně i residuí rozpouštědel [152]. Další degradace byla u většiny vzorků zaznamenána v oblasti 250-600 °C při teplotách ~320 °C a ~430 °C, což představují nejvyšší rychlosti rozkladných dějů. Úbytek hmotnosti křemičitých materiálů v oblasti

250-450 °C bývá připisován degradaci alkylových a alkoxylových zbytků prekurzoru, zatímco degradace v oblasti 450-700 °C je spojována s dehydroxylací silanolových Si-OH skupin a následnému formování siloxalových Si-O-Si vazeb [240, 241, 242].

Podíl hmoty nanovláken zachované po degradaci do 850 °C vykazoval nepřímou závislost na teplotě předchozí tepelné úpravy, přičemž nejmenší podíl zbytkové hmotnosti byl zjištěn u vláken bez předchozí tepelné úpravy (R.T.) 77.99 %. U nanovláken tepelně upravených byla zbytková hmotnost 79.13 % pro 110 °C, 79.84 % pro 150 °C, 81.61 % pro 180 °C, 88.15 % pro 250 °C, 90.33 % pro 350 °C, 90.91 % pro 450 °C a 93.53 % pro 550 °C. Přitom u vláken stabilizovaných při teplotách vyšších než 250 °C tvořil hmotnostní úbytek do 100 °C: 5 % pro vlákna stabilizovaná na 250 °C, 4.96 % pro 350 °C, 4.65 % pro 450 °C a 3.27 % pro 550 °C. Významná část hmotnostního úbytku tedy byla spojena s odstraněním vlhkosti a u těchto vláken byl předpokládán významně nižší podíl alkylových zbytků a silanolových skupin. Tyto předpoklady byly následně potvrzeny FTIR analýzou, jejíž výsledky jsou uvedeny níže.



Obr. 38 Výsledky termogravimetrické analýzy (TGA) křemičitých nanovláken vyjádřené (A) vývojem podílu zbytkové váhy vzorku v závislosti na teplotě degradace a (B) vývojem derivace váhy v závislosti na teplotě degradace.

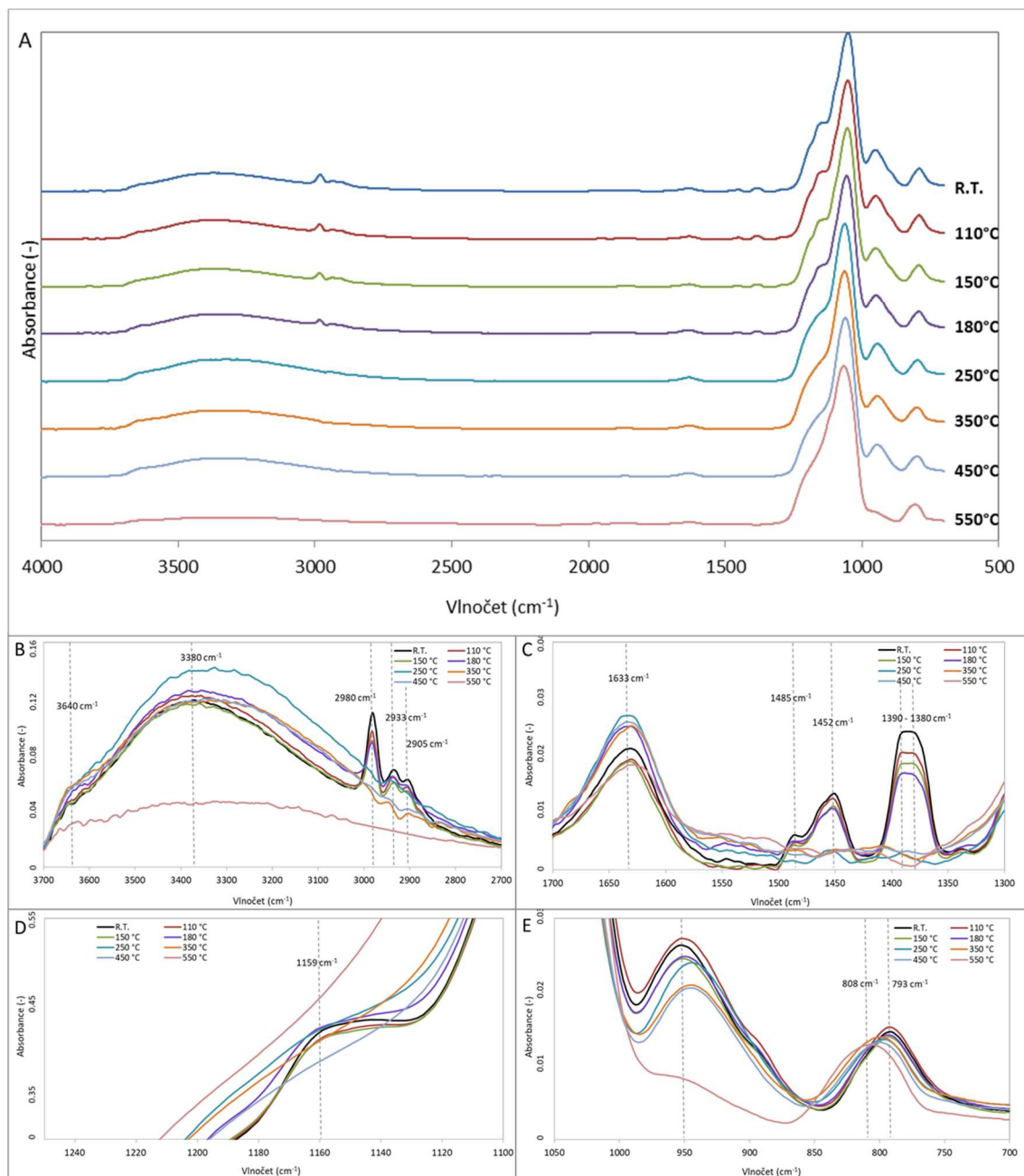
Analýza prostřednictvím Fourierovy transformační infračervené spektroskopie (FTIR) prokázala přítomnost několika vrcholů typických pro vibrace vazeb obsažených v materiálech na bázi oxidu křemičitého. Literatura v této souvislosti popisuje zejména deformační, valenční symetrické a valenční asymetrické vibrační módy mezi Si a O na vlnočtech kolem 450 cm^{-1} , 800 cm^{-1} a 1070 cm^{-1} [152, 243, 244]. Vibrace „otisku prstu“ silanolové skupiny Si-OH byly popsány v oblastech kolem 925 cm^{-1} a 3650 cm^{-1} .

Asymetrické valenční vibrace silanolu byly identifikovány také v oblasti $\sim 1130\text{ cm}^{-1}$ [245, 246]. Někteří autoři také popisují mimofázové vibrace v oblasti mezi 1050 cm^{-1} a 1250 cm^{-1} , které mohou souviset s přítomností residuí molekul tetraethoxysilanu (TEOS) [243, 247, 248]. S těmito rezidui souvisejí také výraznější asymetrické valenční vibrace CH_2 a CH_3 skupin na vlnočtech $2915 - 2855\text{ cm}^{-1}$ a $2995 - 2940\text{ cm}^{-1}$ [249]. Přesná hodnota vlnočtu vibrací konkrétních vazeb závisí na použité metodě měření.

Výsledky dosažené FTIR analýzou křemičitých nanovláken stabilizovaných při různých teplotách jsou na obrázku 39. Konkrétně srovnání všech kompletních spekter je na obrázku 39A. Jak je patrné, spektra vykazují vrcholy na vlnočtech typických pro křemičité struktury připravené metodou sol-gel – a to zejména na 1090 cm^{-1} (Si-O-Si) a 950 cm^{-1} (Si-OH). Zároveň byl potvrzen vliv podmínek tepelné úpravy na chemické složení nanovláken. Zvýšená teplota úpravy vedla k simultánnímu poklesu u vrcholů vibračního raménka Si-OH vibrací na 950 cm^{-1} a 3640 cm^{-1} , jak ukazují obrázky 39B a E. U vrcholu na vlnočtu 950 cm^{-1} došlo s rostoucí teplotou úpravy k pozvolnému poklesu absorbance. Po úpravě při $550\text{ }^\circ\text{C}$ byl tento vrchol spektra téměř eliminován. Stejný efekt byl zaznamenán i v případě 3640 cm^{-1} . Tato teplota úpravy zjevně ovlivnila také schopnost adsorpce vzdušné vlhkosti, kdy došlo také k výraznému poklesu absorbance vrcholu na $\sim 3380\text{ cm}^{-1}$, který je všeobecně spojován s vibracemi H-OH. U asymetrických vibrací Si-OH na vlnočtu 1159 cm^{-1} byl vrchol eliminován již při úpravě na $250\text{ }^\circ\text{C}$ (obr. 39D). Současně bylo s rostoucí teplotou pozorováno pozvolné rozšiřování vrcholu na vlnočtu 1090 cm^{-1} odpovídajícího valenčním asymetrickým vibracím Si-O-Si a rozšiřování a posun vrcholu na 793 cm^{-1} až na 808 cm^{-1} odpovídajícího symetrickým valenčním vibracím Si-O-Si (obr. 39E) Tento výsledek v kombinaci se snižujícím se obsahem Si-OH nasvědčuje vnitřní reorganizaci a zhušťování struktury vláken se zvyšující se teplotou úpravy díky zapojováním silanolových skupin do siloxalových vazeb [243, 245, 246]. Takový vliv tepelné úpravy ($> 400\text{ }^\circ\text{C}$) popsali u tenkých vrstev připravených metodou sol-gel např. Ponton et al. [243]. Ti zároveň prokázali významné snížení podílu atomů vodíku a zároveň snížení atomárního poměru O/Si při teplotní úpravě nad $500\text{ }^\circ\text{C}$. Zároveň popsali, že křemičité struktury upravené teplotou pod $600\text{ }^\circ\text{C}$ sestávají ze vzájemně síťovaných jednotek Si-O-Si s dalšími nečistotami, které ovlivňují asymetrické vibrace této vazby. Mezi tyto nečistoty se řadí funkční skupiny s obsahem vodíku. Dále je ovlivňují strukturální

poruchy v okolí SiO_4 čtyřstěnu ve formě rozdílné hustoty struktury [243, 250, 251]. Proces denzifikace struktury je tedy spojen s eliminací přítomných nečistot.

K těm se váží identifikované vrcholy odpovídající residuím molekul TEOS a jejich eliminace s rostoucí teplotou úpravy. Vibrace organických skupin pocházejících z prekursoru reakce byly popsány v oblasti mezi 2800 a 3000 cm^{-1} [249, 252]. Konkrétně u vrcholu na 2980 cm^{-1} odpovídajícího asymetrickým vibracím $-\text{CH}_3$ skupiny, stejně jako v případě u vrcholů 1485 cm^{-1} a $1390\text{-}1380 \text{ cm}^{-1}$ vztahujícím se k deformačním vibracím skupiny $-\text{CH}_3$, byla pozorována eliminace vrcholů při úpravě nad $250 \text{ }^\circ\text{C}$ (viz obr. 39B a C). Podobný efekt tepelné úpravy byl pozorován i v případě vrcholů odpovídajících vibracím CH_2 skupiny. U vrcholů na vlnočtech 2933 cm^{-1} a 2905 cm^{-1} odpovídajících asymetrickým vibracím CH_2 došlo k výraznému snížení intenzity při úpravě nad $250 \text{ }^\circ\text{C}$ a k jejich plné eliminaci při úpravě na $550 \text{ }^\circ\text{C}$. Podobný trend byl pozorován u vrcholu na 1452 cm^{-1} odpovídajícího deformačním vibracím CH_2 skupiny, kde při úpravě na $250 \text{ }^\circ\text{C}$ došlo k výraznému snížení vrcholu a při vyšších teplotách k jeho eliminaci. Tyto výsledky vypovídají o odstranění organických zbytků evidentně přítomných i po přípravě nanovláken. Jejich odstranění je provázáno s již zmiňovanou změnou vnitřní struktury při vyšších teplotách úpravy.

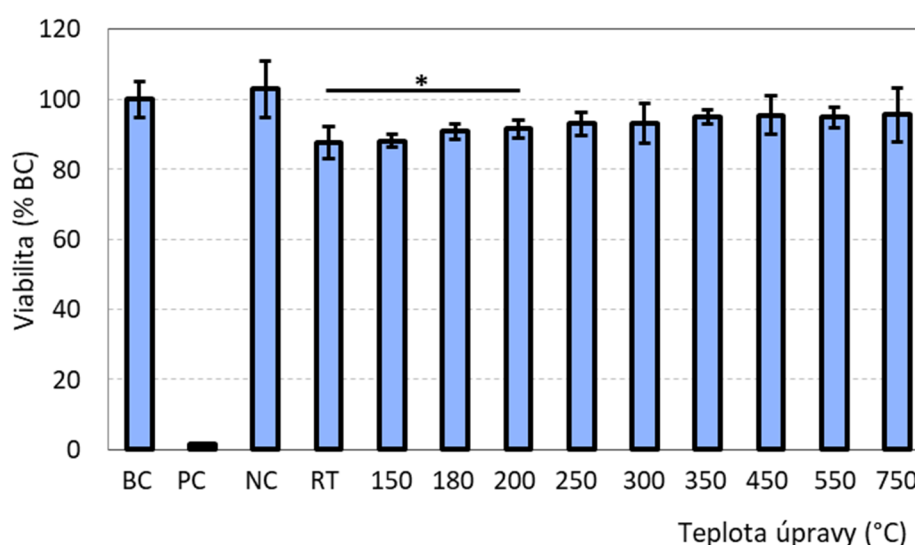


Obr. 39 FTIR spektra křemičitých nanovláken upravených při různých teplotách. (A) přehled spekter na kompletním rozsahu vlnočtu $700\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ a detailní pohled srovnávající intenzitu v oblastech (B) $2700\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$, (C) $1300\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, (D) $1100\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ a (E) $700\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$.

5.3.2.3 Vliv teplotní stabilizace na biokompatibilitu nanovláken

U všech testovaných vzorků přesahovala viabilita myších fibroblastů 3T3 70% buněčné kontroly po expozici po 24 hodin v přímém kontaktu. Je tedy možné v souladu s ISO 10993-5:2009 prohlásit všechna testovaná nanovlákná za biokompatibilní. U

nanovláken tepelně upravených při teplotě 200 °C a nižší byla průměrná viabilita pod 90% buněčné kontroly, což představovalo významný pokles viability ve srovnání s buněčnou kontrolou, jak ukazuje graf (obr. 40). Tepelnou úpravou došlo k zvýšení viability. Z 87.6 ± 4.6 % dosažených u neupravených nanovláken (RT) viabilita stoupla na 90.8 ± 2.3 % úpravou při 180 °C, 93 ± 3.3 % úpravou při 250 °C, a ~95 % úpravou při teplotách přesahujících 350 °C. Tento výsledek je pravděpodobně způsoben vyšším podílem silanolových skupin na povrchu nanovláken, jak prokázala chemická analýza. Jejich výskyt je spojován s toxicitou nanomateriálů způsobenou oxidačním stresem [115, 253].



Obr. 40 Biokompatibilita nanovláken stabilizovaných při různých teplotách. Test v přímém kontaktu expozicí po dobu 24 hodin. Buněčná viabilita vztahena vůči počtu živých buněk u buněčné kontroly (% BC). BC – neovlivněná buněčná kontrola, PC – pozitivní kontrola, NC – negativní kontrola. * Hodnoty rozdílné vůči BC na hladině významnosti $p < 0.005$.

5.3.3 Shrnutí výsledků

U křemičitých nanovláken připravovaných metodou sol-gel byl ověřen vztah mezi viskozitou a fází přechodu solu na gel. V kombinaci s procesními parametry zvláknování umožnila vhodná volba viskozity přípravu nanovláken se střední hodnotou průměru pod 250 nm a specifickým povrchem přesahujícím $8 \text{ m}^2/\text{g}$ při zachování vysoké výrobní produkce. Bylo potvrzeno, že tepelná stabilizace vede k odstranění fyzisorbované vody a zároveň ke změnám vnitřní struktury a ztrátě povrchových silanolových skupin. Ty jsou nezbytné pro další funkcionalizaci. Zároveň jejich přítomnost ovlivňuje biokompatibilitu nanovláken. Vzhledem k těmto skutečnostem

byla pro další práci zvolena nanovlákná tepelně stabilizovaná při teplotě 180 °C. U těchto nanovláken byla potvrzena biokompatibilita vůči kožním buňkám 3T3-A31.

6 Konjugace kyseliny hyaluronové a charakterizace

6.1 Cíle kapitoly

Povrchová funkcionalizace křemičitých nanovláken silanizací i následná konjugace kyseliny hyaluronové mají řadu faktorů, které mohou ovlivnit kinetiku reakce a účinnost vazby a zároveň vlastnosti výsledného produktu.

Jako modifikační činidlo pro krok silanizace byl zvolen 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES) – a to zejména díky biokompatibilitě jeho vedlejšího produktu, kterým je ethanol. Studované parametry silanizace byla koncentrace APTES v reakční směsi a doba reakce. Pro konjugaci kyseliny hyaluronové (HA) byla zvolena karbodiimidová chemie podpořená N-hydroxysuccinimidem. Jejimi výhodami je zejména průběh reakce ve vodném prostředí bez použití organických rozpouštědel. U zvolené jednokrokové konjugace jsou účinnost i kinetika reakce silně ovlivněny řadou parametrů. Významná je zejména role pH prostředí, složení pufru a složení reakční směsi.

Cílem této kapitoly je ověřit a popsat vliv zvolených parametrů jednotlivých kroků povrchové funkcionalizace křemičitých nanovláken – tedy silanizace a následné konjugace kyseliny hyaluronové, na účinnost funkcionalizace a připravená nanovlákná charakterizovat. Vzhledem k předpokládanému využití funkcionalizované nanovlákně vrstvy jako nosiče pro dopravu léčiv je cílem této kapitoly také ověření vlivu funkcionalizace nanovláken na vlastnosti relevantní pro jejich aplikaci v hojení ran. Tedy vyhodnocení vlivu konjugace kyseliny hyaluronové na smáčení nanovlákně vrstvy, její degradaci v simulovaných podmínkách a biokompatibilitu. Z hlediska biokompatibility se tato kapitola zabývá vlivem povrchové úpravy na cytotoxicitu *in vitro* vůči myším kožním fibroblastům a hemokompatibilitu nanovláken. Jednou ze základních vlastností optimálního krytu ran je také jeho nízká adheze ke spodině rány, která umožňuje jeho snadné odstranění [2, 25]. Z tohoto důvodu byla ověřena je součástí kapitoly také ověření adheze fibroblastů k povrchu nanovláken a jejich proliferace na něm.

6.2 Materiály a metody

6.2.1 Příprava nanovláken

Nanovláknna byla připravena elektrostatickým zvlákněním na poloprovozním zařízení Nanospider NS 1W500U. Pro dosažení nižšího průměru nanovláken (pod 200 nm) a tím vysokého specifického povrchu dostupného pro další funkcionalizaci byl zvlákněn sol o viskozitě 35.2 mPa.s. Vzdálenost elektrod v průběhu zvláknování byla 175 mm a rozdíl napětí 70 kV (kolektor -10 kV, zvláknující elektroda (struna) 60 kV). Rychlost nanášecí hlavy se pohybovala v rozmezí 350 – 500 mm/s při rychlosti odtahu podkladového materiálu 15 mm/min. Jako podkladový materiál byl použit silikonizovaný papír.

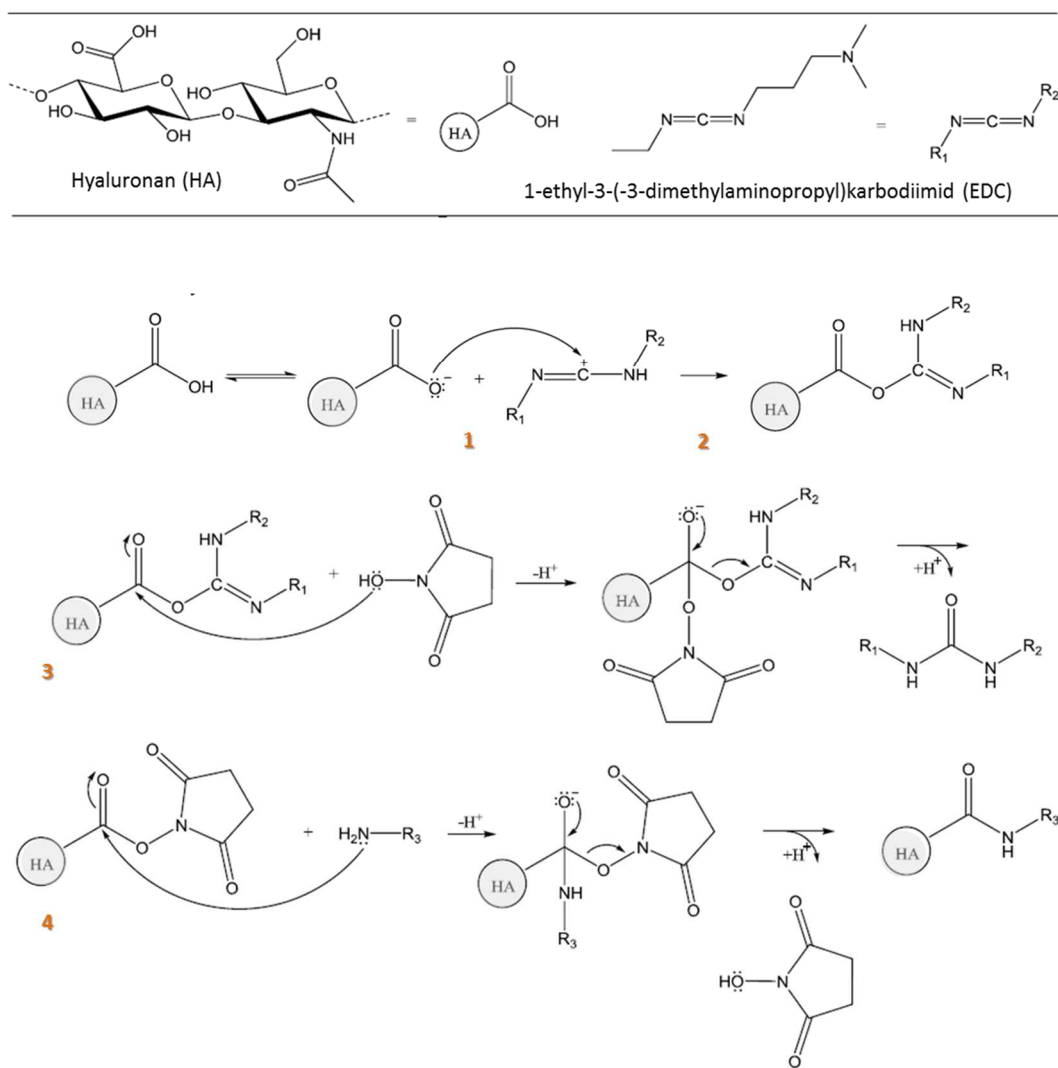
6.2.2 Silanizace povrchu

Silanizace povrchu nanovláken byla provedena 3-aminopropyltriethoxysilanem (APTES, 98%, Sigma-Aldrich). Hydrolyza byla u silanizačního roztoku skládajícího se z APTES, vody a ethanolu indukována v kyselém prostředí (pH 5). Molární poměr ethanol: H₂O byl udržován na 1: 0.135. Při optimalizaci procesu byl měněn podíl APTES ve směsi. Testovány byly koncentrace 2 %, 3 % a 4% (obj.), tedy molární poměry H₂O: APTES 1: 0.039, 1: 0.058 a 1: 0.077. Optimalizována byla také doba funkcionalizace v rozmezí 1 až 5 hodin. Silanizační reakce byla prováděna při zachování poměru 1 ml roztoku na 1.85 cm² nanovláknenné vrstvy při pokojové teplotě a stálé agitaci (50 ot./min). Nevázaný APTES byl po ukončení silanizace odstraněn opakovaným oplachem v ethanolu. Optimální počet oplachů, tedy čtyři, byl stanoven v rámci předchozí studentské práce [176]. Funkcionalizovaná nanovláknna byla následně sušena při 110 °C po dobu 30 minut a skladována do dalšího použití. Při studii vlivu skladovacích podmínek na účinnost silanizace byla nanovláknna zatavena do polyethylenových obalů a skladována ve stabilních podmínkách (4 °C a 22 °C) nebo v neuzavřených nádobách při pokojové teplotě.

6.2.3 Konjugace kyseliny hyaluronové

Pro konjugaci kyseliny hyaluronové (HA, ≥ 95 %, kosmetická kvalita, 1.3 MDa, obsah proteinu ≤ 0,1 %, Lots.: 20150305, 2019041813; Shandong Focuschem Biotech Co., Čína) byla zvolena karbodiimidová chemie. Jako aktivační činidlo byl použit 1-ethyl-3-

(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC, 99 %, Roth) ve formě hydrochloridu. Jako pomocná látka byl použit N-hydroxysuccinimid (NHS, 98%, Sigma-Aldrich), jehož přítomnost má bránit vzniku N-acylmočoviny a podporovat stabilitu reakce. Detailní reakční schéma konjugace je uvedeno na obrázku 41. Konjugace byla provedena jako jednokroková ve vodném pufru. Použití jednokrokové metody umožnilo použití konjugace pouze v kyselém prostředí. V případě dvoukrokové konjugace následuje po aktivaci molekuly nesoucí karboxyl konjugační krok prováděný v mírně zásaditém pH (~8) [254], jehož použití není u křemičitých nanomateriálů vhodné vzhledem k zrychlené degradaci při pH > 8 [116].



Obr. 41 Reakční schéma znázorňující kroky vedoucí ke kovalentní vazbě HA na substrát obsahující primární aminskupiny.

1- protonace a vznik karbokationu EDC, 2- vazba karbokationu EDC na karboxylát HA za vzniku O-acylisomočoviny, 3- reakce NHS s O-acylisomočovinou za vzniku sukcinimidyl esteru a derivátu močoviny jako vedlejšího produktu, 4- reakce primárního aminu s esterem za vzniku amidu a NHS. [255]

Poměr EDC: NHS byl udržován konstantní na hodnotě 6: 1.5 (hm.), tedy 2.385: 1 molárně. Studován byl vliv pH, doby konjugace, pufru a poměru HA vůči EDC. Vliv pH byl testován při hodnotách 3, 4, 5 a 6. Testované časové rozpětí bylo 1 – 15 hodin. Jako vodné pufr byly testovány McIlvainův a MES pufr. Modifikovaný McIlvainův pufr byl připraven smísením 120 mM roztoku kyseliny citronové (p.a., Penta) a 240 mM hydrogenfosforečnanu sodného (p.a., Penta) v objemovém poměru 3.685: 6.315. MES pufr byl připraven z hydrátu kyseliny

2-(N-morpholino)-ethanesulfonové (99.5 %, Sigma-Aldrich) v molárních koncentracích 20, 50 a 100 mM. Finální pH pufru bylo ve všech případech upraveno kyselinou chlorovodíkovou před doplněním do požadovaného objemu. Před samotnou konjugací byly jednotlivé složky konjugačního roztoku v pufrch rozpuštěny samostatně. Krátce před zahájením konjugace byly k roztoku kyseliny hyaluronové přidány roztoky NHS a EDC. Po homogenizaci roztoku byl tento přidán k nanovlákně. Konjugace byla prováděna při pokojové teplotě a stálé agitaci (100 ot./min). Po ukončení procesu byla nanovláknina zbavena zbytků aktivačních chemikálií a nekonjugované kyseliny hyaluronové promytím v destilované vodě (3 x 15 minut) a sušena při pokojové teplotě. Konjugace kyseliny hyaluronové v McIlvainově pufru byla částečně zpracována v rámci BP Vojtěcha Svěchoty [261].

6.2.4 Charakterizace nanovláken

Morfologie upravených nanovláken po silanizaci a konjugaci kyseliny hyaluronové byla hodnocena prostřednictvím elektronové mikroskopie (SEM). Postup a přístrojové vybavení byly popsány již v kapitole 5.2.3.1. Chemické složení bylo hodnoceno infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací (FTIR) a rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií (XPS). Postup a přístrojové vybavení využití při FTIR analýze je popsáno v kapitole 5.2.3.2.2. Vliv funkcionalizace na povrchové vlastnosti nanovláken byl ověřen testem smáčivosti.

6.2.4.1 Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS)

Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS) byla použita ke studiu chemického složení povrchu nanovláken. Měření bylo provedeno na fotoelektronovém spektrometru AXIS Supra (Kratos Analytical Ltd., UK) vybaveným monochromatickým rentgenovým zdrojem Al K α (1486.6 eV) a hemisférickým analyzátozem kinetické energie elektronů. XPS průzkumná spektra byla získána s použitím procházející energie 80 eV, zatímco spektra s vysokým rozlišením při energii 20 eV. Měření bylo provedeno pod úhlem 90° k analyzované ploše o rozměru 0.3 x 0.7 mm². Při měření byl použit systém pro neutralizaci náboje. Fitování jednotlivých vrcholů spekter vysokým rozlišením bylo provedeno v softwaru CasaXPS software s použitím pozadí Shirley a gaussovských/lorenzovských (GL(30), 70% G/ 30% L) bez fixace na šíři vrcholu (full width at half maximum, FWHM). Vazebné energie fotoelektronových spekter byly

stanoveny s přesností ± 0.2 eV. Získaná XPS spektra byla kalibrována k vazebné energii C-C/C-H vazeb složky C 1s na 284.8 eV [256-258].

6.2.4.2 Smáčivost povrchu

Smáčivost povrchu byla hodnocena měřením kontaktního úhlu přisedlé kapky vody o definovaném objemu (4.25 ± 0.1 μ l). Měření bylo provedeno ve třech opakováních pro každý vzorek metodou Tangent-1 založené na fitování křivky. Pro měření bylo použito zařízení Drop Shape Analyzer a software DSA4 (Krüss and See System, Advex Instruments, ČR). Kontaktní úhel byl hodnocen ihned po nanesení kapky (< 1 s) a dále po 1 a 5 minutách.

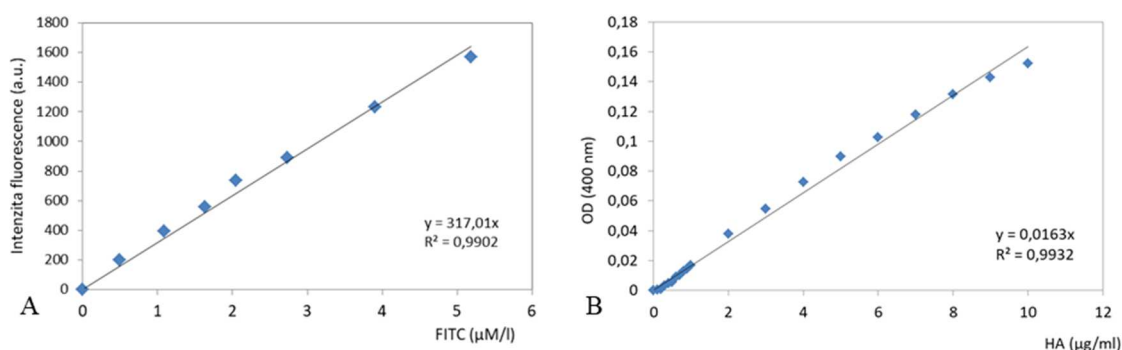
6.2.5 Kvantifikace funkčních skupin

Množství aminoskupin roubovaných na povrch nanovláken bylo kvantifikováno nepřímou fluorescenční metodou prostřednictvím specifické vazby fluorescein isothiokyanátu (FITC, isomer, $\geq 90\%$, Sigma-Aldrich). Značení 2 cm^2 nanovláken roztokem FITC (136,4 μ M) v ethanolu probíhalo přes noc bez přístupu světla. Po opakovaném oplachu ethanolom (4 x 5 minut) byla nanovláknina rozpuštěna ve 3 ml 0.2 M NaOH (24 hodin). Fluorescein byl kvantifikován ve třech opakováních (200 μ l) měřením v černé mikrotitrační destičce na multidetekčním readeru Synergy HTX (BioTek) při $F_{\text{ex}}/F_{\text{em}}$ 485/528. Kvantifikace aminoskupin roubovaných při specifických podmínkách byla provedena ve třech samostatných opakováních. Množství aminoskupin bylo vyhodnoceno přepočtem přes rovnici lineární regrese kalibrační křivky ($y = 317.01x$, $R^2 = 0.9902$, obr. 42 A). Jako prázdný vzorek byla použita křemičitá nanovláknina bez silanizace. K výpočtu množství aminoskupin byl využit teoretický předpoklad, že jsou značeny ekvivalentním počtem molekul FITC.

6.2.6 Kvantifikace kyseliny hyaluronové

Princip stanovení koncentrace kyseliny hyaluronové na povrchu nanovláken, použitý v této práci, je založen na modifikované turbidimetrické metodě popsané Queslatti et al. [259]. Ta využívá reakci cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) s roztokem obsahujícím molekuly kyseliny hyaluronové. Vzorek 1 cm^2 vysušených nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou byl rozpuštěn v 1 ml

0.2 M NaOH. 100 μ l roztoku bylo inkubováno se 100 μ l roztoku CTAB (2.5 %) po dobu 10 minut při inkubované agitaci (100 ot./min, 37 °C) na mikrotitrační destičce. Turbidita byla měřena na vlnové délce 400 nm. Přepočet byl proveden dle kalibrační křivky (viz obr. 42 B). Výpočet množství konjugované kyseliny hyaluronové byl proveden prostřednictvím rovnice lineární regrese kalibrační křivky ($y = 0.0163x$, $R = 0.9932$). Jako prázdný vzorek byla použita silanizovaná nanovláknina bez konjugované HA. Vzhledem k omezené linearitě křivky byly vzorky v případě nutnosti ředěny. Každý vzorek byl měřen ve třech opakováních. K vizualizaci úspěšné vazby kyseliny hyaluronové na povrch nanovláken bylo využito barvení toluidinovou modří O (0.5 mM, TBO, 80 %, Sigma-Aldrich) v 0.1 mM NaOH.



Obr. 42 Kalibrační křivky pro kvantifikaci
(A) fluorescenční značky FITC a (B) konjugované kyseliny hyaluronové (HA).

6.2.7 Hodnocení biodegradace nanovláken

Vliv povrchové funkcionalizace na degradaci křemičitých nanovláken byl hodnocen *in vitro* v simulované tělní tekutině (STT). Ta byla připravena dle receptury uváděné Marques et al. [260] a obsahovala 8.035 g NaCl, 0.355 g NaHCO₃, 0.225 g KCl, 0.231 g K₂HPO₄ · 3H₂O, 0.311 g MgCl₂ · 6 H₂O, 39 ml 1M HCl, 0.292 g CaCl₂, 0.072 g Na₂SO₄ a 6.118 g trisaminomethanu (TRIS, CAS: 77-86-1) (všechny v čistotě p.a., Penta) na 1 l roztoku. Hodnota pH byla upravena na 7.25 – 7.4 pro 37 °C. STT byla následně sterilizována autoklávováním.

Degradace byla testována v simulovaných podmínkách (37 °C) ve stabilním objemu tělní tekutiny bez průtoku média. Kruhová výseč nanovláken o průměru 10 mm byla vystavena simulované tělní tekutině o objemu 10 ml STT. Každý vzorek byt testován

v triplikátu na daný časový bod. Hodnocena byla degradace nanovláken prostřednictvím kvantifikace uvolněného křemíku a vliv degradace na morfologii povrchu. Ta byla hodnocena elektronovou mikroskopií (SEM) při vysokém zvětšení. Nanovláknata byla před SEM analýzou vyjmuta z tělní tekutiny, zbavena solí oplachem v destilované vodě a vysušena. Množství křemíku uvolněné do STT bylo hodnoceno spektrometricky. Vzorky STT byly v časových bodech (3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 hodin) odebrány a skladovány při v chladničce až do měření.

Měření koncentrace křemíku v tělní tekutině bylo provedeno optickou emisní spektrometrií s indukčně vázanou plazmou (ICP-OES) a bylo provedeno na přístroji ICP OES Optima 2100 DV (Perkin Elmer, USA). Jako standard byl použit vodný kalibrační roztok Astasol – Si (Analytika s.r.o., ČR). Měření probíhalo při 251 nm.

6.2.8 Hodnocení biokompatibility funkcionalizovaných nanovláken

6.2.8.1 Biokompatibilita in vitro

Biokompatibilita funkcionalizovaných nanovláken tzv. metodou v přímém kontaktu byla ověřena v souladu s normou EN ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Detailní postup popisuje kapitola 5. 2. 3. 3. 1. Pro experiment byly použity myší fibroblasty 3T3-A31 v pasáži 22. Expozice vzorků o průměru 6 mm (n = 6) trvala 24 hodin. Vyhodnocení proběhlo metodou MTT. Buněčná viabilita byla hodnocena jako procentuální poměr metabolické aktivity viabilních buněk vystavených testovaným vzorkům v porovnání s metabolickou aktivitou buněk vystavených neupraveným křemičitým nanovláknům.

6.2.8.2 Buněčná adheze a proliferace

Buněčná adheze a proliferace byla testována na linii myších fibroblastů 3T3-A31 v pasáži 15. Kruhové výseče nanovláken o průměru 15 mm byly sterilizovány UV-C (20 minut po každé straně) a vloženy na dno 24-jamkové kultivační destičky. Ke každému vzorku byl přidán 1 ml buněčná suspenze o koncentraci 40.000 buněk na ml. Počet adherovaných buněk byl hodnocen po 24 hodinách metodou MTT popsanou v kapitole 5.2.3.3.1. Další proliferace buněk byla testována po třech a pěti dnech. Každý vzorek byl testován ve čtyřech opakováních na daný časový bod.

Kromě toho byla hodnocena také morfologie buněk fluorescenční mikroskopií. Po ukončení kultivace byla nanovláčna vyjmuta z kultivačního média, smočena ve fosfátovém pufru (PBS) a fixována v ledovém methanolu po dobu 10 minut. Po rehydrataci byly buňky barveny roztokem 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodidu (DiOC₆, Sigma-Aldrich) o koncentraci 0.1 µg/ml v PBS po dobu 45 minut. Po následném oplachu byly vzorky snímány na fluorescenčním mikroskopu Leica Dmi 8 (Leica, Německo).

Pro detailní pohled na tvar buněk na povrchu nanovláken byla nanovláčna s adherovanými buňkami sledována pomocí elektronové mikroskopie. Pro tuto analýzu byly buňky po vyjmutí z kultivačního média a oplachu PBS fixovány 2.5% roztokem glutaraldehydu (grade I, Sigma-Aldrich) v PBS po dobu 30 minut a následně zpracovány dehydratační řadou (30%, 50%, 70%, 80%, 90% a 2 x 100% roztok ethanolu). Po vysušení byly vzorky snímány na elektronovém mikroskopu Tescan Vega 3 (Tescan Orsay Holding, Česká republika).

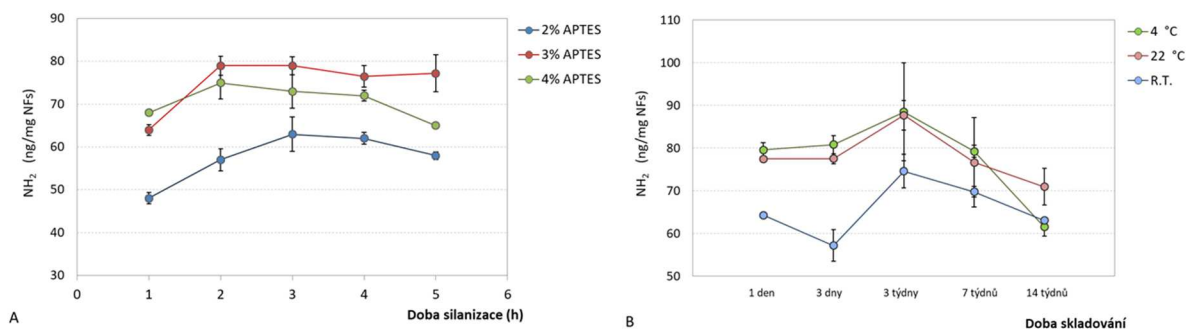
6.3 Výsledky a jejich diskuse

6.3.1 Vliv podmínek na účinnost silanizace

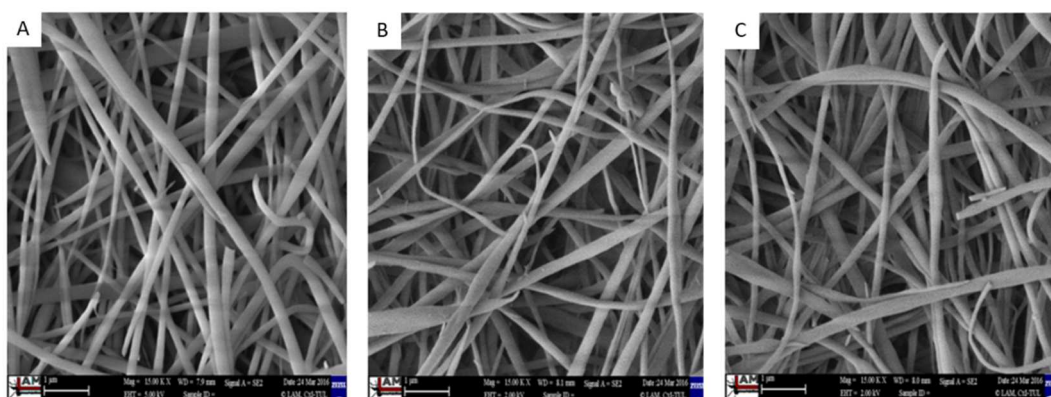
U obou testovaných parametrů silanizace byl prokázán vliv na účinnost procesu. Výsledky jsou na obrázku 43A. Koncentrace 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES) vyšší než 4% v reakční směsi nebyla testována. A to vzhledem k předchozí studii označující 5% APTES jako limitní koncentraci, kdy nedochází k roubování dalších aminoskupin ve srovnání s nižšími koncentracemi APTES [178]. Z tohoto důvodu byl testován rozsah 2 – 4 % APTES při zachování molárního poměru ethanol: H₂O 1: 0.135. Nejvyšší množství aminoskupin (79.4 ± 2.23 ng NH₂/ mg NFs) bylo dosaženo při silanizaci 3% roztokem APTES po 2 hodinách reakce. Množství aminoskupin roubovaných na povrch zůstalo v tomto případě přibližně konstantní po 2 až 5 hodinách silanizace. Silanizace po dobu 1 hodiny se pro vazbu APTES ukázala jako nedostačující u všech testovaných koncentrací. Jak ukazuje obrázek 43A, silanizace 2% APTES vedla k nižšímu množství aminoskupin naroubovaných na povrch ve všech testovaných časových bodech. Silanizace 4% APTES vedla po dvou hodinách reakce k 75.1 ± 3.73 ng NH₂ na mg nanovláken (NFs). Na základě toho lze předpokládat, že při použití 3% APTES byly využity všechny hydroxyly silanolových skupin dostupné k roubování. Tomu by nasvědčovalo také přibližně konstantní množství aminoskupin roubovaných

po 2 až 5 hodinách u 3% APTES. Předpoklad vyčerpání hydroxylů silanolových skupin dostupných k vazbě podporují také výsledky dosažené při silanizaci povrchu křemičitých nanovláken upravených plazmaticky [176, 262]. Plazmatická úprava povrchu nanovláken před silanizací podle autorů generovala hydrofilní povrch bohatý právě na hydroxylové skupiny, což vedlo k výraznému zvýšení aminoskupin úspěšně roubovaných na povrch při zachování 3% koncentrace APTES. Omezujícím parametrem silanizace je tedy kombinace míst dostupných pro roubování a koncentrace silanizačního činidla (APTES). Při překročení jeho optimální koncentrace může docházet ke zvýšenému počtu nespecifických reakcí mezi jeho hydrolyzovanými molekulami v roztoku nebo prostřednictvím elektrostatických interakcí s povrchem, což může vést ke snížení počtu aminoskupin dostupných pro další konjugaci [100]. Příklady takových vazeb jsou uvedeny na obrázku 12. K těmto nespecifickým vazbám pravděpodobně došlo v případě silanizace povrchu 4% roztokem APTES, což by vysvětlovalo nižší množství aminoskupin roubovaných ve srovnání s roztokem 3%. V případě silanizace 4% roztokem bylo maximální množství aminoskupin (75.1 ± 3.73 ng NH_2 / mg) dosaženo po 2 hodinách reakce. Delší doba silanizace vedla k poklesu dostupných aminoskupin až na 65 ± 0.21 ng NH_2 po 5 hodinách. Tento jev by nasvědčoval postupnému vzniku vodíkových můstků mezi aminoskupinami APTES, jak ukazuje obrázek 12Ba, po vyčerpání dostupných hydroxylů na povrchu nanovláken. Degradace povrchu nanovláken, která by snižování množství aminoskupin v čase také vysvětlovala, nebyla elektronovou mikroskopií potvrzena (viz obr. 44). SEM analýza nepotvrdila ani vznik zlomů vláken nebo tvorbu fólií mezi nimi. Ke snižování koncentrace aminoskupin na povrchu v čase docházelo také v případě silanizace 2% roztokem APTES. Tento jev je možné vysvětlit například elektrostatickými interakcemi mezi již naroubovanou aminoskupinou a neobsazenými vazebnými místy na povrchu nanovláken, jejichž příklad je uveden na obrázku 12Ab. K těmto interakcím může docházet v případě nízké hustoty roubování a jsou častější u funkčních silanů s kratší délkou alifatického řetězce mezi funkční skupinou a křemíkem [100].

Z hlediska kinetiky reakce, byla maximální množství aminoskupin na povrchu dosažena po dvou příp. třech hodinách silanizace. To odpovídá poznatkům dalších autorů, kteří uvádějí nejrychlejší průběh reakce mezi 60. až 120. minutou reakce [178, 261, 263] nebo mezi 90. až 180. minutou reakce [264, 265].



Obr. 43 Účinnost silanizace povrchu nanovláken v závislosti na (A) podmínkách procesu a (B) podmínkách skladování.



Obr. 44 Morfologie nanovláken po silanizaci (A) 2% APTES, (B) 3% APTES, (C) 4% APTES po dobu 1 hodiny. Zvětšení 15 kx. [261]

Kromě kinetiky reakce a vlivu koncentrace silanizačního činidla byl studován také vliv stárí nanovláken a podmínek skladování na účinnost procesu. Jak je patrné z grafu na obrázku 43B, stárnutí nanovláčkové vrstvy po teplotní stabilizaci (180 °C) a skladovací teplota silně ovlivňují množství hydroxylových skupin dostupných na povrchu a tím i účinnost silanizace. Jejich množství narůstá v průběhu prvních tří týdnů skladování. Tento jev, ke kterému dochází na povrchu amorfních křemičitých materiálů po tepelné úpravě, je možné vysvětlit formováním hydroxylů na povrchu díky rehydroxylaci s využitím vzdušné vlhkosti [267-269]. Tepelná úprava vede k nejprve k odstranění sorbované vlhkosti a následně k dehydroxylaci povrchu za vzniku siloxanových můstků ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$). Míra dehydroxylace je závislá na teplotě a délce úpravy. U tepelné stabilizace 180 - 200 °C dochází převážně k odstranění fyzisorbované vody [267] a ztráta silanolových skupin je nižší ve srovnání s tepelnou stabilizací při vyšších teplotách. Na základě výsledků lze předpokládat, že tepelná stabilizace při 180 °C vedla

ke ztrátě zhruba 10 % hydroxylových skupin na povrchu nanovláken k jejichž zpětné hydroxylaci došlo zhruba po třech týdnech skladování. Podobný trend vývoje byl zaznamenán u všech testovaných skladovacích podmínek. Skladování ve stabilním prostředí (4 °C, 22 °C) v uzavřené nádobě vedlo k vyšší míře rehydroxylace ve srovnání se skladováním při pokojové teplotě (R.T.). Ta, vzhledem k realizaci skladovacího testu v průběhu letních měsíců, kolísala mezi 20 °C až 35 °C. Vliv skladovacích podmínek se projevil již po 24 hodinách skladování, kdy byla účinnost silanizace zhruba o 18 % nižší (R.T.) ve srovnání s vzorky skladovanými při nižších stabilních teplotách. V průběhu skladování byl u všech vzorků po sedmi a čtrnácti týdnech zaznamenán pokles účinnosti silanizace. Tento jev lze vysvětlit pokračující fyzisorpcí vody, která vede k tvorbě jedné či více molekulárních vrstev na povrchu nanovláken [267]. Její přítomnost potom negativně ovlivňuje průběh silanizace vznikem nestabilních vodíkových můstků s molekulami APTES. V případě testovaných podmínek vedla její přítomnost k nižší účinnosti silanizace o zhruba 4.4 – 12 % po 7 týdnech skladování a 14.4 – 31 % po 14 týdnech skladování ve srovnání s hodnotami dosaženými po 3 týdnech skladování (viz obr. 43B). Z těchto výsledků vyplývá, že silanizace povrchu křemičitých nanovláken by měla být provedena do jednoho měsíce po tepelné stabilizaci. Při dlouhodobém skladování je vhodné nanovláčka opakovaně vysoušet nebo skladovat v inertní atmosféře.

6.3.2 Vliv podmínek na konjugace HA

Konjugace kyseliny hyaluronové na povrch silanizovaných nanovláken byla studována z hlediska kinetiky, pH, použitého pufru a složení reakční směsi.

6.3.2.1 Vliv doby konjugace

Při optimalizaci byla testována doba konjugace 1, 3, 5, 10 a 15 hodin. Výsledky, uvedené na obrázku 45, jasně ukazují, že 1 hodina je pro konjugaci kyseliny hyaluronové dostačující a po jejím překročení nejenže většinou nedochází k dalšímu nárůstu množství HA, ale v závislosti na složení konjugačního roztoku může docházet k jeho snižování. Tento poznatek je v rozporu s původním předpokladem založeným na dostupné literatuře, že optimální doba konjugace je minimálně 2 až 4 hodiny [270]. Řada autorů dokonce uvádí delší dobu konjugace biomolekul využívající EDC v závislosti na podmínkách – a to 16 až 48 hodin [254, 271, 272]. Krátká doba konjugace

představuje výhodu zejména z hlediska snížení rizika degradace nanovláken i makromolekul HA. Právě ty jsou pravděpodobně příčinou klesajícího množství konjugované HA s dobou přesahující 5 hodin reakce. Ačkoli jsou křemičitá nanovláknina stabilní ve vodě, v pufrch a iontových roztocích dochází k jejich degradaci v závislosti na pH a iontové síle. Z hlediska pH dochází u nanomateriálů na bázi oxidu křemičitého k degradaci při hodnotách vyšších než 8 [273-276]. U křemičitých nanovláken využívaných v této práci byla potvrzena rychlá degradace povrchu při fyziologické teplotě v simulované tělní tekutině (pH 7.4). Kyselé pH může naopak ovlivňovat molekulovou délku kyseliny hyaluronové (viz kap. 1.3.2.2). Vliv iontové síly pufru je pozorovatelný u konjugačního pufru MES, kdy u jeho nejvyšší koncentrace (100 mM, obr. 45B) dochází s časem konjugace přesahujícím 5 hodin ke ztrátě vázané kyseliny hyaluronové. Tento efekt je zároveň výraznější u nejnižšího pH (pH 3), což podporuje předpoklad kombinovaného účinku obou parametrů. Tomu nasvědčuje i fakt, že v případě vyšších pH došlo k poklesu HA až po 10 hodinách (pH 4, 100 mM MES) či 15 hodinách (pH 5, pH 6, 100 mM MES) konjugace. Naproti tomu v případě nižší koncentrace pufru (20 mM MES, obr. 45D) docházelo u pH 5 a pH 6 k nárůstu množství konjugované HA i po 15 hodinách. I po této době však množství HA konjugované při těchto podmínkách dosahuje maximálně 50 % množství konjugovaného po 1 hodině při pH 3 (20 mM MES, obr. 45D). Optimální doba konjugace je tedy silně závislá na použitém pufru a pH.

6.3.2.2 Vliv pH konjugace

Z hlediska pH se jako nejvhodnější pro účinnost vazby ukázalo nejnižší testované pH – tedy pH 3. Z výsledku vyplývá, že při jedнокrokové konjugaci kyseliny hyaluronové prostřednictvím EDC/NHS je pro účinnost vazby významnější míra protonace EDC a kyseliny hyaluronové než míra protonace aminoskupin na povrchu nanovláken při následné konjugaci amidací. Amidace je nejuspěšnější při použití vyššího pH, kdy je amin deprotonovaný. Proto je často preferována dvoukroková metoda konjugace, kdy aktivace karboxylu je prováděna nejčastěji při pH 4.5 – 7.5 a pro následnou amidaci je preferováno pH v rozmezí 7.5 až 8. Důvodem je, že amidace při pH 4.75 může díky protonaci aminu vést ke vzniku nereaktivní N-acylmočoviny a snižovat tím účinnost konjugace [221, 270, 277]. Jak je patrné z grafů na obrázku 45A-D, pH použité při jedнокrokové reakci silně ovlivňovalo množství konjugované kyseliny hyaluronové u všech testovaných pufrů a ve všech případech byla zaznamenána nejvyšší účinnost

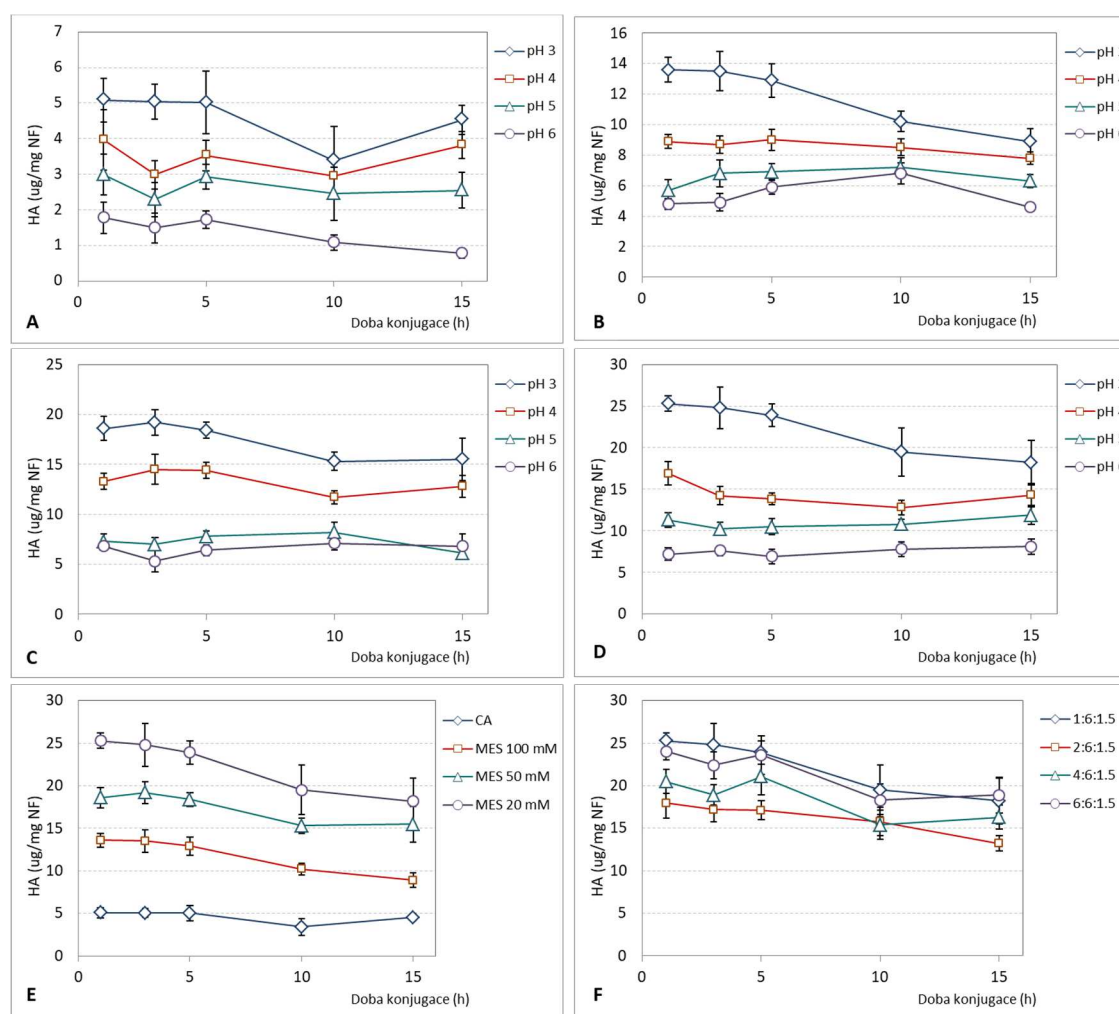
konjugace u pH 3. Nižší hodnota pH nebyla testována vzhledem k isoelektrickému bodu kyseliny hyaluronové okolo pH 2.5, kdy dochází ke skokovému nárůstu viskozity v této oblasti díky mezimolekulárním interakcím vlivem sníženého náboje [190, 278, 279]. Pro účinnou vazbu mezi EDC a karboxylovou kyselinou musí být EDC protonované na karbodiimidovém uhlíku a terciálním aminu, aby byla umožněna reakce s deprotonovaným karboxylem. Chang and Cox [280] pozorovali vliv pH na účinnost reakce a stanovili, že pH umožňující maximální konverzi je možné stanovit na základě disociačních konstant (pK_a) EDC a molekuly nesoucí karboxyl dle rovnice

$$pH = \frac{pK_a(RCOO_2H) + pK_a(EDCIH_2)}{2}, \quad (3)$$

kde pK_a ($EDCIH_2$) je 3.1 [280, 281]. U kyseliny hyaluronové, resp. kyseliny glukuronové se pro její karboxylovou skupinu uvádí disociační konstanta v rozmezí 3 – 4 [183, 282, 283]. V takovém případě by se pH nejúčinnější pro aktivaci molekul HA nacházelo v rozmezí 3.05 – 3.55. Tomu nasvědčují i výsledky provedených konjugací, kdy účinnost konjugace s rostoucím pH klesala. Kromě míry protonace karboxylových skupin může být konjugované množství kyseliny hyaluronové ovlivněno také konformací makromolekul HA. Ta je velice citlivá na okolní pH a uvádí se, že v rozmezí pH 3 – 4.5 se makromolekuly HA stáčí do čtyřnásobné levotočivé šroubovice s délkou o 0.11 nm kratší na disacharidovou jednotku než u pH 5 – 8 [284]. Tyto rozměrové změny tedy teoreticky umožňují interakci většího počtu molekul HA s jednotkou plochy.

Limitujícím faktorem při volbě optimálního pH reakce představuje možná degradace nosiče a konjugované molekuly. Ačkoli degradace křemičitých nanomateriálů podléhá degradaci spíše v zásaditém pH, v případě kyseliny hyaluronové byla potvrzena její degradace při $pH < 4$ a $pH > 11$ [285]. Rychlost zkracování řetězců HA, ke kterému dochází štěpením zejména u β -(1→4) glykosidové vazby, je potom závislé nejen na pH, ale i na teplotě. Tømmeraas and Melander [286] stanovili kinetické konstanty (k_h) pro jednotlivé hodnoty pH a teploty degradace. Kinetická konstanta definovaná jako úbytek molekulové hmotnosti HA ($1/M_w - 1/M_{w0}$) v čase byla pro pH 3.1 (25 °C) stanovena na $1 \times 10^{-7} \text{ h}^{-1}$ a pro pH 4 (25 °C) na $3 \times 10^{-8} \text{ h}^{-1}$. Na jejich základě bylo provedeno interní ověření [287] a kalkulace předpokládaného molekulové hmotnosti HA v čase. Při vystavení molekul kyseliny hyaluronové pH ~3 (25 °C) lze předpokládat zkrácení průměrné molekulové hmotnosti z 1.3 MDa na 1.15 MDa v průběhu jedné hodiny.

V případě použití pH 4 při reakci je to potom 1.251 MDa po jedné hodině reakce. S rostoucím pH se potom zkracování řetězců HA dále zpomaluje. Tomuto předpokladu odpovídají také výsledky dosažené při konjugaci, kdy prodloužená doba konjugace vede zejména u pH 3 ke ztrátě konjugované HA. Tento efekt je patrný zejména u konjugace po 10 a 15 hodinách a stejný trend byl pozorován u všech testovaných koncentrací HA (obr. 45 F). Naproti tomu v případě pH 5 a 6 je degradace, ale i konjugace pomalejší a může docházet k nárůstu konjugované HA i po 10 hodinách konjugace. Z hlediska degradace molekul kyseliny hyaluronové je tedy výhodné, že maximální konjugované množství bylo dosaženo po 1 hodině v pufrch s pH 3. U nanovláken vystavených pH 3 po dobu 1 hodiny také nebylo pozorováno závažné narušení nanovláčkové vrstvy, zlomy nanovláken ani koroze povrchu (viz obrázek 46).



Obr. 45 Vliv podmínek na konjugaci HA.

Vliv doby a pH v (A) McIlvainově pufru [261], (B) 100 mM MES, (C) 50 mM MES a (D) 20 mM MES pufru. (E) Porovnání průběhu konjugace v různých pufrch při pH 3. (F) Srovnání vlivu poměru HA:EDC:NHS na konjugaci (20 mM MES, pH 3).

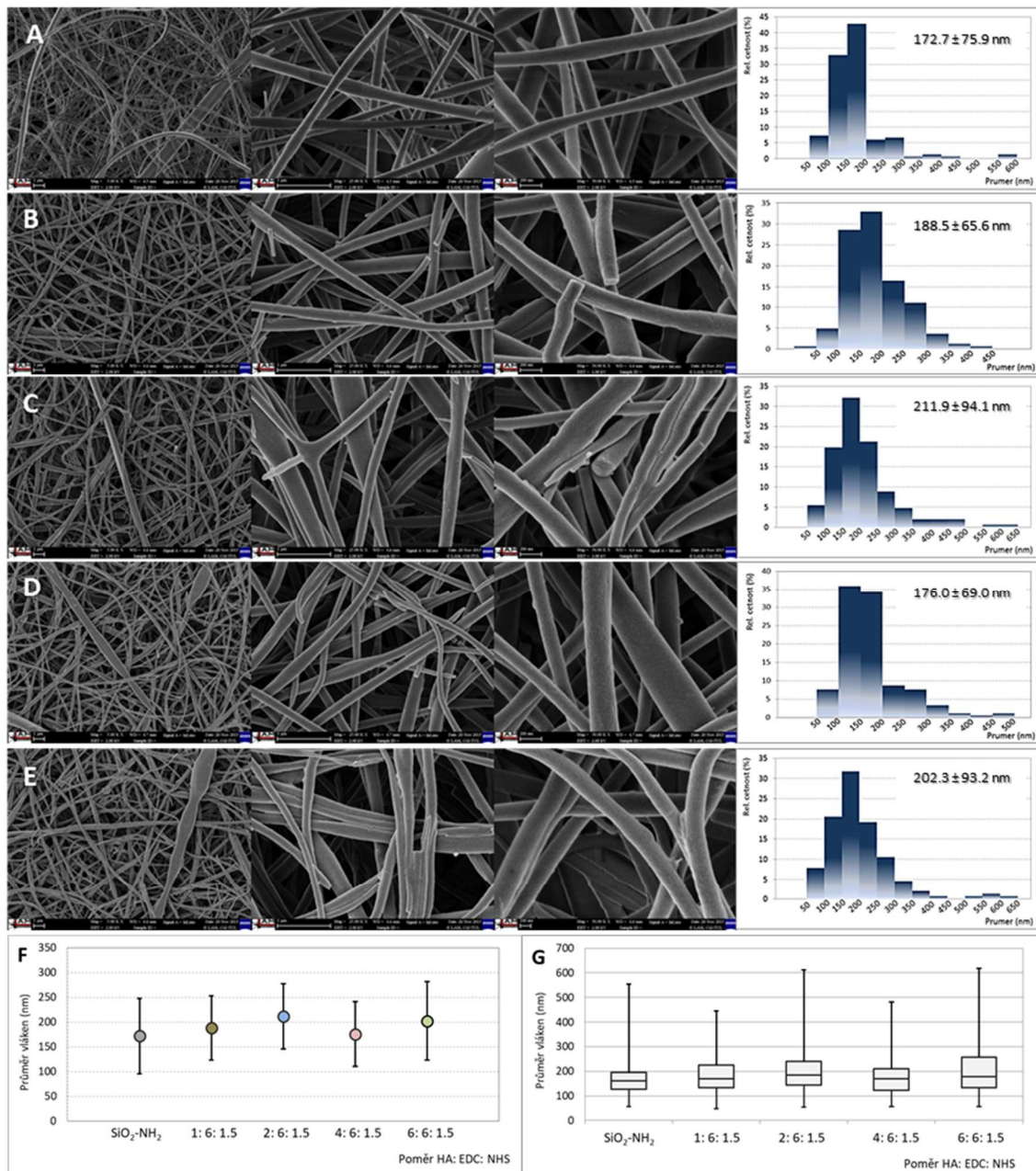
6.3.2.3 Vliv pufru

Ověřen byl také vliv použitého pufru na účinnost konjugace. Z porovnání výsledků uvedených na obrázku 45 A-D vyplývá, že vyšší účinnost konjugace HA je při použití MES pufru v porovnání s McIlvainovým pufrem. Tento efekt je možné vysvětlit přítomností kyseliny citronové v McIlvainově pufru, kdy EDC může kromě molekul kyseliny hyaluronové reagovat také s karboxyly kyseliny citronové, což vede k nižšímu množství HA na povrchu nanovláken. Prokázán byl také vliv koncentrace pufru na účinnost konjugace. V případě MES byly srovnány 100 mM, 50 mM a 20 mM pufrů. Nejvyšší účinnost konjugace byla zaznamenána při použití nejnižší koncentrace – tedy 20 mM MES (viz obr. 45 D). Tento výsledek, tedy pozitivní vliv nižší koncentrace a tím i iontové síly, byl již pozorován u konjugace proteinů [288, 289]. V případě kyseliny hyaluronové tento výzkum prozatím publikován nebyl. Molekuly kyseliny hyaluronové jsou kromě pH silně ovlivňovány také interakcemi s ionty v závislosti na jejich typu a koncentraci [290, 291]. Tento efekt může být pravděpodobně vysvětlen přítomností sulfonové skupiny u molekuly MES, která může interagovat s molekulami HA a vést ke změnám v jejich konformaci (expanzi molekuly), interakcích s vodným prostředím, kdy dochází ke snížení hydratace molekuly, a v interakcích s dalšími molekulami. Jak již bylo popsáno v kapitole 1. 3. 2. 1, iontová síla pufru může mít vliv také na degradaci křemičitých nanovláken. Tento efekt se projevuje zejména při delší době konjugace (viz obr. 46 B, pH6, 15 hodin). Z dosažených výsledků tedy vyplývá, že optimální pufr pro dosažení nejvyššího možného množství konjugované kyseliny hyaluronové na povrchu nanovláken je 20 mM MES.

6.3.2.4 Vliv poměru HA a EDC

Vliv poměru kyseliny hyaluronové vůči EDC byl studován při současném zachování neměnného poměru EDC: NHS v reakční směsi. Na základě optimalizace pH a koncentrace pufru byl pro tuto studii zvolen 20 mM MES pufr s pH 3. Hodnoceno bylo nejen množství HA konjugované na povrch nanovláken, ale také vliv na jejich morfologii. Studované hmotnostní poměry HA: EDC: NHS byly 1: 6: 1.5, 2: 6: 1.5, 4: 6: 1.5 a 6: 6: 1.5. Pro konjugaci prostřednictvím karbodiimidové chemie se všeobecně doporučuje přebytek EDC vůči konjugované molekule [270, 292]. Ačkoli dostupná literatura často uvádí váhový přebytek kyseliny hyaluronové – např. 2: 1 [293] nebo až 17: 1 [294], je třeba brát v úvahu vysokou molekulovou délku HA a její vliv na

reálný počet karboxylových skupin reagujících s EDC. V případě molekulové hmotnosti 1.3 MDa ve směsi s hmotnostním poměrem HA: EDC 1: 6 činí molární poměr COOH: EDC zhruba 1: 12. V případě hmotnostního poměru 1: 1 (viz HA: EDC: NHS 6: 6: 1.5) je potom molární poměr COOH: EDC 1: 2. Vyšší podíl kyseliny hyaluronové v reakční směsi nebyl testován s ohledem na její vysokou molekulovou hmotnost a s ní související vysokou viskozitu vodných roztoků.



Obr. 46 SEM snímky nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou. (A) Křemičitá nanovláčka před konjugací. Nanovláčka po konjugaci s poměrem HA: EDC: NHS (B) 1: 6:1.5, (C) 2: 6: 1.5, (D) 4: 6: 1.5, (E) 6: 6:1.5. Doplněné histogramy distribuce průměrů nanovláken. Zvětšení 5 kx, 25 kx, 50 kx.

Z dosažených výsledků vyplývá (viz obr. 45 F), že nejnižší testovaný hmotnostní poměr (HA: EDC: NHS 1: 6: 1.5) vede k vazbě dostatečného množství kyseliny hyaluronové na povrch a další zvyšování podílu HA v reakční směsi nevede k vyšší výtěžnosti konjugace. V případě poměru 1: 6: 1.5 a 6: 6: 1.5 byla po 1 hodině konjugace dosažena téměř shodná množství HA na povrchu nanovláken – a to $25.3 \pm 0.9 \mu\text{g HA na mg nanovláken}$ a $24.04 \pm 0.96 \mu\text{g HA na mg nanovláken}$. Z hlediska vlivu na morfologii nanovláken nevedl žádný z testovaných podílů HA ke snížení porozity nanovláčkové vrstvy, uzavírání mezivláčkových pórů ani k formování nepravidelných útvarů na povrchu nanovláken. Konjugovaná kyselina vytvořila na povrchu nanovláken tenkou homogenní vrstvu, která byla pozorovatelná zejména ve spojích u dotýkajících se nanovláken (viz obr. 46 B a E, zvětšení 50 kx). Přítomnost konjugované HA sice vedla k mírnému nárůstu střední hodnoty průměru nanovláken, jak ukazují grafy na obrázku 46, nejednalo se ale o nárůst statisticky významný. Rovnoměrnou distribuci kyseliny hyaluronové v nanovláčkové vrstvě potom prokázalo barvení toluidinovou modří O (TBO, viz obr. 49 A).

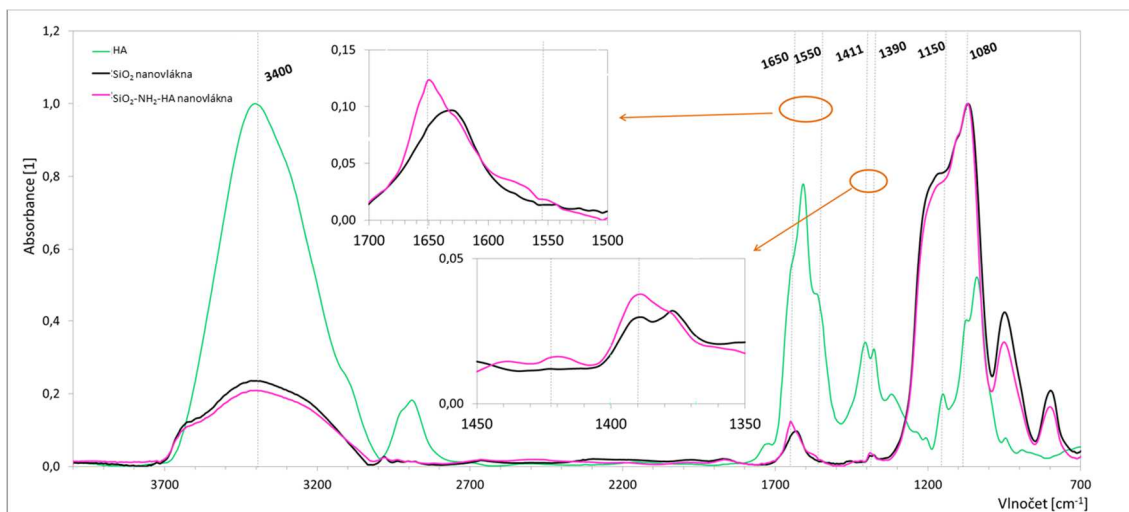
6.3.3 Výsledky chemické a povrchové analýzy

Pro chemickou analýzu nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou byla vzhledem k výsledkům optimalizace podmínek konjugace zvolena vrstva s nejvyšším podílem HA na povrchu – tedy $25.3 \pm 0.9 \mu\text{g HA na mg nanovláken}$. Ta byla připravena konjugací po dobu 1 hodiny v reakční směsi HA: EDC: NHS 1: 6: 1.5 v MES pufru (20 mM, pH 3).

Přítomnost kyseliny hyaluronové na povrchu nanovláken byla ověřena prostřednictvím infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS). Vliv přítomnosti konjugované kyseliny hyaluronové na smáčivost povrchu byla hodnocena měřením kontaktního úhlu přisedlé kapky.

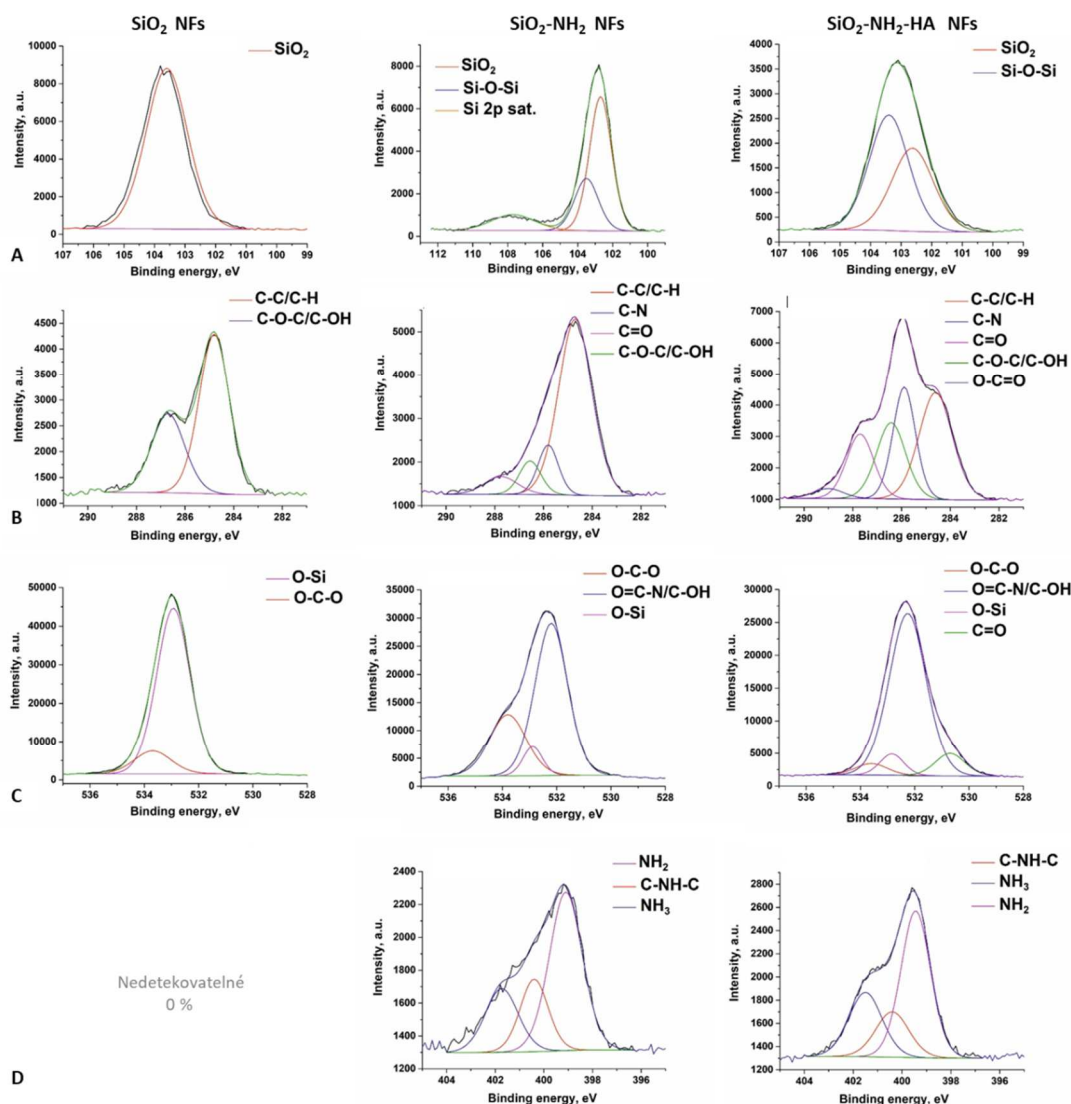
FTIR analýza nanovláken prokázala přítomnost konjugované kyseliny hyaluronové, jejíž spektrum se vyznačuje několika typickými vrcholy (viz obrázek 47). Přítomnost aminoskupin na povrchu nanovláken před konjugací se metodou FTIR prokázat nepodařilo – pravděpodobně vzhledem k jejich nízkému množství na povrchu nanovláken, které bylo pod detekčním limitem metody. Spektrum volné kyseliny

hyaluronové se vyznačuje vrcholem na vlnočtu $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$. Ten je typický pro O-H a N-H (vodíkové můstky) vibrace a je ovlivněn také molekulami vody sorbovanými na řetězce HA. V případě konjugované kyseliny hyaluronové nebylo pozorováno zvýšení intenzity u tohoto vrcholu ($\sim 3400\text{ cm}^{-1}$). Tento efekt by mohl být způsoben intenzivním sušením nanovláken před analýzou. Pro spektrum kyseliny hyaluronové je typický také vrchol na vlnočtu 2900 cm^{-1} . Ten je spojován s CH symetrickými a CH₂ asymetrickými vibracemi uhlíkového řetězce HA. Vrcholy v oblasti 1420 cm^{-1} až 1250 cm^{-1} jsou spojovány vibracemi typickými pro karboxylové skupiny. Zejména vibrace v oblasti kolem 1410 cm^{-1} jsou připisovány kombinaci asymetrických (C=O) a symetrických (C-O) vibrací karboxylové skupiny. Těm je připisován také vrchol na 1617 cm^{-1} . Oblast kolem vlnočtu 1650 cm^{-1} je potom spojována s vibracemi acetamidové skupiny pocházející z N-acetylglukosaminových jednotek. Spektrum kyseliny hyaluronové se vyznačuje také řadou typických vibrací v tzv. oblasti „otisku palce“, které jsou společné všem polysacharidům. Zde se vyskytují pásy spojené s vibracemi C-O-C v glykosidové vazbě (oblast kolem 1150 cm^{-1} a 1080 cm^{-1}) a vibracemi C-OH v sekundárních alkoholech ($\sim 1040\text{ cm}^{-1}$) [229, 295, 296]. U nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou byly sledovány zejména změny spektra v oblasti $1700 - 1500\text{ cm}^{-1}$. Ty jsou spojovány s úspěšnou konjugací a vznikem peptidické vazby [229]. Pozorovány byly změny zejména u vrcholů na vlnočtech 1650 cm^{-1} a $1580 - 1550\text{ cm}^{-1}$. Ty jsou označovány jako vibrace pásu amidu I a amidu II, které spojují vibrace C=O a N-H. U nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou byl potvrzen nárůst absorbance u vrcholů na vlnočtech 1650 cm^{-1} a 1555 cm^{-1} . Kromě toho byl pozorován nárůst absorbance v oblasti okolo 1400 cm^{-1} (1390 a 1420 cm^{-1}). Tato oblast vypovídá o asymetrických (C=O) a symetrických (C-O) vibracích spojovaných s karboxylovými skupinami, jejichž přítomnost je typická pro molekuly kyseliny hyaluronové. V tomto případě by se jednalo o karboxylové skupiny přítomné na konjugovaných řetězcích kyseliny hyaluronové, ale nevyužité k vazbě.



Obr. 47 FTIR spektra křemičitých nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou. Podmínky konjugace: 20 mM MES, pH 3, HA: EDC: NHS 1: 6: 1.5.

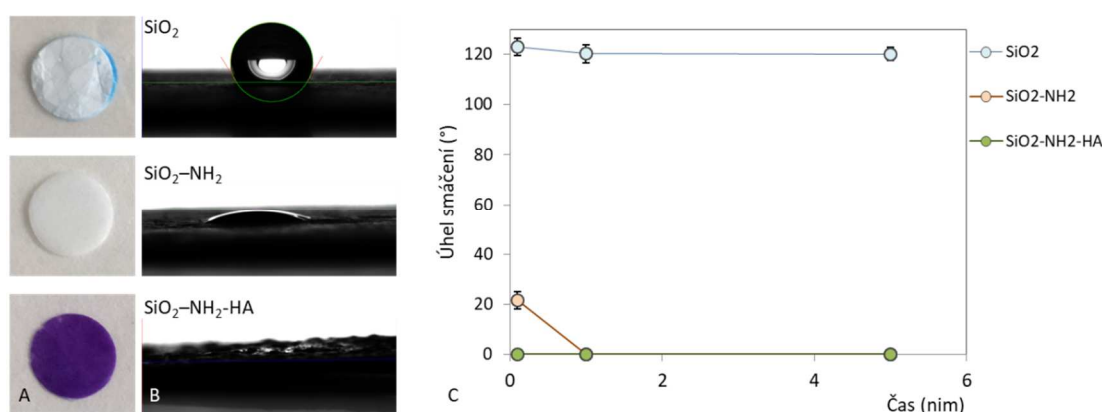
Při analýze nanovláken metodou XPS bylo složení povrchu nanovláken určeno vyhodnocením vrcholů pro prvky C 1s, N 1s, O 1s, Si 2p [297 - 299]. Analýza metodou XPS byla na rozdíl od FTIR schopna prokázat přítomnost primárních aminoskupin na povrchu křemičitých nanovláken po silanizaci (viz obr. 48 D, spektra N 1s). Přítomnost aminoskupin byla potvrzena také analýzou atomárního složení, které prokázalo přítomnost 3.6 % dusíku u silanizovaných nanovláken na rozdíl od neupravených křemičitých nanovláken, u kterých nebyla přítomnost dusíku prokázána vůbec. U silanizovaných nanovláken byl prokázán také vznik chemických stavů Si-O-Si vazeb (obr. 48 A, Si 2p) a C-N vazeb (obr. 48 B, C 1s) na povrchu.



Obr. 48 FTIR spektra křemičitých nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou. Podmínky konjugace: 20 mM MES, pH 3, HA: EDC: NHS 1: 6: 1.5. Spektra nanovláken pro (A) Si 2p, (B) C 1s, (C) O 1s a (D) N 1s.

Vazba kyseliny hyaluronové na povrch nanovláken byla prokázána především zvýšením podílu C=O, C-O-C/ C-OH (C 1s) a vznikem O-C=O (C 1s) (viz obr. 48 B) a vznikem C=O (O 1s, obr. 48 C) ve srovnání s neupravenými a silanizovanými nanovláčky. Z hlediska podílu jednotlivých prvků na složení povrchu nanovláken, vedla konjugace HA k nárůstu uhlíku C 1s na 38 % z 18 % zjištěných u silanizovaných nanovláken a k nárůstu dusíku N 1s na 4.9 % z 3.6 %. Zároveň byl na povrchu nanovláken po konjugaci zaznamenán 0.4% podíl sodíku. Důvodem je, že pro konjugaci byla použita sodná sůl kyseliny hyaluronové.

U obou fází povrchové funkcionalizace křemičitých nanovláken byl také potvrzen vliv na smáčivost povrchu. Tento parametr je významný zejména pro rychlou sorpci léčiva z vodných roztoků. Smáčení povrchu bylo sledováno v čase (10s, 1min, 5 min). V případě křemičitých nanovláken, charakteristických hydrofobním povrchem, nedošlo v průběhu této doby k významnému poklesu kontaktního úhlu a jeho hodnota byla po 5 minutách $120.2 \pm 2.7^\circ$. Silanizací nanovláken došlo k hydrofilizaci povrchu, kdy počáteční kontaktní úhel přisedlé kapky byl $21.6 \pm 3.4^\circ$ a po 1 minutě došlo ke kompletnímu smáčení povrchu. Konjugací kyseliny hyaluronové byl dosažen vysoce hydrofilní povrch, u kterého došlo okamžitě po aplikaci kapky ke smáčení povrchu, jak ukazují snímky na obrázku 49 B a C.



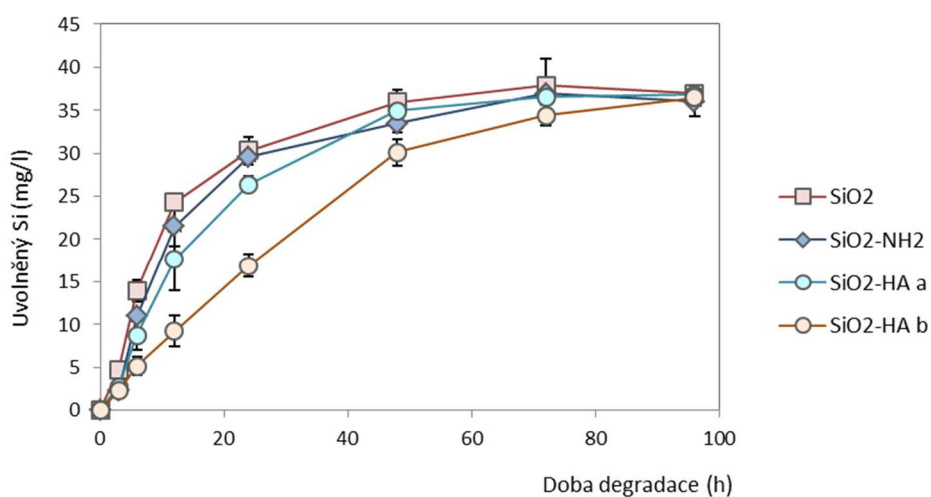
Obr. 49 Vliv funkcionalizace křemičitých nanovláken na smáčivost povrchu. (A) Vizualizace karboxylových skupin přítomných na povrchu nanovláken díky konjugaci kyseliny hyaluronové (20 mM MES, pH 3, 1: 6: 1.5). (B) Tvar přisedlé kapky po 10 s od její aplikace na povrch nanovláken. (C) Vývoj kontaktního úhlu přisedlé kapky v čase.

6.3.4 Vliv povrchové funkcionalizace na biodegradabilitu

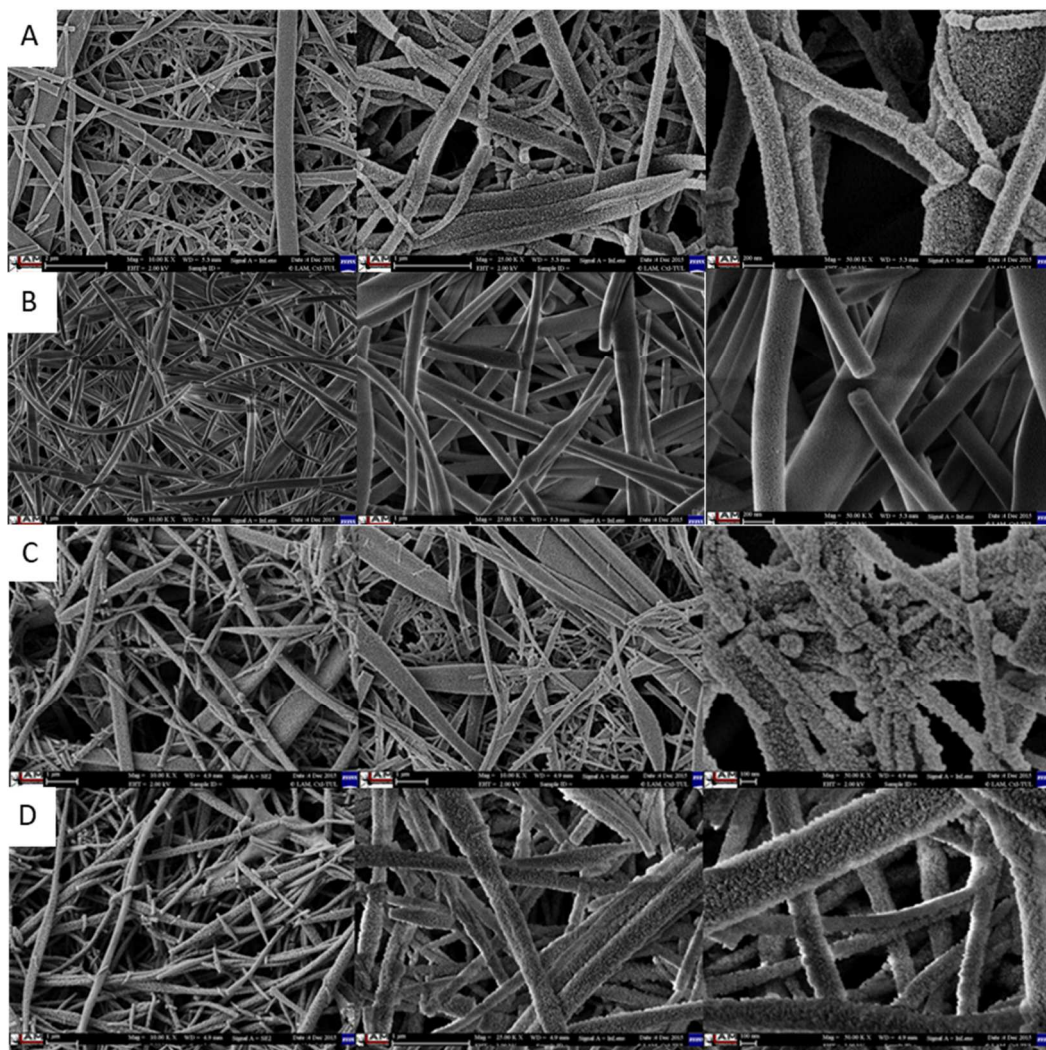
Analýza degradace v simulovaných podmínkách potvrdila vliv povrchové funkcionalizace na degradaci křemičitých nanovláken *in vitro*. Křemičité nanomateriály jsou všeobecně považovány za biodegradabilní materiál, přičemž rychlost degradace závisí na metodě přípravy a podmínkách zpracování [273 - 276]. Jak je patrné z grafu na obrázku 50, povrchová funkcionalizace vedla ke zpomalení degradace křemičitých nanovláken. Ta byla hodnocena jako kumulativní množství křemíku uvolněného v čase. Podobný efekt povrchové funkcionalizace křemičitých nanomateriálů popisuje i literatura a jeho trvání je závislé na metodě a stabilitě povrchové modifikace [300]. V případě silanizovaných křemičitých nanovláken byla degradace zpomalena pouze v

prvních hodinách a po 24 hodinách degradace bylo množství uvolněného křemíku téměř shodné – tedy 30.3 ± 1.6 mg Si/ l (SiO_2) a 29.6 ± 0.5 mg Si/ l ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2$). Zpomalení uvolňování křemíku mohlo být v tomto případě způsobeno také odstraněním residuí prekurzoru TEOS a oligomerních řetězců v průběhu silanizace. Ty, pokud jsou v materiálu přítomné, přispívají k množství křemíku uvolněného především v prvních hodinách degradace. Konjugace kyseliny hyaluronové vedla k dalšímu zpomalení procesu degradace. To bylo závislé na množství kyseliny hyaluronové konjugované na povrch. V případě nízkého množství HA na povrchu ($1.8 \mu\text{g HA/ mg}$) bylo množství uvolňovaného křemíku sníženo pouze na prvních 24 hodin na 26.4 ± 0.9 mg Si/ l. Po 48 hodinách bylo množství uvolněného křemíku téměř shodné - tedy 35.9 ± 0.3 mg Si/ l (SiO_2) a 34.9 ± 2.5 mg Si/ l ($\text{SiO}_2\text{-HA a}$). Konjugace nejvyššího dosaženého množství HA ($25.3 \mu\text{g HA/ mg}$) vedla ke zpomalení degradace po dobu 72 hodin. Po 72 hodinách uvolnila neupravená nanovlákná 37.9 ± 3.1 mg Si/ l, zatímco nanovlákná s konjugovanou HA 34.4 ± 1.2 mg Si/ l. Po 96 hodinách degradace bylo množství uvolněného křemíku téměř shodné – tedy 36.9 ± 0.6 mg Si/ l (SiO_2) a 36.4 ± 0.3 mg Si/ l ($\text{SiO}_2\text{-HA b}$). Jak je patrné z grafu na obrázku 50, rychlost degradace nanovláken se mění s postupem degradace. V případě neupravených křemičitých nanovláken byl křemík v prvních 24 hodinách uvolňován průměrnou rychlostí 1.26 mg Si/ l/ h, mezi 24. a 48. hodinou degradace došlo ke zpomalení na 0.24 mg Si/ l/ h a následně na 0.082 mg Si/ l/ h mezi 48 a 72 hodinou degradace. V případě konjugované kyseliny hyaluronové ($25.3 \text{ HA } \mu\text{g/ mg}$) mělo uvolňování rychlost 0.7 mg Si/ l/ h v prvních 24 hodinách, následně došlo ke zpomalení degradace na 0.55 mg Si/ l/ h mezi 24. a 48. hodinou a 0.068 mg Si/ l/ h mezi 48. a 72. hodinou. Vyšší rychlost degradace nanovláken mezi 24. a 48. hodinou v porovnání s neupravenými nanovlákná lze vysvětlit narušením hyaluronového obalu nanovláken. Tuto domněnku podporují také výsledky z mikroskopické (SEM) analýzy povrchu nanovláken na obrázku 51. Z nich je patrný rozdíl v narušení povrchu nanovláken zejména po 24 hodinách v STT, kdy u neupravených nanovláken již probíhá eroze povrchu, zatímco nanovlákná s konjugovanou kyselinou hyaluronovou vykazují stále hladký povrch bez narušení. Po dalších 24 hodinách degradace už narušení povrchu vykazují i ona. I když narušení povrchu se jeví nižší a integrita nanovláknenné vrstvy lepší v porovnání s neupravenými nanovlákná. Analýza povrchu nanovláken po degradaci zároveň prokázala, že křemičitá nanovlákná vykazují schopnost popsanou i u jiných nanomateriálů na bázi oxidu křemíku – tedy degradaci struktury bez botnání a schopnost uchování strukturní

integrity i po ztrátě až 85% podílu hmoty [275, 276]. Tento efekt je významný zejména z pohledu aplikace v hojení ran, kdy nedochází k uzavírání mezivlákněných pórů botnáním a tím ztrátě výměny plynů mezi ránou a vnějším prostředím. Zachování integrity nanovláken v průběhu degradace zároveň umožňuje vyjmutí nedegradovaných zbytků z rány, tak aby nedošlo k jejímu přetížení degradačními produkty. Křemík přítomný v tkáni ve vysoké koncentraci totiž může vykazovat cytotoxický efekt [273].



Obr. 50 Průběh degradace neupravených a funkcionalizovaných nanovláken v STT. Hodnoceno množstvím křemíku uvolněného do STT. Nanovlákná s konjugovanou kyselinou hyaluronovou nesoucí 1.8 μg HA/ mg (SiO_2 -HA a) a 25.3 μg HA/ mg (SiO_2 -HA b).



Obr. 51 Vývoj morfologie nanovláken v průběhu degradace v simulovaných podmínkách. (A, C) Neupravená nanovláčka po 24 a 48 hodinách degradace. (B, D) Nanovláčka s konjugovanou kyselinou hyaluronovou ($25.3 \mu\text{g HA}/\text{mg}$) po 24 a 48 hodinách degradace v STT *in vitro*.

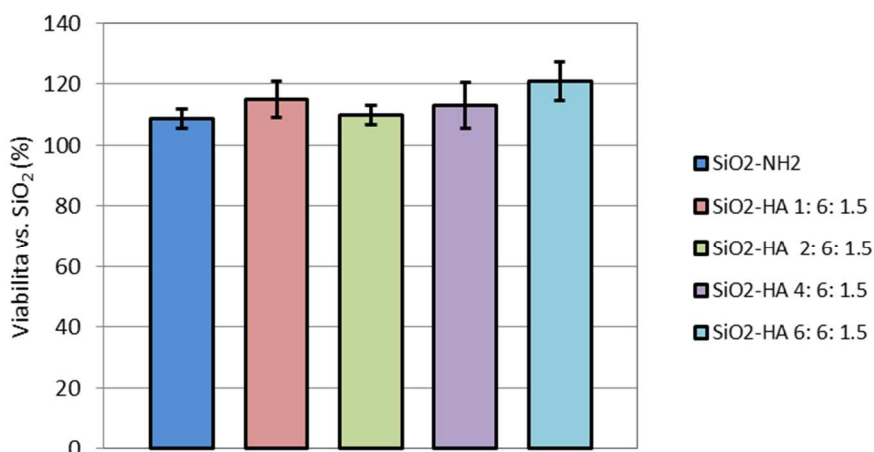
6.3.5 Biokompatibilita funkcionalizovaných nanovláken

V návaznosti na studii biodegradace funkcionalizovaných nanovláken byla provedena také studie jejich biokompatibility *in vitro*. V první fázi byla hodnocena biokompatibilita v přímém kontaktu. Následně byla ověřena adheze buněk k povrchu nanovláken a jejich proliferace na nich. Chování buněk v kontaktu s povrchem nanovláken je významné zejména pro predikci chování nanovláčenného substrátu v ráně, kde je buněčná adheze nežádoucí vzhledem k riziku přirůstání krytu ke spodině rány. To musí být následně řešeno silovým případně až chirurgickým odstraněním, což vede k narušení spodiny rány a tím k narušení procesu hojení.

6.3.5.1 Biokompatibilita in vitro

Test biokompatibility provedený tzv. „v přímém kontaktu“ dle normy ISO 10993-5:2009, prokázal biokompatibilitu všech funkcionalizovaných nanovláken. U všech testovaných nanovláken – a to jak silanizovaných, tak i s konjugovanou kyselinou hyaluronovou došlo ke zlepšení viability v porovnání s neupravenými nanovláknem, jak ukazuje graf na obrázku 52. Srovnán byl také vliv poměru HA a EDC v reakční směsi vzhledem k předpokladu, že ačkoli zvýšení podílu HA nevede k vyššímu množství konjugovanému na povrch, může mít tento poměr vliv na hustotu formovaných vazeb.

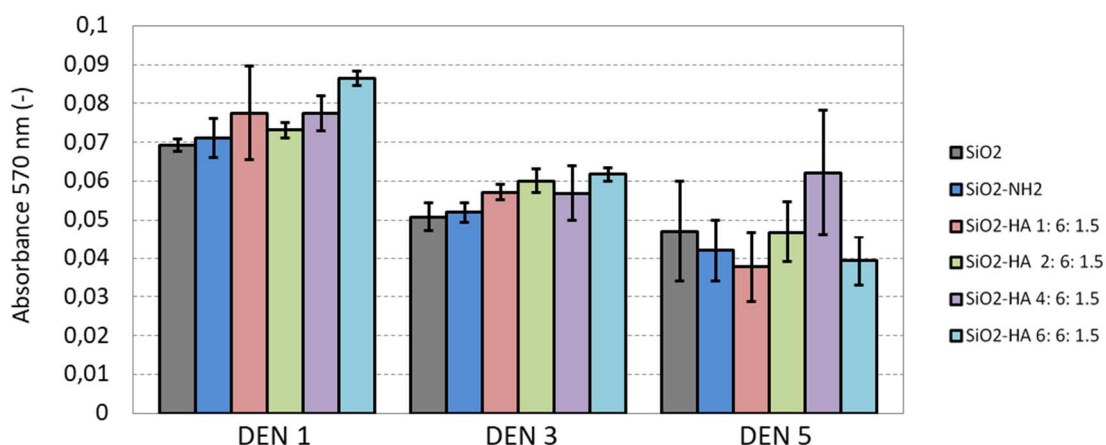
Silanizace povrchu vedla k viabilitě myších fibroblastů 3T3 108.8 ± 3.1 % metabolické aktivity buněk vystavených působení neupraveným nanovláknem. Konjugace kyseliny hyaluronové vedla k dalšímu zvýšení viability buněk. Ta byla 115.1 ± 5.9 % v případě poměru HA: EDC 1: 6, 110.3 ± 3.2 % u HA: EDC 2: 6, 113.5 ± 7.4 % u HA: EDC 4: 6 a 120.9 ± 6.2 % u HA: EDC 6: 6. Tyto výsledky korelují s množstvím HA vázaným na povrchu. Vzhledem k vlivu množství HA na degradaci křemičitých nanovláken lze předpokládat, že zvýšená viabilita je způsobená nižším množstvím křemíku uvolněného z nanovláken. Tyto výsledky korelují také s daty publikovanými Moghaddam et al. [273, 301, 302].



Obr. 52 Biokompatibilita funkcionalizovaných nanovláken. Viabilita 3T3 myších fibroblastů vyjádřena jako procentuální podíl z viability buněk vystavených neupraveným SiO₂ nanovláknem v přímém kontaktu po dobu 24 hodin.

6.3.5.2 Buněčná adheze a proliferace in vitro

Studie buněčné adheze a proliferace na povrchu křemičitých nanovláken prokázala vliv povrchové funkcionalizace na buněčnou adhezi k povrchu. Počet buněk adherovaných na povrch rostl s množstvím konjugované kyseliny hyaluronové, jak ukazuje obrázek 53 (DEN 1). Nejvyšší adheze byla zaznamenána u nanovláken upravených poměrem HA: EDC 6: 6. Zde vedla konjugace k nárůstu počtu adherovaných buněk o 19.5 % ve srovnání s neupravenými nanovláčky. V případě poměru HA: EDC 1: 6 vedla konjugace HA k nárůstu o 10.2 %. Přítomnost kyseliny hyaluronové na povrchu měla vliv nejen na počet buněk na povrchu nanovláken, ale i jejich tvar. Jak ukazuje obrázek 54, fibroblasty adherované na povrch neupravených nanovláken si zachovávaly převážně kulatý tvar bez typického vřetenovitého protažení, zatímco buňky adherované na povrch s kyselinou hyaluronovou měly protáhlejší tvar typický pro tuto buněčnou linii. Kulatý tvar buněk nasvědčuje nízké podpoře buněčné adheze substrátem.

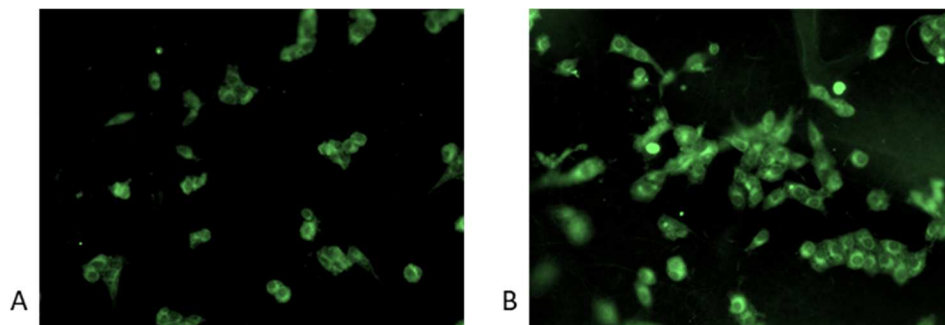


Obr. 53 Kolonizace funkcionalizovaných nanovláken buňkami 3T3.

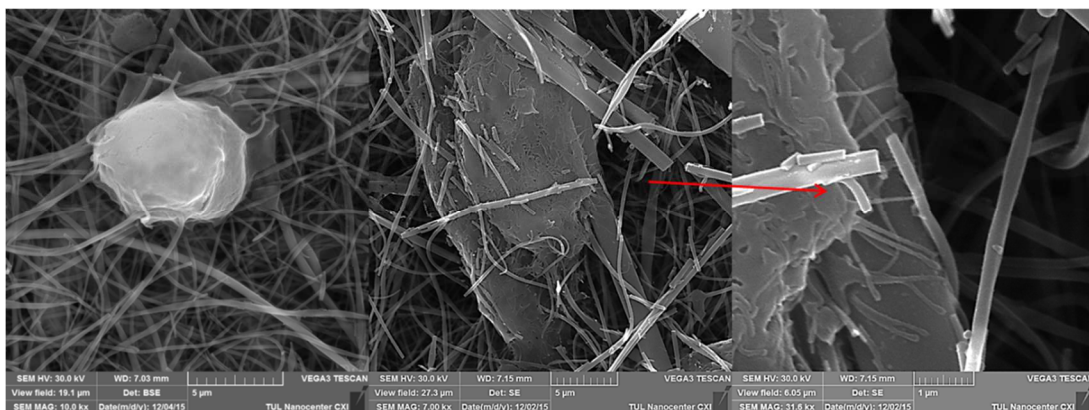
I přes zvýšenou adhezi, u žádného z nanovláčkových substrátů s konjugovanou HA nebyla pozorována podpora buněčné proliferace. Její přítomnost sice vedla k většímu počtu buněk ve srovnání s neupravenými nanovláčky, ale ve srovnání s prvním dnem došlo ve všech případech k poklesu počtu buněk na povrchu nanovláken. Tento efekt byl zkoumán s pomocí elektronové mikroskopie. Z výsledků analýzy vyplývá, že ani funkcionalizovaná nanovláčka neposkytují dostatečnou podporu pro buněčný růst vzhledem k erozi povrchu jednotlivých nanovláken a jejich křehkosti. Jak ukazují snímky na obrázku 55, dilatace buněk a jejich silové působení pomocí filopodií na

nanovlákna vede ke vzniku zlomů nanovláken. Zhoršená adheze buněk potom vede narušení buněčného cyklu a buněčné smrti.

Tyto výsledky naznačují, že konjugace kyseliny hyaluronové sice podporuje buněčnou adhezi v prvních hodinách, ale zároveň neumožňuje buněčnou proliferaci. Při aplikaci tohoto nanovláčenného krytu na ránu po dobu 3 dnů lze tedy předpokládat jeho nízkou adhezi ke spodině rány.



Obr. 54 Buňky adherované na povrchu (A) neupravených nanovláken a (B) nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou. Hodnoceno fluorescenční mikroskopií, barvení DiOC6, obj. 20x.



Obr. 55 Detailní pohled (SEM) na buňky 3T3 proliferující na povrchu nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou (den 3).

6.3.6 Shrnutí výsledků

Křemičitá nanovlákná připravená metodou elektrostatického zvláknování z volné hladiny byla úspěšně funkcionalizována roubováním primárních aminoskupin na jejich povrch a následnou konjugací kyseliny hyaluronové. V případě roubování funkčních skupin silanizací byl prokázán vliv koncentrace silanizačního činidla a doby procesu na množství funkčních skupin dosažené na povrchu. Jako optimální byla stanovena silanizace 3% APTES po dobu 2 hodin. Ověřen byl také vliv podmínek skladování na rehydroxylaci povrchu nanovláken po tepelné stabilizaci. V případě konjugace kyseliny hyaluronové na povrch nanovláken byl prokázán významný vliv pH reakční směsi a použitého pufru. Jako optimální pro dosažení nejvyššího možného množství HA na povrchu byla stanovena kombinace pH 3 a 20 mM MES pufru. Úspěšná vazba kyseliny hyaluronové, bez narušení nanovláknenné struktury ani vysoké porozity nanovláknenné vrstvy, byla potvrzena několika metodami. Byl prokázán pozitivní vliv konjugace na smáčení povrchu nanovláken, kdy silanizace i konjugace kyseliny hyaluronové vedly k hydrofilizaci povrchu. Oba kroky povrchové funkcionalizace měly také pozitivní vliv na biokompatibilitu nanovláken vůči fibroblastům 3T3-A31 v porovnání s neupravenými křemičitými nanovláknami. Povrchová funkcionalizace také v různé míře ovlivnila biodegradabilitu nanovláken a s ní související buněčnou adhezi a proliferaci. Bylo prokázáno, že konjugace kyseliny hyaluronové pouze zpomaluje degradaci *in vitro* a erozi povrchu nanovláken, což vede ke snížení buněčné proliferace na povrchu nanovláken po 3 dnech, stejně jako v případě neupravených křemičitých nanovláken. Je tedy možné prohlásit, že konjugace kyseliny hyaluronové na povrch křemičitých nanovláken vede ke zlepšení biokompatibility při zachování jejich biodegradability a dlouhodobě nepodporuje buněčnou proliferaci na jejich povrchu.

7 Hodnocení interakcí nanovláken s modelovými léčivy

7.1 Cíle kapitoly

Způsob vazby léčiva a kinetika jeho následného uvolňování představují významné parametry systémů pro dopravu léčiv a uvolňování léčiv. Volba systému je dána především typem léčiva, jeho rozpustností a způsobu administrace. Zatímco u hydrofobních léčiv s nízkou permeabilitou je při lokálních aplikacích snaha o vývoj lékových forem zajišťujících zlepšení jejich biodostupnosti [18, 19, 20], u hydrofilních

léčiv může, v závislosti na aplikaci převládat snaha o zlepšení stability při lokální aplikaci a zabránění odplavení léčiva z místa aplikace [21, 22].

V případě aplikace nanovláken jako nosičů pro lokální dopravu léčiv existuje několik možností vazby léčiva. V případě jejich inkorporace do hmoty nanovláken je limitujícím prvkem zejména stabilita léčiva v rozpouštědlovém systému. V případě ve vodě rozpustných nanovláken je to také kompatibilita s metodou síťování. Pokud není síťování (chemické, UV, případně tepelně iniciované) provedeno, potom dochází k rychlé ztrátě nanovláčkové struktury a porozity, což vede k omezení výměny plynů mezi ranou a vnějším prostředím a uvolnění neseného léčiva.

V případě kombinace ve vodě stabilního nanovláčkového systému a hydrofilního léčiva, není-li možná inkorporace léčiva do hmoty nanovláken, je léčivo vázáno na jejich povrch. Kinetika jeho uvolňování je potom dána způsobem vazby a charakterem interakcí s povrchem nanovláken.

V případě křemičitých nanovláken byla prokázána hydrofilizace jejich povrchu jak silanizací, tak konjugací kyseliny hyaluronové, při zachování struktury nanovláken a vysoké pórovitosti struktury. Zároveň byla potvrzena biodegradabilita systému a jeho biokompatibilita. U nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou byla barvením toluidinovou modří (TBO) prokázána přítomnost karboxylových skupin na povrchu. Ty mohou ovlivňovat interakce především s kationními léčivy při jeho sorpci a uvolňování.

Cílem této kapitoly je ověřit interakce vytvořeného nanovláčkového systému s modelovými léčivy. Ty jsou studovány z hlediska vazby v závislosti na typu léčiva, jeho koncentraci a pH vazby. Účinnost vazby je studována především z hlediska antibakteriální aktivity léčiva a kinetiky jeho uvolňování.

7.2 Materiály a metody

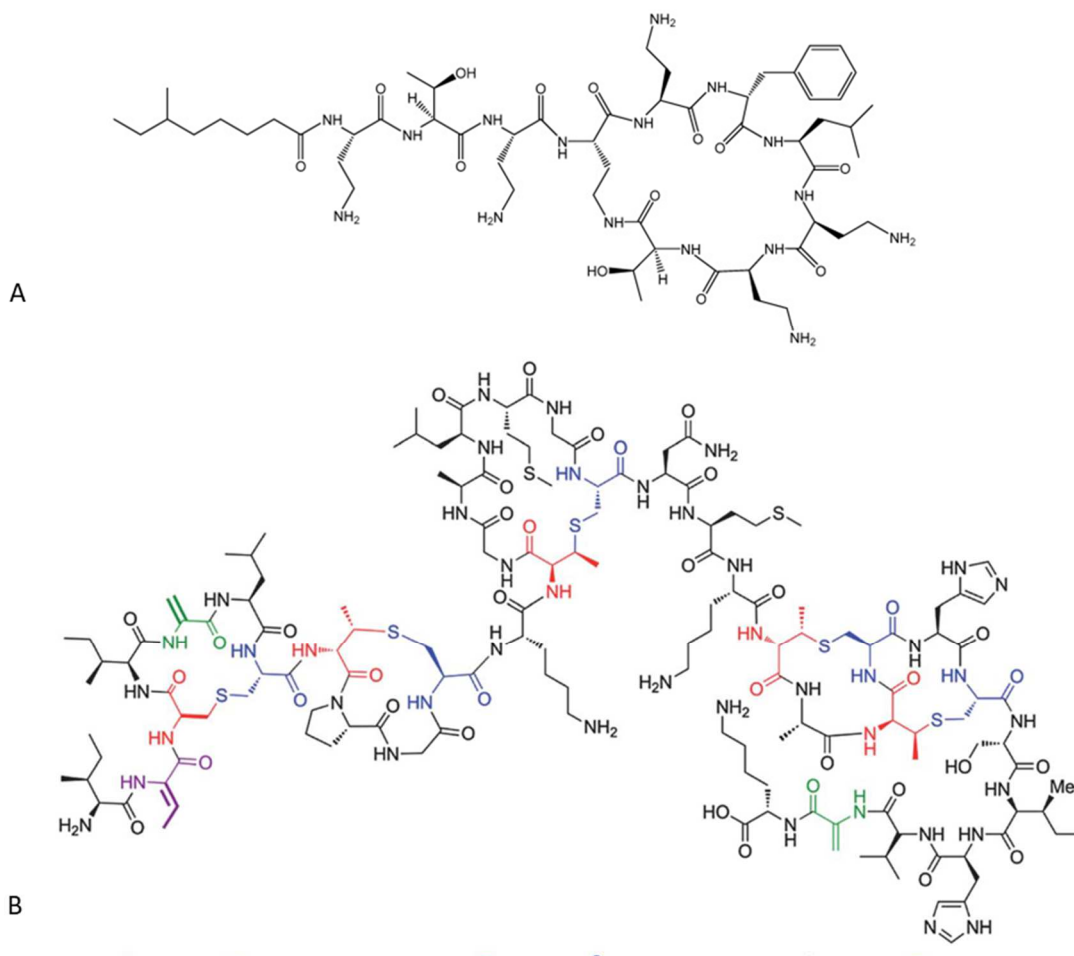
7.2.1 Volba modelového léčiva

Jako modelové léčivo bylo zvoleno antibiotikum polymyxin B (7941 IU/mg, EMD Millipore, USA) a protein nisin (Z, Handary, Belgie), jejichž molekulární struktury jsou uvedené na obrázku 56.

Polymyxin B je kationní lipopeptidové antibiotikum, patří do skupiny polymyxinů, jehož molekula obsahuje peptidový kruh a celkem pět primárních aminoskupin. Díky

své struktuře se při fyziologickém pH chová jako kation. Jeho antibakteriální účinnost využívá jeho náboje a spočívá v elektrostatických interakcích s negativně nabitou fosfátovou skupinou lipidu A v bakteriální buněčné membráně, což vede k její destabilizaci, zvýšení permeability a buněčné smrti [303, 304]. Polymyxin B je účinný vůči gramnegativním bakteriím včetně multirezistentního kmene *Acinetobacter baumannii*, jež způsobuje mimo jiné fatální infekce měkkých tkání [305, 306, 307, 308]. Vzhledem k jeho neurotoxicitě a nefrotoxicitě je výhodné jeho lokální aplikace zejména v případě kožních infekcí způsobených právě *Acinetobacterem baumannii* a dalšími rezistentními bakteriemi, např. ke karbapenemu rezistentní *Klebsiella pneumoniae* [308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316]. Vzhledem k jeho vysoké hydrofilitě a kationnímu charakteru je možné při jeho aplikaci zajistit jeho zvýšenou stabilitu formováním iontových komplexů s nosičem léčiv [317, 318].

Nisin je polycyklický antibakteriální peptid náležící do skupiny lantibiotik. Je získáván jako produkt fermentace bakterií *Lactococcus lactis*. Jeho antibakteriální účinnost spočívá ve vazbě na lipid II buněčných membrán, což vede k jejich narušení, tvorbě pórů a inhibici biosyntézy buněčných stěn. Tím je dána jeho účinnost vůči grampozitivním bakteriím, vzhledem k výskytu lipidu II na vnější straně jejich membrány. V případě gramnegativních bakterií je účinnost nisinu značně omezena vzhledem k lokalizaci lipidu II na vnitřní straně membrány [319]. Pro hojení ran je využití nisinu zajímavé pro jeho antibakteriální i protizánětlivé vlastnosti [320, 321, 322]. Vzhledem k isoelektrickému bodu ($I_p = 8.8$) nese molekula nisinu při fyziologickém pH kladný náboj. Což umožňuje jeho iontovou vazbu na opačně nabitě nosiče. [323]



Obr. 56 Chemická struktura (A) polymyxinu B a (B) nisinu [309, 324].

7.2.2 Imobilizace léčiva

Obě léčiva byla rozpuštěna v ultra čisté vodě s pH upraveným na požadovanou hodnotu. Většina imobilizací probíhala při pH 7. Pouze ve vybraných případech bylo pH imobilizačního roztoku upraveno na hodnotu 4. Koncentrace léčiva v imobilizačních roztocích byla 0.1 % (w/v) nebo 0.5 % (w/v). Imobilizace probíhala při pokojové teplotě smočením nanovláken v imobilizačním roztoku a následnou inkubací po dobu 30 minut za konstantní agitace (100 ot./ min). Upravená nanovlákna byla následně z roztoku vyjmuta a

- (a) sušena, nebo
- (b) rychle smočena v ultra čisté vodě a sušena, nebo
- (c) opakovaně promývána v ultra čisté vodě po dobu 30 minut a následně sušena při pokojové teplotě.

Tímto způsobem byla získána křemičitá nanovláknna bez/s povrchovou funkcionalizací a s léčivem zachyceným na povrchu nanovláken

- (a) iontovou vazbou a adsorpcí včetně podílu léčiva zachyceného kapilárními silami,
- (b) iontovou vazbou a adsorpcí bez podílu léčiva zachyceného kapilárními silami a
- (c) pouze iontovou vazbou (případně dalšími silnějšími interakcemi mezi povrchem nanovláken a molekulami léčiva).

Takto připravená nanovláknna byla dále analyzována.

7.2.3 Charakterizace nanovláken po imobilizaci

U nanovláken s imobilizovaným léčivem byl hodnocen vliv úpravy na morfologii – zejména na pórovitost nanovláken, prostřednictvím elektronové mikroskopie (SEM). Postup a přístrojové vybavení jsou popsány již v kapitole 5.2.3.1. Chemické složení bylo u vybraných vzorků hodnoceno infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací (FTIR). Postup a přístrojové vybavení využitě při FTIR analýze byly stejné jako v předchozích studiích a jsou popsány v kapitole 5.2.3.2.2.

7.2.4 Kinetika uvolňování léčiva

Kinetika uvolňování léčiva byla hodnocena v simulovaných podmínkách *in vitro*. Simulovaná tělní tekutina (STT) byla připravena dle receptury popsané v kapitole 6.2.7. STT byla připravena s pH upraveným na hodnotu 7.4, nebo případně na hodnoty 5.5 a 8.5. STT byla před zahájením testu rozdělena do testovacích nádob a temperována na teplotu 37 °C. Pro test kinetiky uvolňování polymyxinu B činil objem STT 3 ml na vzorek a 2 ml v případě nisinu. Tento objem byl stanoven na základě detekčního limitu analytické metody následně využívané ke kvantifikaci léčiva. Ze stejného důvodu byla pro test kinetiky uvolňování použita nanovláknna nesoucí léčivo získané vazbou včetně kapilárně zachyceného podílu. Nanovláknna s imobilizovaným léčivem o rozměru 15 mm byla vložena do uzavřené nádoby k temperované STT a inkubována při stabilní teplotě 37 °C a agitaci (50 ot./ min). Vzorky STT pro kvantifikaci uvolněného léčiva byly odebírány v časech 5, 15 a 30 minut a dále 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 a 72 hodin a nahrazovány adekvátním množstvím nové STT. Měřeno bylo kumulativní množství uvolněného léčiva. Každý vzorek byl testován ve dvou opakováních.

7.2.4.1 Stanovení koncentrace polymyxinu B

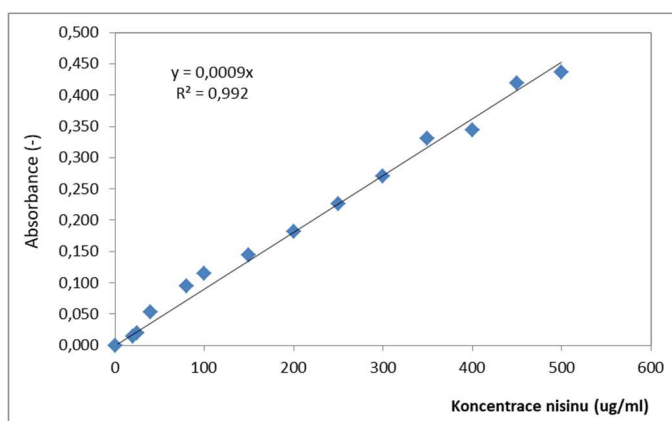
Koncentrace polymyxinu B byla stanovena pomocí LC/MS/MS. Byl použit HPLC systém Dionex ultimate 3000 sestávající z držáku na mobilní fáze s vakuovým degasserem, binární pumpou pro vysokotlaký gradient, autosamplerem a termostatem kolon. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr ABSciex 3200 QTRAP. K separaci byla použita kolona Phenomenex Kinetex F5 core-shell s velikostí částic 2.6 μm , délkou 10 mm and vnitřním průměrem 2.1 mm. Složka A mobilní fáze byla tvořena 55 mM trifluoroctovou kyselinou (TFA) s 25 mM NH_3 . Složka B mobilní fáze byl methanol čistoty HPLC/MS. Byl použit lineární gradient mobilní fáze a rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,275 ml/min po celou dobu analýzy. Profil gradientu je uveden v Tab. 1. Termostat kolon byl nastaven na 40°C. Měření bylo provedeno v pozitivním MRM módu. Napětí na ESI kapiláře bylo nastaveno na 5500 V, teplota na 500°C, curtain gas na 35 PSI, Gas 1 a Gas 2 oba na 40 PSI, vstupní potenciál na 10 V a potenciál úniku z kolizní cely na 3 V. Použité MRM přechody polymyxinu B jsou spolu s optimalizovanými hodnotami declusteračního potenciálu a kolizní energie pro každou z komponent popsány v tabulce 4. Pro všechny přechody byl použit dwell time 70 ms. Všechny přechody byly stále měřeny v průběhu celé chromatografické analýzy, která trvala 6,2 min. Bylo nastříkováno 10 μm vzorku. Byly použity externí standardy gentamycin sulfátu o koncentraci 0,5; 1, 2, 5 and 10 mg/l. Externí standardy polymixin sulfátu měly koncentraci 5, 10, 20 a 50 mg/l. Pro kvantifikaci polymyxinu B byl vzhledem k nejvyšší intenzitě použit MRM přechod 602.7/101. Rozdíly v kvantifikaci za použití ostatních přechodů by však byly téměř zanedbatelné. Na základě zjištěných koncentrací bylo kalkulováno kumulativní množství uvolněného léčiva.

Tab. 4 MRM přechody, declusterační potenciály a kolizní energie použité pro stanovení polymyxinu B.

Sloučenina	Izomer	Hmota Prekurzoru	Hmota Fragmentu	DP	CE
Polymixin B	PB1	595.8	101	65	60
	PB1	595.8	120	65	65
	PB2	602.7	101	70	55
	PB2	602.7	120	70	60
	PB1 adukt	651.6	101	32	60
	PB1 adukt	651.6	120	32	70

7.2.4.2 Stanovení koncentrace nisinu

Koncentrace nisinu byla stanovena BCA metodou chromogenní reakcí s bicinchoninovou kyselinou dle protokolu výrobce (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoScientific, USA). Měření bylo provedeno v 96-jamkové mikrotitrační destičce v triplikátu pro každý vzorek. V každé jamce bylo smíšeno 25 μ l STT s neznámým obsahem nisinu s 200 μ l roztoku WR (BCA A: BCA B 50:1). Po promísení na orbitální třepačce byla destička inkubována po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Následně byla měřena absorbance při 562 nm. Množství nisinu bylo zjištěno přepočtem přes rovnici lineární regrese kalibrační křivky ($y = 0.0009x$, $R^2 = 0.992$) uvedené na obrázku 57. Následně bylo vypočteno kumulativní množství nisinu volněného do STT v daném čase.



Obr. 57 Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace nisinu metodou BCA.

7.2.5 Hodnocení antibakteriální účinnosti

Antibakteriální účinnost nanovláken s imobilizovaným léčivem byla hodnocena diskovou difuzní metodou. Jako modelová gramnegativní bakterie byla použita *Escherichia coli* (CCM 7929, Česká sbírka mikroorganismů). Jako modelová grampozitivní bakterie byl použit *Staphylococcus gallinarum* (CCM 3572, Česká sbírka mikroorganismů). Bakteriální suspenze byla 20 – 24 hodin po oživení v bujonu TSB (trypton sójový bujón, Thermo Scientific) naředěna na koncentraci 10^4 bakterií na ml. 1 ml této suspenze byl rovnoměrně inokulován na vrstvu univerzálního agaru TSA (trypton sójový agar, Thermo Scientific) na petriho misce. Po vstřebání přebytečné tekutiny byly na agar aplikovány vzorky nanovláken (kruhová výseč, $d = 10$ mm). Každý vzorek byl testován triplikátu. Petriho misky byly inkubovány při teplotě 37 °C.

Po 24 hodinách bylo provedeno vyhodnocení měření rozměru difuzní zóny. Rozměr difuzní zóny byl měřen jako její průměr bez odečtení rozměru vzorku. V případě, že byl růst bakterií inhibován pouze v přímém kontaktu se vzorkem a v jeho okolí nebyla formována difuzní zóna, byl rozměr difuzní zóny hodnocen jako ($d = 1 \text{ cm}$).

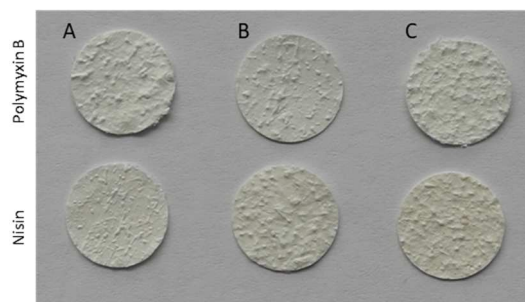
7.2.5.1 Hodnocení antibakteriální účinnosti v čase

Hodnocena byla také antibakteriální účinnost nanovláken s imobilizovaným léčivem v čase. Studie byla provedena stejnou metodou, ale po 24 hodinách inkubace byl vzorek, po vyhodnocení rozměru difuzní zóny, přenesen na novou agarovou misku inokulovanou čerstvě připravenou bakteriální suspenzí o stejné koncentraci (10^4 bakterií/ ml). Inkubace následně probíhala dalších 24 hodin při stejných podmínkách ($37 \text{ }^\circ\text{C}$). Tímto způsobem byla hodnocena prodloužená antibakteriální účinnost po dobu až 72 hodin.

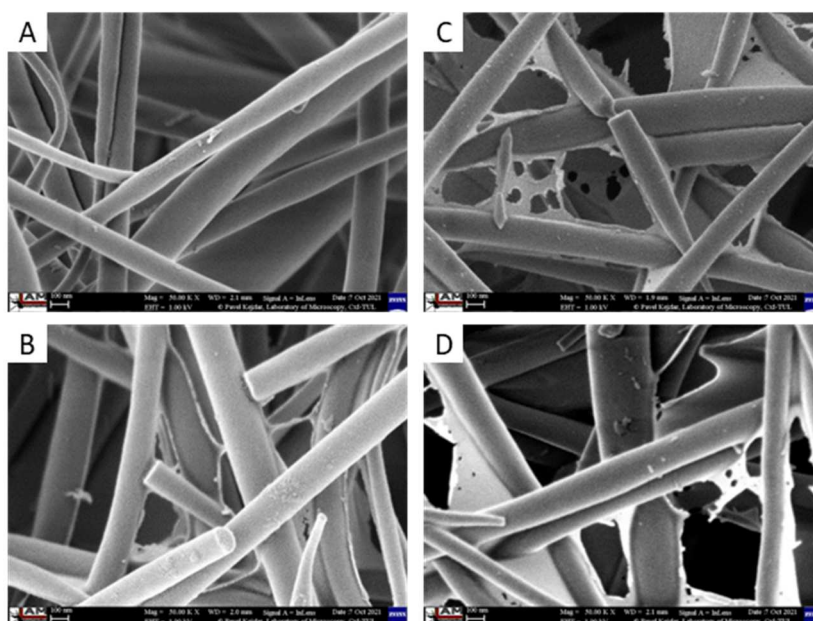
7.3 Výsledky a jejich diskuse

7.3.1 Vliv léčiva na morfologii nanovláken

Imobilizace léčiva na povrch nanovláken nevedla k makroskopicky pozorovatelným změnám v jejich struktuře. Pouze v případě silanizovaných nanovláken a nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou vedla vazba nisinu k jemně nažloutlému zbarvení indikující jeho přítomnost ve vyšší koncentraci (viz obr. 58). Mikroskopická analýza potvrdila, že při imobilizaci polymyxinu nedochází ani při použití 0.5% roztoku k snižování porozity a léčivo obaluje jednotlivá nanovláčka (viz obr. 59 B). Naproti tomu imobilizace nisinu vedla po vysušení i u nižší koncentrace (0.1 %) v roztoku k tvorbě membrán a uzavírání mezivláčkových pórů. Byla pozorována ztráta zhruba 20 % pórů u obou testovaných koncentrací (0.1 % a 0.5 %). Vzhledem k hydrofilní povaze nisinu lze ale předpokládat, že tato ztráta porozity je pouze dočasná.



Obr. 58 Vzhled křemičitých nanovláken po immobilizaci léčiva z 0.5% roztoku. Srovnání (A) neupravených nanovláken, (B) silanizovaných nanovláken a (C) nanovláken s konjugovanou kyselínou hyaluronovou.



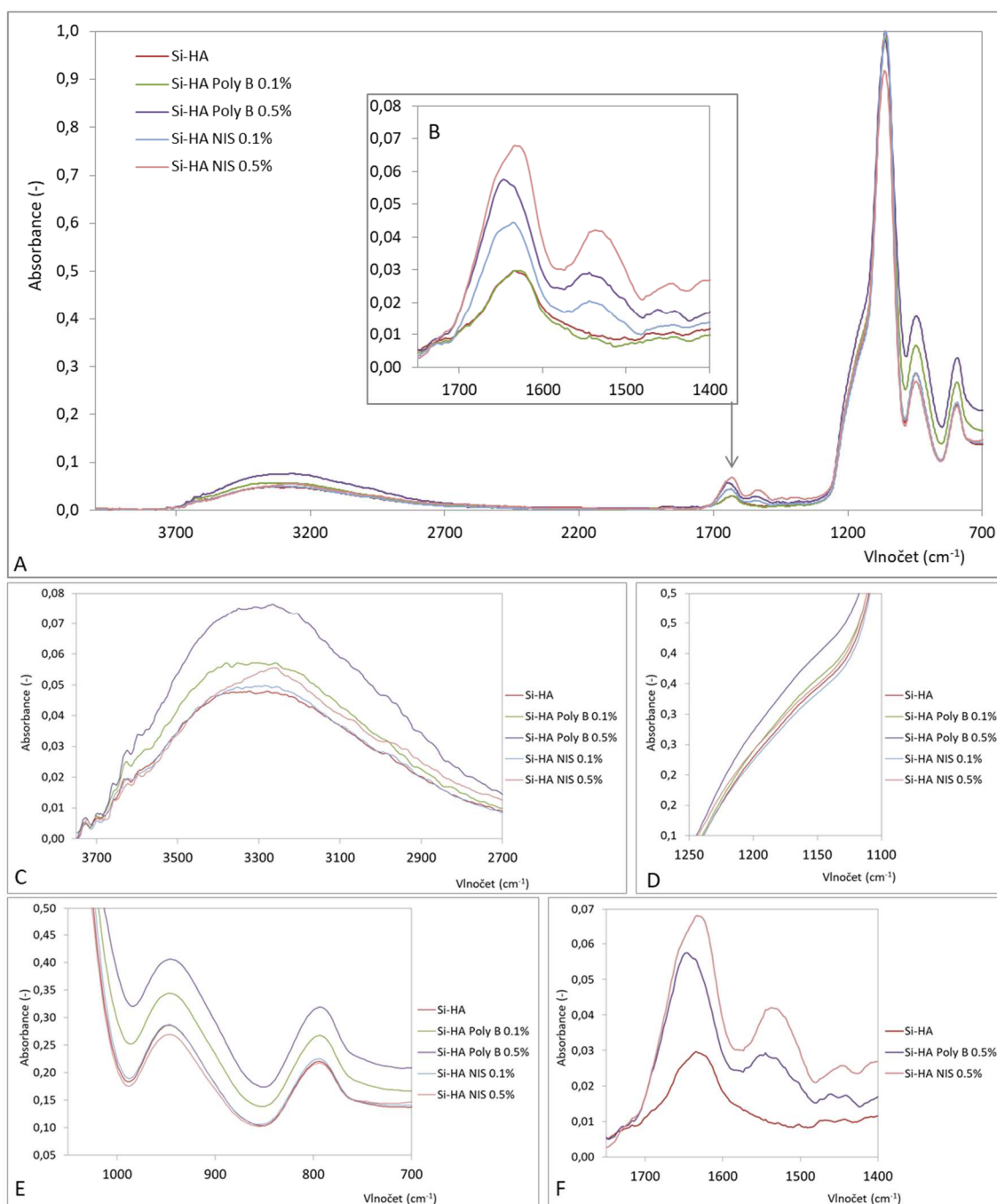
Obr. 59 Vliv immobilizace léčiva včetně kapilární frakce na morfologii a porozitu nanovláčenné vrstvy.

Nanovláčka s konjugovanou kyselínou hyaluronovou a olymyxinem B immobilizovaným z (A) 0.1% nebo (B) 0.5% roztoku a s nisinem immobilizovaným z (C) 0.1% nebo (D) 0.5% roztoku.

7.3.2 Výsledky chemické analýzy

FTIR analýza nanovláken s immobilizovaným léčivem úspěšně prokázala jejich přítomnost na povrchu a zároveň vliv jak povrchové funkcionizace nanovláken, tak i koncentrace léčiva v immobilizačním roztoku. Srovnání spekter získaných u nanovláken s konjugovanou HA a immobilizovanými léčivy polymyxinem B a nisinem, jsou uvedena na obrázku 60. Změny spekter byly pozorovány na vlnočtu $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$, typickém pro O-H a N-H (vodíkové můstky) vibrace. Vzhledem k peptidické struktuře obou léčiv

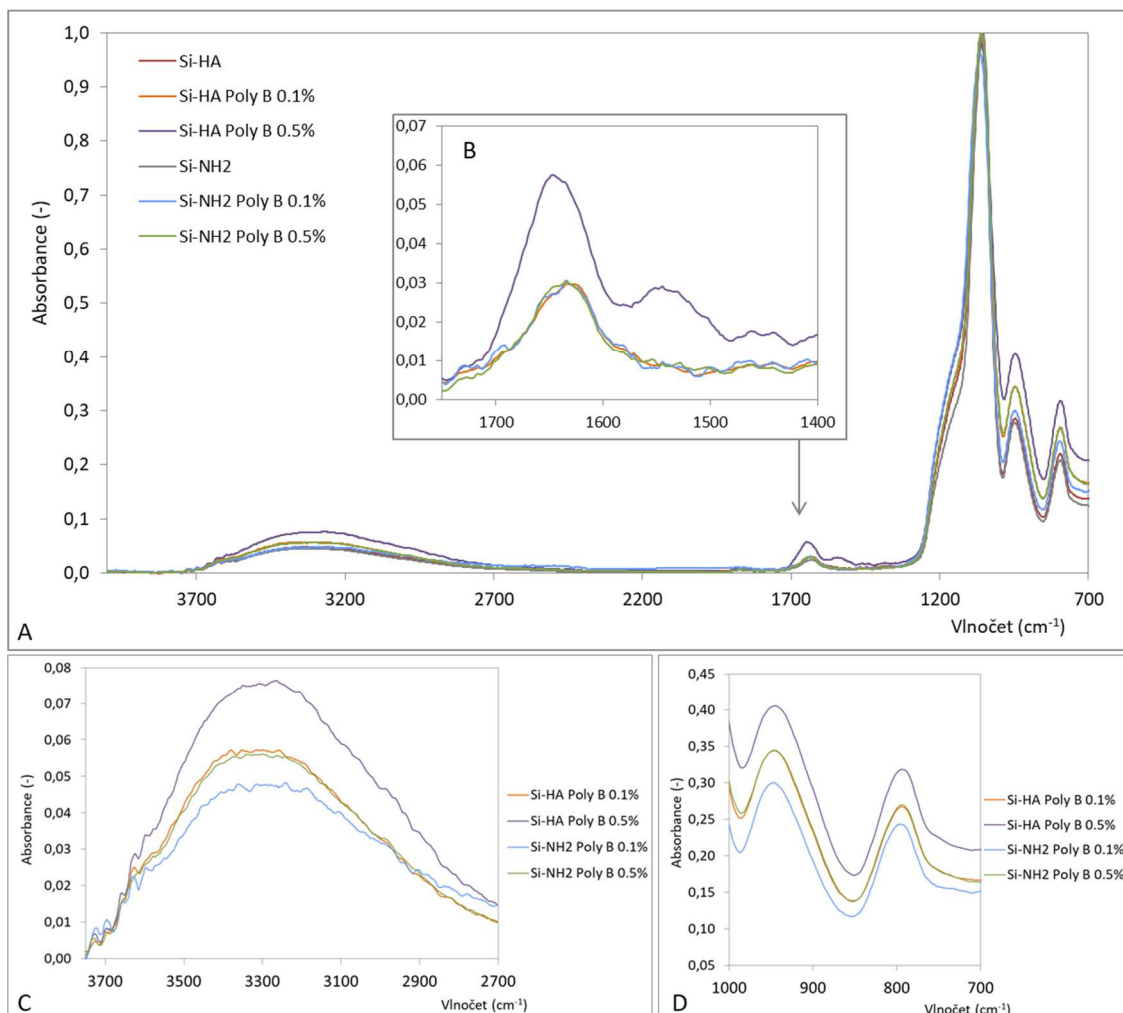
byly pozorovány vrcholy typické právě pro vibrace vazeb spojených zejména s peptidovou vazbou. Pro ty je typická především oblast na vlnočtu 1700 – 1500 cm^{-1} . Pozorovány byly změny zejména u vrcholů na vlnočtech 1650 cm^{-1} a 1550 cm^{-1} . Ty jsou označovány jako vibrace pásu amidu I a amidu II, které spojují vibrace C=O a N-H. Kromě toho byl pozorován nárůst absorpance v oblasti okolo 1455 cm^{-1} . Jedná se o oblast asymetrických (C=O) a symetrických (C-O) vibrací spojených s karboxylovými skupinami. V této oblasti byly dobře patrné změny u nanovláken s nisinem imobilizovaným z obou testovaných koncentrací a polymyxinem B imobilizovaným z roztoku o koncentraci 0.5 %.



Obr. 60 FTIR spektra křemičitých nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou a imobilizovaný léčivý polymyxin B a nisin.
 (A) Celé spektrum ($4000 - 700 \text{ cm}^{-1}$) a detailní pohledy na vybrané oblasti na vlnočtech (B) $1750 - 1400 \text{ cm}^{-1}$, (C) $3750 - 2700 \text{ cm}^{-1}$, (D) $1250 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ (E) $1050 - 700 \text{ cm}^{-1}$ a (F) $1750 - 1400 \text{ cm}^{-1}$.

Po imobilizaci polymyxinu B z 0.1% roztoku nebyly v celé oblasti spektra $1700 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ pozorovány žádné významné odchylky od spektra nosných nanovláken. Ty byly výrazné až v tzv. oblasti „otisku palce“, pod 1300 cm^{-1} . Ty souvisejí především se skeletárními vibracemi. Zde byly pozorovány významné změny absorbance zejména u

vrcholů na vlnočtech 950 cm^{-1} a 800 cm^{-1} . Ty jsou sice typické také pro křemičitá nanovlákná, jejich změnu lze ale v případě polymixinu B připsat vibracím C-H vazeb souvisejících postranním alifatickým řetězcem mastné kyseliny.



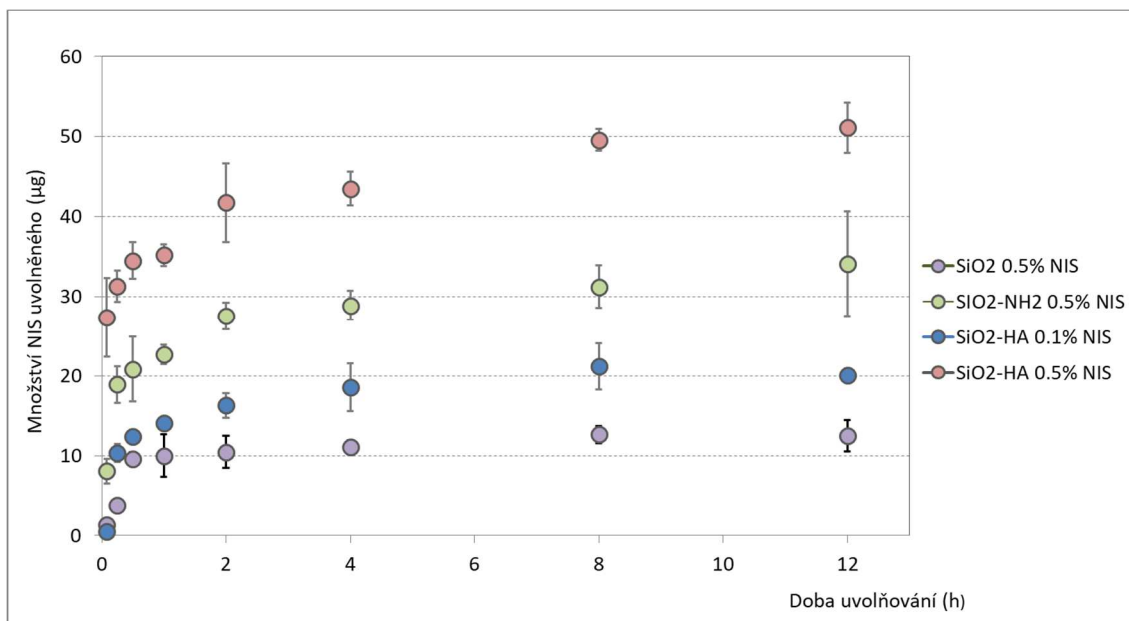
Obr. 61 Srovnání FTIR spekter silanizovaných a HA konjugovaných křemičitých nanovláken s imobilizovaným polymyxinem B.
 (A) Celé spektrum ($4000 - 700\text{ cm}^{-1}$) a detailní pohledy na vybrané oblasti na vlnočtech (B) $1750 - 1400\text{ cm}^{-1}$, (C) $3750 - 2700\text{ cm}^{-1}$ a (D) $1050 - 700\text{ cm}^{-1}$.

FTIR analýza prokázala také rozdíl v množství polymixinu B vázaného na povrch pouze silanizovaných nanovláken a nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou. Ten ukazují spektra na obrázku 61. Jak je patrné, tak spektra silanizovaných nanovláken po imobilizaci z 0.5% roztoku (Si-NH_2 Poly B 0.5%) a nanovláken s kyselinou hyaluronovou a polymyxinem imobilizovaným z 0.1% (Si-HA

Poly B 0.1%) se neliší v žádné ze sledovaných oblastí. Na základě toho lze předpokládat, že přítomnost kyseliny hyaluronové na povrchu nanovláken vede k vyššímu účinku imobilizace a u těchto vláken je možné dosáhnout s použitím nižší koncentrace léčiva v imobilizačním roztoku stejného množství jako v případě imobilizace z roztoku o vyšší koncentraci u nanovláken pouze s hydrofilním povrchem ovšem bez negativního náboje.

7.3.3 Kinetika uvolňování léčiva

Kinetika uvolňování léčiva byla hodnocena u vzorků nanovláken obsahujících léčivo vázané adsorpcí včetně podílu vázaného kapilárními silami. Množství uvolněného léčiva bylo normalizováno na hmotnost nanovláken. Jak je patrné z grafu na obrázku 62, povrchová funkcionalizace silně ovlivňovala nejen množství nisinu uvolněného z nanovláken, ale také kinetiku jeho uvolňování. Nejmenší množství bylo uvolněno z neupravených nanovláken. Ta díky svému hydrofobnímu povrchu pravděpodobně vázala léčivo pouze omezenými kapilárními silami v nerovnoměrnostech nanovláčkové vrstvy. Zároveň došlo k uvolnění nisinu po 30 minutách a po této době se koncentrace nisinu v STT již nezvyšovala. U funkcionalizovaných nanovláken byla doba uvolňování nisinu prodloužena na 8 až 12 hodin. Nejvyšší množství nisinu bylo uvolněno z nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou, u kterých bylo po 12 hodinách uvolněno $51 \pm 3.1 \mu\text{g NIS}$ na 1 mg nanovláken. V případě silanizovaných nanovláken bylo po této době uvolněno $34.1 \pm 6.6 \mu\text{g NIS/ mg}$. U nanovláken s konjugovanou HA a s nisinem imobilizovaným z 0.1% roztoku bylo po 12 hodinách $20.1 \pm 0.8 \mu\text{g NIS/ mg}$, tedy 39.4 % z množství uvolněného ze stejného typu nanovláken s léčivem imobilizovaným roztokem pětkrát koncentrovanějším. Tyto výsledky naznačují, že konjugace kyseliny hyaluronové na povrch může být výhodná pro vazbu léčiv z nízko koncentrovaných roztoků.

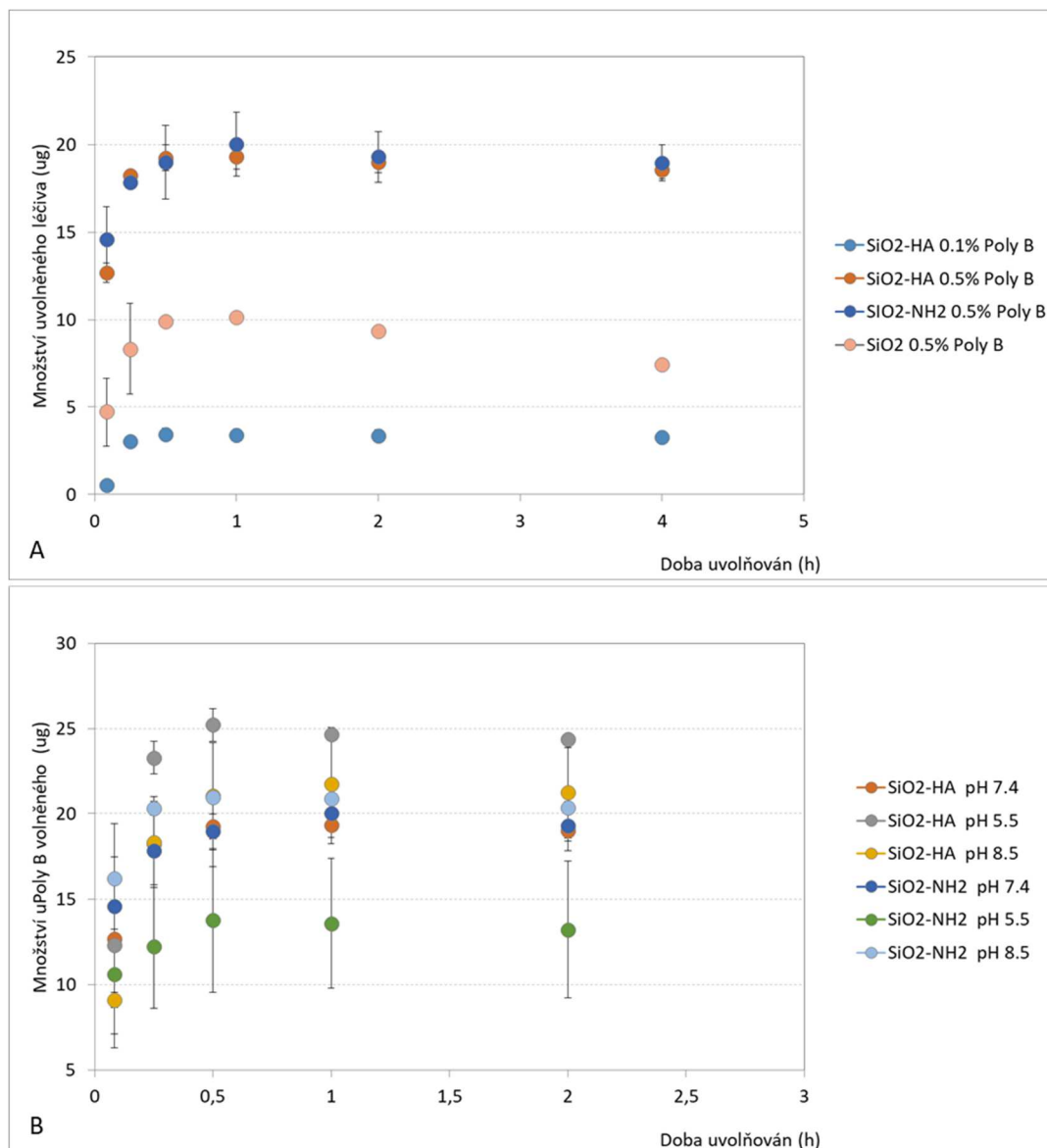


Obr. 62 Křivky kinetiky uvolňování nisinu.

Vliv povrchové funkcionalizace nanovláken a koncentrace imobilizačního roztoku. Imobilizace u všech vzorků vč. kapilárně vázaného léčiva. STT pH 7.4. Normalizováno na 1 mg nanovláken..

V případě uvolňování polymyxinu B byl studován nejen vliv povrchové úpravy nanovláken, ale také vliv pH prostředí na kinetiku jeho uvolňování. Jak je patrné z grafu na obrázku 63, povrchová funkcionalizace neměla významný vliv na profil křivky uvolňování, kdy k uvolnění léčiva došlo průběhu prvních 30 až 60 minut. Silně ale ovlivňovala množství polymyxinu uvolněné z nanovláken. Nejmenší množství ($3.4 \pm 0.3 \mu\text{g Poly B/ mg}$) bylo uvolněno z nanovláken s konjugovanou HA a imobilizovaných 0.1% roztokem. Toto množství bylo dokonce nižší než u neupravených křemičitých nanovláken ošetřených 0.5% roztokem polymyxinu ($9.9 \pm 0.08 \mu\text{g Poly B/ mg}$). Zároveň množství polymyxinu uvolněné po jedné hodině z nanovláken s konjugovanou HA a ošetřených 0.5% roztokem ($19.3 \pm 0.07 \mu\text{g Poly B/ mg}$) bylo téměř shodné s množstvím antibiotika uvolněného ze silanizovaných ošetřených stejnou koncentrací imobilizačního roztoku. Toto pozorování dále osvětluje graf na obrázku 63 B, který dokazuje, že množství uvolněného léčiva se v tomto případě nerovná množství vázanému a jeho uvolňování z povrchu je ovlivňováno pH prostředí. Snížení pH simulované tělní tekutiny vedlo k narušení elektrostatických interakcí kyselinou hyaluronovou a polymyxinem, což vedlo k uvolnění vyššího podílu léčiva ($25.2 \pm 0.95 \mu\text{g Poly B/ mg}$) již po 30 minutách. Tyto interakce jsou stabilní především v oblasti fyziologického pH, kdy jsou obě molekuly maximálně (de)protonované. [317, 325] I při

pH 5.5 lze předpokládat alespoň částečné zachování elektrostatických interakcí mezi molekulami HA a polymyxinu.



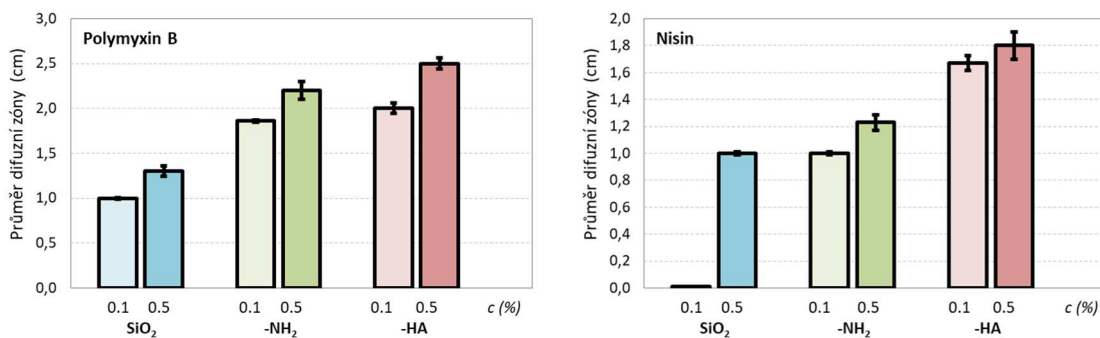
Obr. 63 Křivky kinetiky uvolňování polymyxinu B.

(A) Vliv povrchové funkcionalizace nanovláken (B) pH STT. Imobilizace u všech vzorků vč. kapilárně vázaného léčiva. Normalizováno na 1 mg nanovláken..

Oproti tomu změna pH na 8.5 neměla na množství uvolněného léčiva v porovnání s hodnotami dosaženými při pH 7.4 menší vliv a vedla k uvolnění ($21.7 \pm 2.6 \mu\text{g Poly B/ mg}$). V případě silanizovaných nanovláken vedlo pH 5.5 k výrazně nižší dávce uvolněného léčiva po 30 minutách ($13.8 \pm 4.3 \mu\text{g Poly B/ mg}$). Tyto výsledky podporují předpoklad možnosti řízení uvolňování léčiva pH okolního prostředí.

7.3.4 Antibakteriální účinnost imobilizovaného léčiva

Antibakteriální účinnost nanovláken s imobilizovaným léčivem byla testována difuzní metodou z pevného disku. Vyhodnocován byl rozměr difuzní zóny dosažený po 24 hodinách. Sledován byl vliv jak povrchové funkcionalizace, tak koncentrace léčiva v imobilizačním roztoku a způsob vazby léčiva. Vliv koncentrace léčiva v imobilizačním roztoku je shrnut v kombinaci s povrchovou funkčností nanovláken na obrázku 64. Je evidentní, že povrchová funkcionalizace má významný vliv na množství vázaného antibiotika u obou testovaných koncentrací. Na základě výsledků lze konstatovat, že funkcionalizace silanizací i konjugací HA vede ke zlepšení sorpční kapacity nanovláken. Ta je spojena nejen s nábojem povrchu, ale také se zvýšenou smáčivostí, která umožňuje zvýšenou vazbu adsorpcí léčiva a zvyšuje i podíl léčiva vázaného kapilárními silami. Antibakteriální účinnost podílu antibiotika vázaného na povrch nanovláken pouze elektrostatickými interakcemi (C), jejich kombinací s volnou adsorpcí bez kapilárních sil (B) a s nimi (A) v závislosti na povrchové úpravě nanovláken je vyhodnocena na obrázku 65. Jak je patrné, tak rozdělení podílu těchto vazeb a dosažení inhibiční koncentrace je závislé nejen na povrchové úpravě nanovláken, ale i na vlastnostech léčiva a jeho aktivitě vůči dané bakterii.

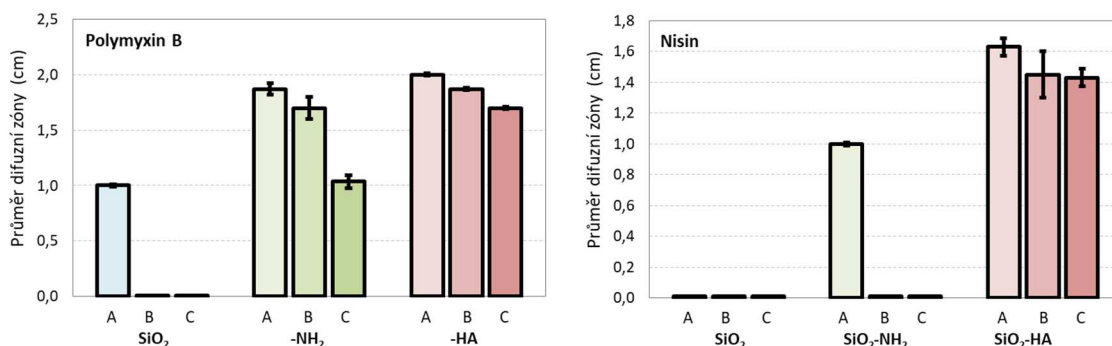


Obr. 64 Vliv povrchové funkčnosti a koncentraci imobilizačního roztoku na antibakteriální účinnost nanovláken.

Vazba vč. kapilární frakce. Expozice 24 hodin. Testováno na bakteriích *E. coli* a *S. gallinarum*.

Z dosažených výsledků je patrné, že už hydrofilizace povrchu a přítomnost aminoskupin dosažená silanizací vede ke zlepšení účinnosti vazby léčiva na povrch nanovláken. V případě polymyxinu B dochází i k formování silnějších vazeb s povrchem nanovláken, kdy i po odstranění adsorbovaného léčiva intenzivním

oplachem vykazovala nanovlákná inhibici růstu bakterií *E. coli* v přímém kontaktu (pod materiálem). V případě nisinu k těmto interakcím nedocházelo, nebo jimi nebylo vázáno dostatečné množství léčiva schopné inhibovat růst bakterií *S. gallinarum*. V případě nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou jsou vzhledem k povrchovému náboji nanovláken předpokládány elektrostatické interakce s imobilizovaným léčivem.

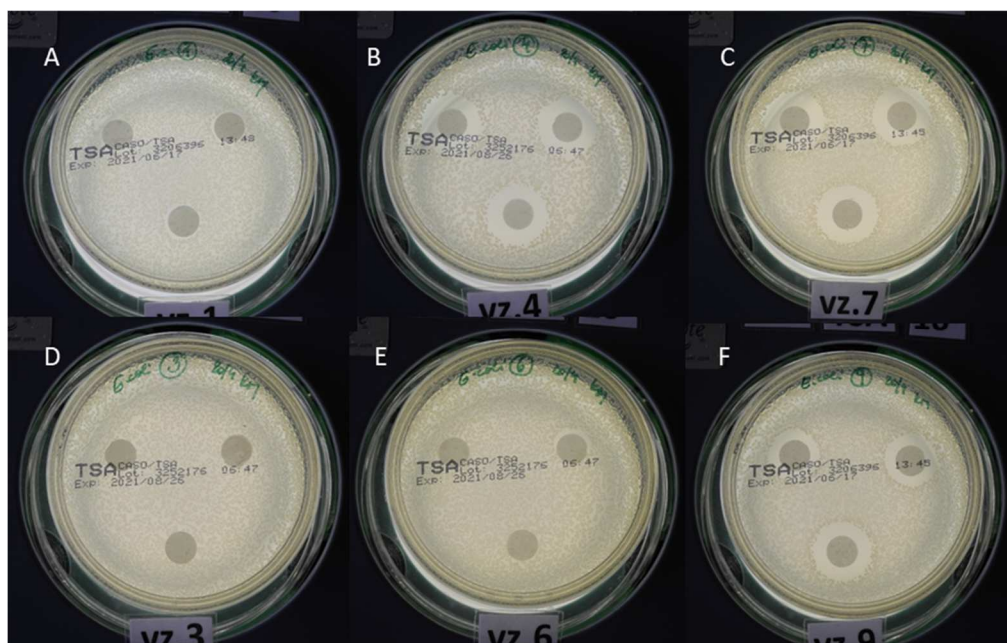


*Obr. 65 Vliv mechanismu vazby léčiva na antibakteriální účinnost nanovláken. Léčivo (A) adsorbované na povrch vč. kapilární frakce, (B) adsorbované na povrch bez kapilární frakce a (C) léčivo vázané na povrch elektrostatickými interakcemi. Vazba léčiva z 0.1% imobilizačního roztoku. Expozice 24 hodin. Testováno na bakteriích *E. coli* a *S. gallinarum*.*

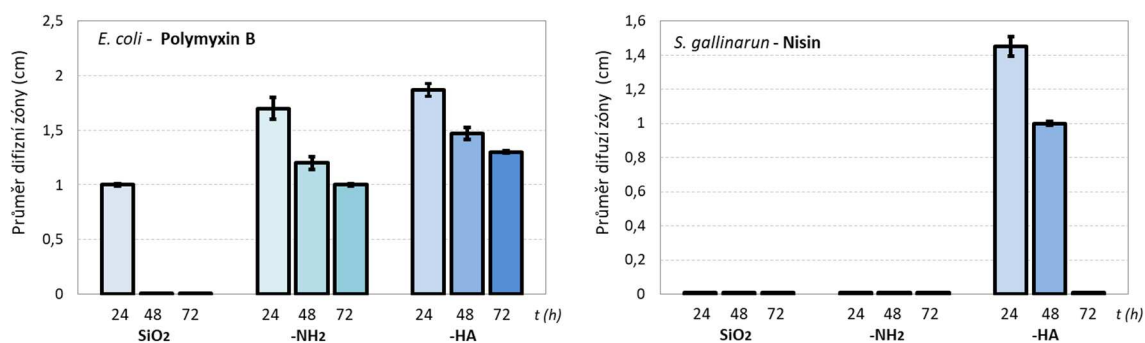
Jejich existence byla potvrzena již rozdílným profilem uvolňování léčiva v závislosti na pH prostředí a potvrzují ji také výsledky antibakteriální účinnosti (viz obr. 65). dosažené u obou testovaných léčiv. U obou léčiv byla dosažena difuzní zóny přesahující plochu vzorku i po intenzivním oplachu a odstranění léčiva vázaného prostou adsorpcí. V případě nisinu byl dokonce rozměr difuzní zóny shodný s rozměrem dosaženým u adsorbovaného léčiva. Fotografická dokumentace dosažených výsledků je uvedena na obrázku 66. Tyto výsledky byly dosaženy u léčiva imobilizovaného z 0.1% roztoku, což naznačuje zvýšenou vazbu i ze zředěných roztoků.

Hodnocena byla také antibakteriální účinnost v čase, kdy byly vzorky opakovaně vystavovány nové bakteriální populaci. Dosažené výsledky jsou shrnuty v grafech na obrázku 67. V případě polymyxinu byl zaznamenán prodloužený antibakteriální účinek po dobu 72 hodin silanizovaných nanovláken i nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou. Silanizovaná nanovlákná byla po 72 hodinách schopna inhibovat bakteriální růst pouze v přímém kontaktu – tj. pouze pod vzorkem (d = 1 cm). Naproti tomu nanovlákná s konjugovanou HA vykazovala difuzní zónu o rozměru 1.3 cm.

V případě vazby nisinu byla nanovláknina s konjugovanou kyselinou hyaluronovou jediná schopná inhibovat bakteriální růst i po 48 hodinách. Ačkoli výsledky dosažené liberací v simulované tělní tekutině prokázaly uvolnění léčiva v průběhu první hodiny až prvních 12 hodin, difuze léčiva na agaru lépe simuluje prostředí infikované rány, kde dochází k minimálnímu proudění tělních tekutin a rána nekrvácí.



Obr. 66 Antibakteriální účinnost nanovláken s imobilizovaným Polymyxinem B. Rozměr difuzních zón. Léčivo vázané (A, B, C) adsorpcí vč. kapilárních frakce a vázané (D, E, F) elektrostatickými interakcemi na (A, D) neupravená SiO_2 , (B, E) $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ a (C, F) $\text{SiO}_2\text{-HA}$ nanovláknina. Testováno na bakterii *E. coli*.



Obr. 67 Vývoj antibakteriální aktivity nanovláken v čase. Hodnoceno léčivo vázané na povrch bez kapilární frakce. Imobilizace z 0.1% roztoku.

7.3.5 Shrnutí výsledků

U funkcionalizovaných nanovláken byly prostudovány interakce se dvěma modelovými léčivy. Sledován byl vliv povrchové funkcionalizace nanovláken a podmínek imobilizace na množství navázaného léčiva a způsob jeho vazby. Kinetika uvolňování byla studována dvěma způsoby – liberací do simulované tělní tekutiny (STT) a uvolňováním léčiva difuzí na agaru. Liberační test potvrdil vliv pH média na jeho uvolňování a tím přeneseně i existenci elektrostatických interakcí mezi záporně nabitými molekulami kyseliny hyaluronové a kladně nabitým léčivem, kdy tato vazba zůstává při fyziologickém pH (7.4) stabilní. Hodnocení antibakteriální účinnosti prokázalo jednak vyšší antibakteriální účinnost u nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou ve srovnání s neupravenými a silanizovanými nanovláčky u obou léčiv. Zároveň byl u obou modelových léčiv prokázán prodloužený antibakteriální účinek spojený se zvýšenou vazbou a stabilitou léčiva na nanovláčkách s konjugovanou HA. Ta byla schopna uvolňovat aktivní polymyxin B po dobu 72 hodin a nisin po dobu 48 hodin.

Závěr

Kontaminované a chronické rány představují častou zdravotní komplikaci spojenou s řadou chronických onemocnění, jako je například diabetes mellitus, a jejich neúspěšná léčba může vést až k amputaci končetiny. Vzhledem ke zvyšující se incidenci diabetu v populaci a nepříznivé predikci dalšího vývoje je v současnosti kladem důraz na hledání nových možností terapie chronických a kontaminovaných ran. Nanovláčka představují zajímavý nanomateriál s řadou unikátních vlastností výhodných pro jejich využití jako krytů ran. Významná je zejména jejich struktura poskytující vysoký specifický povrch dostupný pro vazbu biologicky aktivních látek a dále vysoká porozita při malém rozměru pórů. Ta umožňuje využití nanovláken jako bariéry chránící prostředí rány před vnějšími vlivy, která současně umožňuje výměnu plynů mezi ránou a vnějším prostředím. Materiálové složení nanovláken potom ovlivňuje jejich biodegradabilitu a bioaktivitu. Křemičitá nanovláčka představují v tomto směru biokompatibilní a biodegradabilní materiál vyznačující se unikátním způsobem degradace, který nevede k uzavírání mezivláčkových pórů botnáním a umožňuje

zachování vysoké porozity i v průběhu degradace. Nevýhoda křemičitých nanovláken spočívá v jejich hydrofobním charakteru limitujícím možnosti jejich využití pro vazbu a uvolňování hydrofilních léčiv.

Z tohoto důvodu byla cílem této práce optimalizace přípravy křemičitých nanovláken a jejich povrchová modifikace kyselinou hyaluronovou za účelem zlepšení vazby zejména hydrofilních kationních léčiv.

V první části této práce byl popsán vliv viskozity křemičitého solu připraveného metodou sol-gel a procesních parametrů elektrostatického zvlákňování na morfologii připravovaných nanovláken. Zjištěné souvislosti vedly ke stanovení optimální viskozity solu (< 50 mPa.s) a procesních parametrů umožňujících přípravu homogenní nanovláčenné vrstvy se střední hodnotou průměru nanovláken ≤ 250 nm a vysokým specifickým povrchem dostupným pro další modifikace. Studován byl také vliv teplotní stabilizace na chemické složení povrchu a biokompatibilitu nanovláken. Byl popsán vliv podmínek teplotní stabilizace na množství silanolových skupin dostupných na povrchu. Jejich přítomnost je nezbytná pro další funkcionalizace, ovšem zároveň vede ke snižování biokompatibility. Na základě dosažených výsledků byla jako optimální potvrzena tepelná úprava při 180 °C po dobu 2 hodin.

Pro zajištění konjugace kyseliny hyaluronové na povrch nanovláken byla křemičitá nanovláčka nejprve povrchově funkcionalizována roubováním aminoskupin s použitím silanizace. Její průběh byl studován z hlediska vlivu koncentrace silanizačního činidla (APTES) a doby silanizace na výtěžnost reakce. Jako optimální byla identifikována úprava povrchu 3% roztokem APTES po dobu 2 hodin. Současně byl odhalen vliv doby a podmínek skladování křemičitých nanovláken na účinnost následné silanizace. Bylo prokázáno, že po uplynutí tří týdnů, během kterých dochází k postupné rehydroxylaci povrchu nanovláken, účinnost silanizace povrchu nanovláken opět klesá. Tento jev je způsoben fyzikální sorpcí vody ze vzdušné vlhkosti a je nutné mu přizpůsobit podmínky skladování nanovláken nebo jejich úpravu před silanizací. U následné konjugace kyseliny hyaluronové prostřednictvím karbodiimidové chemie (EDC/NHS) byl studován a potvrzen vliv pH, složení a koncentrace pufru, doby reakce a složení reakční směsi na množství kyseliny hyaluronové vázané na povrch nanovláken. Jejich vhodnou kombinací bylo dosaženo vazby 25.3 μ g HA na 1 mg křemičitých nanovláken. U těchto nanovláken byl následně potvrzen pozitivní vliv konjugované kyseliny hyaluronové na

biokompatibilitu nanovláken vůči kožním fibroblastům 3T3-A31. Zároveň byla potvrzena biodegradabilita modifikovaných nanovláken. Ta byla v průběhu prvních 72 hodin zpomalena v porovnání s neupravenými křemičitými nanovláknami. Rychlá degradace povrchu je výhodná zejména vzhledem k nízkému riziku nežádoucí adheze nanovláken ke spodině rány, zároveň zpomalení degradace křemičitých nanovláken může mít pozitivní vliv na biokompatibilitu systému díky nižšímu množství uvolněného křemíku. Jedná se sice o biogenní prvek, ovšem jeho vysoké koncentrace mohou mít cytotoxický efekt [273].

Poslední část disertační práce se věnovala ověření interakcí mezi funkcionalizovanými nanovláknami a zvolenými modelovými léčivy polymyxin B a nisin. Jedná se o hydrofilní antibakteriálně účinné látky nesoucí na svém povrchu při fyziologických podmínkách pozitivní náboj. Byla prokázána zvýšená vazba obou léčiv na povrch nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou v porovnání s neupravenými a silanizovanými nanovláknami. Zároveň byla potvrzena pH senzitivita systému. Vazba obou léčiv na povrch nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou vedla k dosažení prodloužené antibakteriální aktivity nanovláken. V případě polymyxinu B až na 72 hodin.

Konjugace kyseliny hyaluronové na povrch nanovláken tedy vedla k tvorbě materiálu se zlepšenou biokompatibilitou a povrchem umožňujícím zvýšenou vazbu a prodloužený účinek léčiva. Byl prokázán potenciál těchto nanovláken pro aplikace v hojení ran a dopravě především kationních léčiv.

Řešení této práce přineslo kromě uvedených výsledků také celou řadu otázek, jejichž zodpovězení bude nutné pro další využívání křemičitých nanovláken v medicínských aplikacích i hlubší pochopení jejich vlastností. Především se jedná o změny povrchových vlastností nanovláken v čase. Ty ovlivňují nejen účinnost silanizace povrchu, ale je nutné ověřit také vliv dlouhodobého skladování na biokompatibilitu a biodegradabilitu křemičitých nanovláken. Hlubší studium interakcí křemičitých nanovláken s biologickými systémy – zejména vliv jejich degradačních produktů je významné pro další aplikace nanovláken. Ačkoli je všeobecně znám způsob degradace křemičitých nanomateriálů prostřednictvím uvolňování kyseliny orthokřemičité, testy biodegradace a biokompatibility povrchově funkcionalizovaných nanovláken otevřeli

otázku její optimální koncentrace. Ta se může pro každý buněčný typ lišit. Zároveň povrchová eroze nanovláken v průběhu degradace může vést k uvolňování nanočástic. Z tohoto důvodu by bylo vhodné hlouběji prostudovat vliv dávky na buňky relevantní pro jednotlivé fáze hojení ran – tedy nejen fibroblasty, ale také keratinocyty, buňky cévního epitelu a buňky imunitního systému. Tímto způsobem by byl osvětlen vliv křemičitých nanovláken na re-epitelizaci, angiogenezi a imunitní odpověď organismu. Výsledky by mohly pomoci stanovit optimální podmínky aplikace křemičitých nanovláken pro stimulaci jednotlivých procesů spojených s hojením ran v závislosti na jejich fázi.

Současně vede potvrzení rychlé biodegradability obalu z konjugované kyseliny hyaluronové k otázce, jak degradace nanovláken ovlivňuje molekulovou hmotnost kyseliny hyaluronové uvolňované z jejího povrchu a jak tyto změny ovlivní její bioaktivitu při delší expozici. Vzhledem k souvislosti mezi molekulovou hmotností HA a jejími biologickými efekty, se další studie budou zabývat vlivem doby a podmínek degradace na molekulovou hmotnost kyseliny hyaluronové a efektem těchto degradačních produktů na kožní buňky.

Další otázka, kterou bude v budoucnu nutné zodpovědět, se týká robustnosti systému z hlediska interakcí s léčivými. V budoucnu bude nutné hlubší studium interakcí provedené na širší skupině léčiv s odlišnou strukturou a vlastnostmi. Vzhledem k dobré účinnosti vazby u 0.1% imobilizačních roztoků by bylo vhodné ověřit také účinnost vazby u roztoků s nižší koncentrací a dále účinnost vazby u růstových faktorů, jejichž lokální aplikace by měla pozitivní účinek na hojení ran.

8 Použité zdroje

1. Stehlíková, K. Moderní přístupy k hojení chronických ran. *Remedia*, 2017, 5, PND.
2. Blanco-Fernandez, B. et al. Nanotechnology approaches in chronic wounds. *Advances in Wound Care*.
3. Tocco, I. et al. Nanotechnology-based therapies for skin wound healing. *Journal of nanomaterials*, 2012, ID: 714134.
4. Parani, M. et al. Engineered nanomaterials for infection control and healing acute and chronic wounds. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2016, 8, pp. 10049-10069.
5. Barroso, A. et al. Nanomaterials in wound healing: From material science o wound healing applications. *Nano Select*, 2020, 1, pp. 443-460.
6. Naskar, A. and Kim, K. Recent advances in nanomaterials-based wound-healing therapeutics. *Pharmaceutics*, 2020, 12, n. 499.
7. Mihai, M. M. et al. Nanomaterials in wound healing and infection control. *Materials*, 2019, 12, n. 2176.
8. Quignard, S. et al. Silica nanoparticles as sources of wound healing in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 155, pp. 530-537.
9. Luštičková, I., Vyskočilová, E. and Černý, L. Funkcionalizace mezoporézních silikátových materiálů. *Chemické Listy*, 2013, 107, pp. 114-120.
10. Gubala, V. et al. Dye-doped silica nanoparticles: synthesis, surface chemistry and bioapplications. *Cancer Nanotechnology*, 2020, 11, pp. 1-43.
11. Máková, V. et al. Hybrid organosilane fibrous materials and their contribution to modern science. *Polymer*, 2021, 228, n. 123862.
12. Máková, V. et al. (1S,2S)-Cyclohexane-1,2-diamine-based organosilane fibres as a powerful tool against pathogenic bacteria, *Polymers*, 2020, 12, n. 206.
13. Cyphert, J. M. et al. Size matters: Molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology. *International Journal of Cell Biology*, 2015, ID 563818.
14. Lee, B. M. et al. The effects of the molecular weights of hyaluronic acid on the immune responses. *Biomaterials Research*, 2021, 25, n.27.
15. Aya, K. L. and Stern, R. Hyaluronan in wound healing: Rediscovering a major player. *Wound Repair and Regeneration*, 2014, 22, pp.579–593.
16. Frenkel, J. S. The role of hyaluronan in wound healing. *International Wound Journal*, 2014, 11, pp. 159 – 163.
17. Chen, W. Y. J. and Abatangelo, G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*, 1999, 7 (2), pp. 79-89.
18. Gunasekaran, T. et al. Nanotechnology: an effective tool for enhancing bioavailability and bioactivity of phytomedicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2014, 4 (Supplement 1), pp. S1-S7.
19. Patra, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 2018, 16, n. 71.

20. Fahr, A. and Liu, X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2007, 4(4), pp. 403-16.
21. Wen, H., Jung, H. and Li, X. Drug delivery approaches in addressing clinical pharmacology-related issues: Opportunities and Challenges. *AAPS Journal*, 2015, 17 (6), pp. 1327–1340.
22. Dubashynskaya, N. V. and Skorik, Y. A. Polymyxin delivery systems: Recent advances and challenges. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020, 13 (5), pp. 83.
23. Barrientos, S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2008, 16, pp. 586-601.
24. Eming S. A., Martin, P. and Tomic-Canic, M. Wound repair and regeneration: Mechanism, signalling and translation. *Science Translational Medicine*, 2014, 6 (265), pp. 265sr6.
25. Rieger, K. A., Birch, N. P. and Schiffman, J. D. Designing electrospun nanofiber mats to promote wound healing – a review. *Journal of Materials Chemistry*, 2013, 1, pp. 4531-4541.
26. Diegelmann, R. F. and Evans, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 2004, 9, pp. 283-289.
27. Lerman, O. Z. et al. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblasts: Impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *American Journal of Pathology*, 2003, 162 (1), pp. 303-312.
28. Sanchez, M. C., et al. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wounds healing: A systematic review. *Antioxidants*, 2018, 7, n. 98.
29. Rajendran, N. K. et al. A review on nanoparticle based treatment for wound healing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2018, 44, pp. 421-430.
30. Thomas, S. C. et al. Ceramic nanoparticles: Fabrication methods and applications in drug delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 2015, 21, pp. 6165-6188.
31. Pan, Z. et al. Activating proper inflammation for wound-healing acceleration via mesoporous silica nanoparticle tissue adhesive. *Nano Research*, 2020, 13(2), pp. 373–379.
32. Schneider, L. A. et al. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound therapy? *Archives of Dermatological Research*, 2007, 298, pp. 413-420.
33. Wang, M. et al. Nanomaterials applied in wound healing: Mechanisms, limitations and perspectives. *Journal of Controlled Release*, 2021, 337, pp. 236-247.
34. Iacob, A.-T. et al., An overview of biopolymeric electrospun nanofibers based on polysaccharides for wound healing management. *Pharmaceutics*, 2020, 12(10), n. 983.
35. Miguel, S. P. Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, 169, pp. 60-71.
36. Zhang, S. et al. Electrospun fibrous mat based on silver (I) metal-organic frameworks-poly(lactic acid) for bacterial killing and antibiotic-free wound dressing. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 390, n. 124523.

37. Cui, S. et al. Polylactide nanofibres delivering doxycycline for chronic wound treatment. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 2019, 104, n. 106745.
38. Li, J. et al. Electrospun sandwich-structure composite membrane for wound dressing scaffolds with high antioxidant and antibacterial activity. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2017, 303, n. 1700270.
39. Marrel, J. G. et al. Curcumin-loaded poly-ε-caprolactone nanofibres: diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2009, 36, pp. 1149-1156.
40. Simoes, D., Miguel, S. P. and Correia, I. J. Biofunctionalization of electrospun poly(ε-caprolactone) fibers with Maillard reaction products for wound dressing applications. *Reactive and Functional Polymers*, 2018, 131, pp. 191-202.
41. Mutlu, G. et al. Curcumin-loaded electrospun PHBV nanofibers as potential wound-dressing material. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2018, 43, pp. 185-193.
42. Azimi, B. et al. Bio-based electrospun fibers for wound healing. *Journal of Functional Biomaterials*, 2020, 11, n. 67.
43. Chen, Q. et al. Electrospun chitosan/PVA/bioglass nanofibrous membrane with spatially designed for accelerating chronic wounds healing. *Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications*, 2019, 105, n. 110083.
44. Charernsriwilaiwat, N. et al. Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing. *International Wound Journal*, 2014, 11(2), pp. 215 - 222.
45. Chouhan, D. et al. Functionalized PVA-silk blended nanofibrous mats promote diabetic wound healing via regulation of extracellular matrix and tissue remodelling. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2018, 12, pp. 1559-1570.
46. Séon-Lutz, M. et al. Electrospinning in water and in situ crosslinking of hyaluronic acid/cyclodextrine nanofibres: Towards wound dressing with controlled drug release. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 207, pp. 296-298.
47. Sylvester, M. A., Amini, F. and Keat, T. C. Electrospun nanofibres in wound healing. *Materials Today: Proceedings*, 2020, 29, pp. 1-6.
48. Chen, S. et al. Recent advances in electrospun nanofibres for wound healing. *Nanomedicine (Lond.)*, 2017, 12(11), pp. 1335-1352.
49. Aragón, J. et al. Electrospun asymmetric membranes for wound dressing applications. *Materials Science & Engineering C*, 2019, 103, n. 109822.
50. Wang, Y. et al. Electrospun polyurethane/keratin/AgNP biocomposite mats for biocompatible and antibacterial wound dressings. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 4, pp. 635-648.
51. Abdelgawad, A. M., Hudson, S. M. and Rojas, O. J. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 100, pp. 166-78.

52. Augustine, R., Kalarikkal, N. and Thomas, S. Electrospun PCL membranes incorporated with biosynthesized silver nanoparticles as antibacterial wound dressings. *Applied Nanoscience*, 2016, 6, pp. 337–344.
53. Alavarse A. C. et al. Tetracycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibers mats based on PVA and chitosan for wound dressing. *Materials Science and Engineering C*, 2017, 77, pp. 271-281.
54. Boncu, T. E. and Ozdemir, N. Electrospinning of ampicillin trihydrate loaded electrospun PLA nanofibers I: effect of polymer concentration and PCL addition on its morphology, drug delivery and mechanical properties. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2021, Ahead-of-print, 1-13. <https://doi.org/10.1080/00914037.2021.1876057>
55. Perumal, G. et al. Synthesis and characterization of curcumin loaded PLA-hyperbranched polyglycerol electrospun blend for wound dressing applications. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 2017, 76, pp. 1196-1204.
56. Moradkhannejhada, L. et al. The effect of molecular weight and content of PEG on in vitro drug release of electrospun curcumin loaded PLA/PEG nanofibers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020, 56 (A), n. 101554.
57. Li, W. et al. Antibacterial activity of nanofibrous mats coated with lysozyme-layered silicate composites via electro spraying. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 99, pp. 218-225.
58. Yu, L. et al. An antimicrobial peptide-loaded chitosan/polyethylene oxide nanofibrous membrane fabricated by electrospinning technology. *Frontiers in Materials*, 2021, 8, n. 650223.
59. Xie, Z. et al. Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9 (12), n. 512448.
60. Sahoo, S. et al. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, DOI: 10.1002/jbm.a.326.
61. Asiri, A. et al. Epidermal and fibroblast growth factors incorporated polyvinyl alcohol electrospun nanofibers as biological dressing scaffold. *Scientific Reports*, 2021, 11, n. 5634.
62. Tucker, N. et al. The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 2012, SPECIAL ISSUE, s. 63-73.
63. RAMAKRISHNA, S. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Hackensack, NJ: World Scientific, 2005, xi, 382 s. ISBN 98-125-6454-3.
64. Niu, H., Zhou, H. and Wang, H. Electrospinning: an advanced nanofiber production technology. In: *Energy Harvesting Properties of Electrospun Nanofibers*, 2019, eds. Fang, J. and Lin, T., pp. 1-44. Bristol, IOP Publishing. ISBN: 978-0-7503-2005-4
65. Rim, N. G., Shin, C. S. and Shin, H. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomedical Materials*, 2013, 8 (1), n. 014102.

66. Sill, T. J. and von Recum, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 2008, 29, pp. 1989-2006.
67. Hench, L. and West, J. K. The sol-gel processes. *Chemical Reviews*, 1990, 90, pp. 33-72.
68. Brinker, C. J. and Scherer, G. W. Sol-gel science: The Physics and chemistry of Sol-gel processing. 1990. *Academic Press, Inc.*, San Diego, USA. ISBN-13: 978-0-12-134970-7.
69. Holubová, B. et al. Novel chapter in hybrid materials: one-pot synthesis of purely organosilane fibers. *Polymer*, 2020, 190, n. 122234.
70. Owens, G. J. et al. Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Material Science*, 2016, 77, pp. 1-77.
71. Studničková J. *Anorganická nanovláknna na bázi oxidu křemičitého*. Liberec, 2008. Disertační práce. Technická univerzita v Liberci. Školitel: Odvárky, J., Školitel specialist: Exnar, P.
72. Danks, A. E. et al. The evolution of sol-gel chemistry as a technique for materials synthesis. *Materials Horizons*, 2016, 3, pp. 91-112.
73. Ghimire, P. P. and Jaroniec, M. Renaissance of Stöber method for synthesis of colloidal particles.: New development and opportunities. *Journal of Colloidal and Interface Science*, 2021, 584, pp. 830-865.
74. Jiang, X. et al. Synthesis and formation mechanism of amorphous silica particles via sol-gel process with tetraethylorthosilicate. *Ceramics International*, 2019, 45 (6), pp. 7673 – 7680.
75. Zhu, X et al. Multiwave rheology and dynamic light scattering characterization for a two step sol-gel transformation of tetraethoxysilane hydrolysis and condensation. *Journal of Sol-gel Science and Technology*, 2018, 8, pp. 255-262.
76. Innocenzi, P. Understanding sol–gel transition through a picture. A short tutorial. *Journal of Sol-Gel Sciene and Technology*, 2020, 94, pp. 544–550.
77. Treccani, L. et al. Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9, pp. 7115-7150.
78. Duan, B. and Wang, M. Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor. *Journal of The Royal Society Interface* 2010, 7, pp. 615-629.
79. Lei, Q. et al. Sol–Gel-based advanced porous silica materials for biomedical applications. *Advanced Functional Materials: Functionalization Chemistry of Porous Materials*, 2020, 30 (41), n. 1909539.
80. Deshmunk, K. et al. Recent advances and future perspectives of sol–gel derived porous bioactive glasses: a review. *RSC Advances*, 2020, 10, pp. 33782-33835.
81. Choi, A. H. and Ben-Nissan, B. Sol-gel production of bioactive nanocoatings for medical applications. Part II: current research and development. *Nanomedicine (Lond)*, 2007, 2(1), pp. 51-61.

82. Lee, J. et al. Effect of silica size and content on superamphiphobic properties of silica-fluoropolymer core-shell coatings. *Polymers*, 2020, 12(12), n. 2864.
83. Owens, G. J. et al. Sol–gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*, 2016, 77, pp. 1-79.
84. Periyasamy, A. P. et al. Progress in Sol-Gel technology for the coatings of fabrics. *Materials* 2020, 13 (8), n.1838.
85. Zhang, H. et al. Highly reliable all-fiber temperature sensor based on the fluorescence intensity ratio (FIR) technique in Er³⁺/Yb³⁺ co-doped NaYF₄ phosphors. *Journal of Materials Chemistry C*, 2019, 7, pp. 15269-15275.
86. Moradi, F. et al. Investigation on various types of silica fibre as thermoluminescent sensors for ultra-high dose radiation dosimetry. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2018, 273, pp. 197-205.
87. Grotheer, V., Windolf, J. and Suschek, C. V. Evaluation of pro-angiogenic properties of an inorganic silica gel fibre fleece. *Journal of Wound Care*, 2021, 30 (9), n. 729.
88. Tao, S., Li, G. and Yin, J. Fluorescent nanofibrous membranes for trace detection of TNT vapor. *Journal of Materials Chemistry*, 2007, 17, pp.2730-2736.
89. Morsi, R. E. and Mohamed, R. S. Nanostructured mesoporous silica: influence of the preparation conditions on the physical-surface properties for efficient organic dye uptake. *Royal Societ Open Science*, 2018,5, pp. 172021.
90. Bharti, C. et al. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2015, 5 (3), pp. 124-133.
91. Sokolik, C G. and Lellouche, J.-P. Hybrid-silica nanoparticles as a delivery system of the natural biocide carvacrol. *RSC Advances*, 2018, 64, pp. 36712-36721.
92. Yanes, R. E. and Tamanoi, F. Development of mesoporous silica nanomaterials as a vehicle for anticancer drug delivery. *Therapeutical Delivery*, 2012, 1, 3(3), pp. 389-404.
93. Lebold, T. et al. Nanostructured silica materials as drug-delivery systems for doxorubicin: Single molecule and cellular studies. *Nano Letters*, 2009, 9 (8), pp. 2877-2883.
94. Choi, J, Kim, H. and Choi, Y. Theranostic nanoparticles for enzyme-activatable fluorescence imaging and photodynamic/chemo dual therapy of triple-negative breast cancer. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2015, 5 (5), pp. 656-664.
95. Kamegawa, R. Naito, M. and Miyat, K. Functionalization of silica nanoparticles for nucleic acid delivery. *Nano Research*, 2018, 11(10), pp. 5219-5239.
96. Chong, A. S. M and Zhao, X. S. Functionalized nanoporous silicas for the immobilization of penicillin acylase. *Applied Surface Science*, 2004, 237 (1-4), pp. 398-404.
97. Shylesh, S. et al. Sulfonic acid functionalized mesoporous silicas and organosilicas: Synthesis, characterization and catalytic applications. *Journal of Molecular Catalysis and Chemical*, 2007, 274 (1), pp. 153-158.

98. Issa, A. A. and Luyt, A. S. Kinetics of alkoxysilanes and organoalkoxysilanes polymerization: A review. *Polymers*, 2019, 11, n. 537.
99. Bracho, D. et al. Functionalization of Silica Nanoparticles for Polypropylene Nanocomposite Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2012, ID 263915.
100. Smith E. and Chen W. How to prevent the loss of surface functionality derived from aminosilanes. *Langmuir*, 2008, 24(21), pp. 12405–12459.
101. Tourné-Péteilh, C. et al. Synthesis and characterisation of ibuprofen-anchored MCM-41 silica and silica gel. *New Journal of Chemistry*, 2003, 27, pp.1415-1418.
102. Prabakaran, M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72, pp. 1313-1322.
103. Horcajada, P. et al. Influence of superficial organic modification of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Solid State Sciences*, 2006, 8(10), pp. 1243-1249.
104. Luechinger, M., Prins, R. and Pirngruber, G. D. Functionalization of silica surfaces with mixtures of 3-aminopropyl and methyl groups. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2005, 85 (1-2), pp. 111-118.
105. Rosenholm, J. M., Sahlgren, C. and Lind, M. Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles – opportunities & challenges. *Nanoscale*, 2010, 2(10), pp. 1870-83.
106. Iturrioz-Rodríguez, N., Correa-Duarte, M. A. and Fanarraga M.L. Controlled drug delivery systems for cancer based on mesoporous silica nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2019, 14, pp. 3389-3401.
107. Jal, P. K., Patel, S. and Mishra, B. K. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. *Talanta*, 2004, 62 (5), pp. 1005-1028.
108. Rastegari, E. et al. An update on mesoporous silica nanoparticle applications in nanomedicine. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (7), n. 1067.
109. Demir, E. and Castranova, V. Genotoxic effects of synthetic amorphous silica nanoparticles in the mouse lymphoma assay. *Toxicology Reports*, 2016, 3, pp. 807-815.
110. Vega-Villaa, K. R. Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60, pp. 929-938.
111. Gomes, M. C. et al. The role of surface functionalization of silica nanoparticles for bioimaging. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2016, 9 (4), n. 1630005.
112. Liberman, A. et al. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surface Science Reports*, 2014, 69 (2–3), pp. 132-158.
113. Marichal, L. et al. Protein corona composition of silica nanoparticles in complex media: Nanoparticle size does not matter. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10 (2), n. 240.
114. Grotheer, V. et al. The performance of an orthosilicic acid-releasing silica gel fiber fleece in wound healing. *Biomaterials*, 2013, 34 (30), pp. 7314-7327.

115. Li, M. et al. Surface modification of Stöber silica nanoparticles with controlled moiety densities determines their cytotoxicity profiles in macrophages. *Langmuir*, 2019, 35, pp. 14688-14695.-
116. Gonçalves, M. C. Sol-Gel silica nanoparticles in medicine: A natural choice. Design, synthesis and products. *Molecules*, 2018, 23 (8), n. 2021.
117. Pirzada T. et al. Hybrid Silica–PVA Nanofibers via Sol–Gel Electrospinning. *Langmuir*, 2012, 28, pp. 5834–5844
118. Xu, Y. et al. Spinnability and Crystallizability of Silica Glass Fiber by the Sol-Gel Method. *Journal of Materials Processing Technology*, 2000, 101, pp. 44–46.
119. Peltola, T. et al. Influence of Sol and Stage of Spinnability on in vitro Bioactivity and Dissolution of Sol-Gel-Derived SiO₂ Fibers. *Biomaterials*, 2001, 22, pp. 589–598.
120. Shao, C. et al. Fiber Mats of Poly(vinyl alcohol)/silica Composite via Electrospinning. *Materials Letters*, 2003, 57, pp. 1579–1584.
121. Wu, S. et al. Preparation of Novel Poly(vinyl alcohol)/SiO₂ Composite Nanofiber Membranes with Mesostructure and their Application for Removal of Cu²⁺ from Waste Water. *Chemical Communications*, 2010, 46, pp.1694–1696.
122. Choi, S. S. et al. Silica Nanofibers from Electrospinning/Sol-Gel Process. *Journal of Materials Science Letters*, 2003, 22, pp. 891–893.
123. Klia, S. and Haldorai, Y. (Eds.). Organic-inorganic hybrid nanomaterials. *Springer International Publishing Switzerland*, 2015. ISBN 978-3-319-13593-9
124. Zhou, X. et al. Electrospun nanofibers incorporating self-decomposable silica nanoparticles as carriers for controlled delivery of anticancer drug. *RSC Advances*, 2015, 5, pp. 65897-65904.
125. Qiu, K. et al. Doxorubicin-loaded electrospun poly(L-lactic acid)/ mesoporous silica nanoparticles composite nanofibers for potential postsurgical cancer treatment. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1, pp. 4601-4611.
126. Ke, M. et al. Allantoin-loaded porous silica nanoparticles/polycaprolactone nanofiber composites: fabrication, characterization, and drug release properties. *RSC Advances*, 2016, 6, pp. 4593-4600.
127. Mehra, M. et al. Electrospun aligned PLGA and PLGA/gelatin nanofibers embedded with silica nanoparticles for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 79, pp. 687-695.
128. Nekounam, H. et al. Silica nanoparticles-incorporated carbon nanofibers as bioactive biomaterial for bone tissue engineering. *Diamond and Related Materials*, 2021, 115, n. 108320.
129. Xu, C. et al. Polymer-mesoporous silica nanoparticle core-shell nanofibers as a dual drug delivery system for guided tissue regeneration. *ACS Applied Nano Materials*, 2020, 3(2), pp. 1457–1467.
130. Gounami, Z. et al. Polycaprolactone-gelatin nanofibers incorporated with dual antibiotic-loaded carboxyl-modified silica nanoparticles. *Journal of Materials Science*, 2020, 55, pp. 17134–17150.

131. Jatoi, A. W. et al. Antibacterial efficacy of poly(vinyl alcohol) composite nanofibers embedded with silver-anchored silica nanoparticles. *Journal of Biomededical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2018, 106 (3), pp. 1121–1128.
132. Egger, S. et al. Antimicrobial Properties of a Novel Silver-Silica Nanocomposite Material. *Applied and environmental Microbiology*, 2009, 75 (9), pp. s 2973-2976.
133. Pavoski, G. et al. Silver nanoparticles encapsulated in silica: Synthesis, characterization and application as antibacterial fillers in the ethylene polymerization. *European Polymer Journal*, 2019, 117, pp. 38-54.
134. Dosoky, W. M. et al. Dietary supplementation of silver-silica nanoparticles promotes histological, immunological, ultrastructural, and performance parameters of broiler chickens. *Scientific Reports*, 2021, 11, n. 4166.
135. Montalvo-Quirós, S. et al. Mesoporous silica nanoparticles containing silver as novel antimycobacterial agents against *Mycobacterium tuberculosis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 197, n. 111405.
136. Sun, J. et al. Self-enriched mesoporous silica nanoparticle composite membrane with remarkable photodynamic antimicrobial performances. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2020, 559, pp. 197-205.
137. Zienkiewicz-Strzałka, M. et al. Silver Nanoparticles on Chitosan/Silica Nanofibers: Characterization and Antibacterial Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(1), n. 166.
138. Toskas, G. et al. Chitosan(PEO)/silica hybrid nanofibers as a potential biomaterial for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94, pp. 713– 722.
139. Veverková, I. and Lovětínská- Šlamborová, I. Modified Silica Nanofibers with Antibacterial Activity. *Journal of Nanomaterials*, 2016, n. 2837197.
140. Yue, X. et al. Bromopropyl functionalized silica nanofibers for effective removal of trace level dieldrin from water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2012, 406, pp. 44-51.
141. Tong, H.-W. et al. Silica/PVA biocatalytic nanofibers. *Materials Letters*, 2013, 111, pp. 234-237.
142. Zucker, I. et al. Electrospun silica nanofiber mats functionalized with ceria nanoparticles for water decontamination. *RSC Advances*, 2019, 9, pp. 19408-19417.
143. Feng, Z. V. et al. Degradation of the electrospun silica nanofiber in a biological medium for primary hippocampal neuron – effect of surface modification. *International Journal of Nanomedicine*, 2016, 11, pp. 729-741.
144. Ravichandran et al. Hierarchical mesoporous silica nanofibers as multifunctional scaffolds for bone tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2013, 24(17), pp. 1988-2005.
145. Tepekiran, B. N. et al. Centrifugally spun silica (SiO₂) nanofibers for high-temperature air filtration. *Aerosol Science and Technology*, 2019, 53 (8), pp. 021-932.

146. Shahhosseininia, M., Bazgirb, S. and DaliriJouparic, M. Fabrication and investigation of silica nanofibers via electrospinning. *Materials Science and Engineering: C*, 2018, 91, pp. 502-511.
147. Chen, L. J. et al. Synthesis and Characterization of PVB/Silica Nanofibers by Electrospinning Process. *Polymer*, 2009, 50, pp. 3516–3521.
148. Hromádko, L., et al. SiO₂ fibers by centrifugal spinning with excellent textural properties and water adsorption performance. *ACS Omega*, 2017, 2 (8), pp. 5052–5059.
149. Wang, N. et al. Electrospun nanofibers for air filtration. In: *Electrospun nanofibers for energy and environmental applications*, 2014, eds. Ding, B. and Yu, J., pp. 299–323. Berlin, Heidelberg: Springer. ISBN: 978-3-642-54160-5
150. Mercante, L. A. et al. Electrospun Ceramic Nanofibers and Hybrid-Nanofiber Composites for Gas Sensing. *ACS Applied Nano Materials*, 2019, 2 (7), pp. 4026–4042.
151. Garibay-Alvarado, J. A., et al. Fibrous silica-hydroxyapatite composite by electrospinning. *International Journal of Research - Granthaalayah*, 2017, 5(2), pp. 39-47.
152. Garibay-Alvarado J. A., et al. Cell behavior on silica-hydroxyapatite coaxial composite. *PLoS ONE*, 2021, 16(5), n. e0246256.
153. Soto-Nieto, F., Farías, R. and Reyes-López, S. Y. Sol–Gel and Electrospinning Synthesis of Silica–Hydroxyapatite–Silver Nanofibers for SEIRAS and SERS. *Coatings*, 2020, 10 (10), n. 910.
154. Park, S. H. Robust Superhydrophobic Mats based on Electrospun Crystalline Nanofibers Combined with a Silane Precursor. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2010, 2 (3), pp. 658–662.
155. Faccini, M. et al. Electrospun Carbon Nanofiber Membranes for Filtration of Nanoparticles from Water. *Journal of Nanomaterials*, 2015, ID: 247471.
156. Sun, Y. et al. A Bamboo-Inspired Nanostructure Design for Flexible, Foldable, and Twistable Energy Storage Devices. *Nano Letters*, 2015, 15 (6), pp. 3899–3906.
157. Smith, S. A. et al. Effect of polymer and ceramic morphology on the material and electrochemical properties of electrospun PAN/polymer derived ceramic composite nanofiber membranes for lithium ion battery separators. *Journal of Membrane Science*, 2017, 526, pp. 315-322.
158. Al-Attabi, L. et al. Wrinkled silica doped electrospun nano-fiber membranes with engineered roughness for advanced aerosol air filtration. *Separation and Purification Technology*, 2019, 215, pp. 500-507.
159. Šlamborová, I. et al. *Nanovlákná struktura s imobilizovaným organickým agens a způsob její výroby*. IPC: D06M13/513. Česká republika. Patent, PV 2012-549. 2013-05-09. Dostupné také z: https://isdv.upv.cz/doc/FullFiles/Applications/2012/PPVCZ2012_0549A3.pdf
160. Sakka, S. and Yoko, T. Fibers from gels. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1992, 147–148, pp. 394-403.
161. Issa, A. A. and Luyt, A. S. Kinetics of alkoxy silanes and organoalkoxy silanes polymerization: a review, *Polymers*, 2019, 11, n. 537.

162. Probst, J., Glaubitt W. and Haisch, A. Amorphous silica gel fibers for tissue engineering of human cartilage cells. In: *Abstracts of the International Conference "Strategies in Tissue Engineering"*. *Cytotherapy*, 2004, 6 (3), p. 270.
163. Choi, S.-S. et al. Silica nanofibers from electrospinning/sol-gel proces. *Journal of Materials Science Letters*, 2003, 22, pp.891-893.
164. Loccufier, E. et al. Electrospinning of silica nanofibres without carrier polymer for advanced engineering applications. In: *Proceedings of AUTEX2019 Conference, 19th World Textile Conference on Textiles at the Crossroads*, 11-15 June 2019, Ghent, Belgium. ISBN-10 : 9079892068.
165. Lai, N.-C. et al. Functional helical silica nanofibers with coaxial mixed mesostructures for the fabrication of PtCo nanowires that display unique geometry-dependent magnetism. *NPG Asia Materials*, 2015, 7, p. e181.
166. Nagrath, M. et al. Bioactive glass fiber fabrication via a combination of sol-gel process with electro-spinning technique. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 101, pp. 521-538.
167. Kim, H.-W., Kim, H.-E. and Knowles, J. C. Production and Potential of Bioactive Glass Nanofibers as a Next-Generation Biomaterial. *Advanced Functional Materials*, 2006, 16 (12), pp. 1529-1535.
168. Sergi, R. et al. A New Generation of Electrospun Fibers Containing Bioactive Glass Particles for Wound Healing. *Materials*, 2020, 13, n. 5651.
169. Song, B. et al. Preparation of hollow bioactive glass nanofibers by a facile electrospinning method. *Biomedical Glasses*, 2015, 1, pp. 136-139.
170. Mercante, L. A. et al. Nanofibers interfaces for biosensing: Design and applications. *Sensors and Actuators Reports*, 2021, 3, n. 100048.
171. Oriero, D. A. et al. Electrospun biocatalytic hybrid silica-PVA-tyrosinase fiber mats for electrochemical detection of phenols. *Microchemical Journal*, 2015, 118, pp. 166-175.
172. Xu, X., Guo, G. and Fan, Y. Fabrication and Characterization of Dense Zirconia and Zirconia-Silica Ceramic Nanofibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2010, 10(9), pp. 5672–5679.
173. Trč, T. et al. *Kryt rány s nanovláknennou vrstvou pro dopravu léčiva*. IPC: A61K 9/70, A61K 9/127, A61F 13/00, A61L 15/26, A61L 15/44, A61P 17/02, A61P 31/02, B82Y 5/00. Česká republika. Užiténý vzor, CZ 34 086 U1. 2020-06-16.
174. Henry, N. et al. Silica nanofibers as a new drug delivery system: a study of the protein–silica interactions. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017,5, pp. 2908-2920.
175. Danilová, I. et al. Immobilization of esterase enzyme onto silica nanofibers for biomedical applications. *Vlákna a Textil*, 2014, 21(2), pp. 3–11.
176. Růžek, V. *Studium kinetiky funkcionalizace povrchu nanovláken po aktivaci plazmatem*. Liberec, 2018. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce: Tománková, H. Konzultant: Rysová, M.
177. Tománková, H. a Rysová, M. *Nanovláknenná struktura se zvýšenou povrchovou funkčností a s imobilizovanými organickými agens*. IPC: D04H 1/4209, D04H

1/4266,D04H 1/728, D01F 11/16, D06M 13/00. Česká republika. Užiténý vzor, CZ 34 116 U1. 2020-06-23.

178. Šeps, M. *Funkcionalizace křemičitých nanovláken přírodními látkami s biologickou aktivitou*. Liberec, 2015. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce: Martinová, L.

179. Rotková, J., Tománková, H. and Rysová, M. Inorganic silica nanofibers in a role of bioactive compound carrier. In: *NANOCON 2015 - 7th International Conference on Nanomaterials - Research and Application, Conference Proceeding*. Brno, Tanager, 2016, pp. 413–418. ISBN: 978-80-87294-63-5

180. Steinerová, M. et al. Human osteoblast-like SAOS-2 cells on submicron-scale fibers coated with nanocrystalline diamond films. *Materials Science and Engineering C*, 2021, 121, n. 111792.

181. Merlini, C. et al. Polypyrrole nanoparticles coated amorphous short silica fibers: Synthesis and characterization. *Polymer Testing*, 2012, 31 (8), pp. 971-977.

182. Swar, S. et al. Biocompatible surface modification of poly(ethylene terephthalate) focused on pathogenic bacteria: Promising prospects in biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 2017, 134(26), n. 44990.

183. Mero, A. and Campisi, M. Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules. *Polymers*, 2014, 6, pp. 346-369.

184. Kogan, G. et al. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, 29, pp. 17–25.

185. Bayer, I. S. Hyaluronic Acid and Controlled Release: A Review. *Molecules*, 2020, 25 (11), n. 2649.

186. Malafaya, P. B. et al. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59 (2007), pp. 207–233.

187. Shen, B. et al. Hyaluronan: its potential application in intervertebral disc regeneration. *Ortopedic Research and Reviews*, 2010, 2, pp. 17–26.

188. Crowman, M. K. et al. The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6, n. 261.

189. Vasile et al. Chitosan/ Hyaluronic acid polyelectrolyte complex hydrogels in the management of burn wounds. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici*, 2013, 117 (2), pp. 565 – 571.

190. Rivas, F. et al. Label-free analysis of physiological hyaluronan size distribution with a solid-state nanopore sensor. *Nature Communications*, 2018, 9, pp. 1037.

191. Chong, B.F. et al. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 66, pp. 341-351.

192. Necas, J. et al. Hyaluronic acid (Hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 2008, 53 (8), pp. 397-411.

193. Kaul, A. et al. Immunologic Roles of Hyaluronan in Dermal Wound Healing. *Biomolecules*, 2021, 11, 1234.

194. Hodgkinson, T. and Bayat, A. In Vitro and Ex vivo Analysis of Hyaluronan Supplementation of Integra® Dermal Template on Human Dermal Fibroblasts and Keratinocytes. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 2015, 14 (1), pp. 9-18.
195. Maharjan, A. S., Pilling, D. and Gomer, R. H. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Regulate Human Fibrocyte Differentiation. *PLoS ONE*, 2011, 6 (10), n. e26078.
196. Gruber, J. V., Holtz, R. and Riemer, J. Hyaluronic acid (HA) stimulates the in vitro expression of CD44 proteins but not HAS1 proteins in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) and is HA molecular weight dependent. *Journal of Cosmetics Dermatology*, 2021, <https://doi.org/10.1111/jocd.14188>.
197. Kawano, Y. et al. Wound Healing Promotion by Hyaluronic Acid: Effect of Molecular Weight on Gene Expression and In Vivo Wound Closure. *Pharmaceuticals*, 2021, 14 (4), n. 301.
198. Xu, M. et al. Reduction/pH dual-sensitive PEGylated hyaluronan nanoparticles for targeted doxorubicin delivery. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98, pp. 181-188.
199. Torres, F. and Castellano, G. Mucoadhesive polymer hyaluronan as biodegradable drug delivery vehicle. *ADMET & DMPK*, 2014, 2(4), pp. 235-247.
200. Gethin, G. The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds UK*, 2007, 3 (3), pp. 62-66.
201. Bayer, I. S. Hyaluronic Acid and Controlled Release: A Review. *Molecules*, 2020, 25 (11), n. 2649.
202. Schneider, L. A. et al. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? *Archives of Dermatological Research*, 2007, 298, pp. 413-420.
203. Percival, S. L. et al. The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. *Wound Repair and Regeneration*, 2014, 22 (2), pp. 174-186.
204. Collins, M. N. and Birkinshaw, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A Review. *Carbohydrate polymers*, 2013, 92 (2), pp. 1262-1279.
205. Xu et al. Hyaluronic acid-Based hydrogels: from natural polysaccharide complex to complex network. *Soft Matter*, 2012, 8 (12), pp. 3280-3294.
206. Burick, J. A. and Prestwitch, G. D. Hyaluronic acid hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials*, 2011, 23, pp: 41 – 56.
207. Xing, F. et al. Hyaluronic acid as a bioactive component for bone tissue regeneration: Fabrication, modification, properties, and biological functions. *Nanotechnology Reviews*, 2020, 9 (1), pp. 1059-1079.
208. Neuman, M. G. et al. Hyaluronic acid and wound healing. *Journal of Pharmaceuticals and Pharma Science*, 2015, 18 (1), pp. 53-60.
209. Rao, N. V. et al. Hyaluronic Acid Nanoparticles as Nanomedicine for Treatment of Inflammatory Diseases. *Pharmaceutics* 2020, 12(10), n. 931.
210. Zoratto, N. et al. Hyaluronan-Cholesterol Nanogels for the Enhancement of the Ocular Delivery of Therapeutics. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1781.

211. Huang, G. and Huang, H. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Delivery*, 2018, 25 (1), pp. 766–772.
212. Uppal, R. et al. Hyaluronic acid nanofiber wound dressing – production, characterization, and in vivo behavior. *Journal of Biomedical Research B: Applied Biomaterials*, 2011, 97B (1), p. 20.
213. Um, I. C. et al. Electro-Spinning and Electro-Blowing of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules*, 2004, 5(4), pp. 1428 –1436.
214. Kim, T. G., Chung, H. J. and Park, T. G. Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4, pp. 1611-1619.
215. Xu, S. et al. Chemical crosslinking and biophysical properties of electrospun hyaluronic acid based ultra-thin fibrous membranes. *Polymer*, 2009, 50, pp. 3762-3769.
216. Li, J. et al. Electrospinning of Hyaluronic Acid (HA) and HA/Gelatin Blends. *Macromolecular Rapid Communications*, 2006, (27), pp. 114-120.
217. Ahire, J. J. et al. Polyethylene oxide (PEO)-hyaluronic acid (HA) nanofibers with kanamycin inhibits the growth of *Listeria monocytogenes*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 86, pp. 143-148.
218. Ionescu, O. A. et al. New Hyaluronic Acid/Polyethylene Oxide-Based Electrospun Nanofibers: Design, Characterization and In Vitro Biological Evaluation. *Polymers*, 2021, 13, n. 1291.
219. Klíčová, M. *Příprava nanovláken na bázi kyseliny hyaluronové metodou elektrostatického zvlákňování*. Liberec, 2018. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce: Rysová, M.
220. Liu, Y. et al. Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 83 (2), pp. 1011-1015.
221. Schanté, C. E. et al. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 85, pp. 469-548.
222. Lu, P.-L. et al. Carbodiimide cross-linked hyaluronic acid hydrogels as cell sheet delivery vehicles: characterization and interaction with corneal endothelial cells. *Journal of Biomaterials Science: Polymers Edition*. 2008, 19 (1), 1-18.
223. Zerembinski, T. I. Thiolated hyaluronan-based hydrogels crosslinked using oxidized glutathione: An injectable matrix designed for ophthalmic applications. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10 (1), pp. 94-103.
224. Arpicco, S. et al. Hyaluronic Acid Conjugates as Vectors for the Active Targeting of Drugs, Genes and Nanocomposites in Cancer Treatment. *Molecules*, 2014, 19, pp. 3193-3230.
225. Pandolfi, L. et al. Liposomes Loaded with Everolimus and Coated with Hyaluronic Acid: A Promising Approach for Lung Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, n.7743.

226. Vangar, K., Liu, J. and Palakurthi, S. Hyaluronic Acid-decorated PLGA-PEG Nanoparticles for Targeted Delivery of SN-38 to Ovarian Cancer. *Anticancer Research*, 2013, 33(6), pp. 2425-2434.
227. Karakocak, B. B. et al. Hyaluronate Coating Enhances the Delivery and Biocompatibility of Gold Nanoparticles. *Carbohydr Polymers*, 2018, 186, pp. 243-251.
228. Li, L.-S. et al. Hyaluronic Acid-Modified and Doxorubicin-Loaded Gold Nanoparticles and Evaluation of Their Bioactivity. *Pharmaceuticals*, 2021, 14, n. 101.
229. Almeida, P. V. Amine-modified hyaluronic acid-functionalized porous silicon nanoparticles for targeting breast cancer tumors. *Nanoscale*, 2014, 6, pp. 10377-10387.
230. Park, S. et al. Hyaluronic Acid-Conjugated Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded with Dual Anticancer Agents for Chemophotodynamic Cancer Therapy, *Journal of Nanomaterials*, 2019, ID 3481397.
231. Yu, M. et al. Hyaluronic acid modified mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to CD44-overexpressing cancer cells. *Nanoscale*, 2013, 5, pp. 178-183.
232. Yalcinkaya, F. Preparation of various nanofiber layers using wire electrospinning system. *Arabian Journal of Chemistry*, 2019, 12 (8), pp. 5162-5172.
233. Nitta, S. V. et al. Effect of sol rheology on the uniformity of spin-on silica xerogel films. *Journal of Applied Physics*, 1999, 86 (10), p.5870-5878.
234. Topuz, F. and Uyarab, T. Electrospinning of gelatin with tunable fiber morphology from round to flat/ribbon. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 80, pp. 371-378.
235. Koombhongse, S. et al. Flat ribbons and other shapes by electrospinning. *Journal of Polymer Science Part B Polymer Physics*, 2001, 39 (21), pp. 2598 – 2606.
236. Jin, S. et al. Effect of Electric Field on the Directly Electrospun Nanofiber Yarns: Simulation and Experimental Study. *Fibers and Polymers*, 2018, 19 (1), pp. 116-124.
237. Ramirez, M. et al. Electrospinning Processing Techniques for the Manufacturing of Composite Dielectric Elastomer Fibers. *Materials*, 2021, 14, n. 6288.
238. Niu, H., Wang, X. and Lin, T. Needleless Electrospinning: Developments and Performances. In: *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications*, Tong Lin ed., 2011, IntechOpen, DOI: 10.5772/24999. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/23290>
239. Martinová, L. and Lubasová, D. Nanofiber sheets with the Superabsorbent Properties, *Advanced Materials Research*, 2011, 354, pp. 210 – 215.
240. Sándor, M. et al. Aminopropyl-Silica Hybrid Particles as Supports for Humic Acids Immobilization. *Material*, 2016, 9 (34). DOI: 10.3390/ma901003
241. Kunc, F. et al. Quantification of surface functional groups on silica nanoparticles: comparison of thermogravimetric analysis and quantitative NMR. *Analyst*, 2019, 144, pp. 5589-5599.

242. Mangos D. N. et al. A simple method for the quantification of molecular decorations on silica particles. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2014, 15(1), 015002.
243. Ponton, S. et al. Investigation of the densification mechanisms and corrosion resistance of amorphous silica films. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2019, 515, pp.34-41.
244. Taraskin, S. and Eliot, S. Nature of vibrational excitation of vitreous silica. *Physical Review B*, 1997, 56, pp. 8605-8622.
245. Brentano Capeletti, L. and Zimnoch, J. H. Fourier Transform Infrared and Raman Characterization of Silica-Based Materials. In: Stauffer, M. T. *Applications of Molecular Spectroscopy to Current Research in the Chemical and Biological Sciences*. IntechOpen, 2016. DOI: 10.5772/64477 Dostupné k 30. 8. 2021 z: <https://www.intechopen.com/chapters/52212>
246. Capeletti, L. B. et al. Infrared and Raman Spectroscopic Characterization of Some Organic Substituted Hybrid Silicas. *Spectrochimica Acta Part A – Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 133, pp. 619–625. DOI: 10.1016/j.saa.2014.05.072
247. Montero, I. et al. Disorder-induced vibration-mode coupling in SiO₂ films observed under normal-incidence infrared radiation, *Physical Review B*, 1994, 50, pp. 4881–4884.
248. Lange, P. Evidence for disorder-induced vibrational mode coupling in thin amorphous SiO₂ films. *Journal of Applied Physics*, 1989, 66 (201), pp. 201–204.
249. Kania, P. *Infračervená spektroskopie*. VŠCHT, Praha. Dostupné k 31. 8. 2021 z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?redirected>
250. Galeener, F. L. Planar rings in glasses. *Solid State Communications*, 1982, 44 (7), pp. 1037–1040.
251. Innocenzi, P. et al. Order disorder transitions and evolution of silica structure in self-assembled Mesostructured silica films studied through FTIR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107, pp. 4711–4717.
252. Gao, Y. et al. Organic–inorganic Hybrid from Ionomer Via Sol–gel Reaction. *Chemistry of Materials*, 2001, 13, pp.3644–3652. DOI: 10.1021/cm010179s
253. Pavan, C. et al. The puzzling issue of silica toxicity: are silanols bridging the gaps between surface states and pathogenicity? *Particle and Fibre Toxicology*, 2019, 16, n. 32.
254. Psarra, E. et al. In situ monitoring of linear RGD-peptide bioconjugation with nanoscale polymer brushes. *ACS Omega*, 2017, 2, pp. 946–958.
255. Mojarradi, H. *Coupling of substances containing a primary amine to hyaluronan via carbodiimide-mediated amidation*. Diplomová práce. Uppsala University Press, Uppsala, Švédsko, vedoucí: Karlsson, A. ISSN: 1650-8297, UPTEC K11 002.
256. Pourasad, J. et al. Preparation and characterization of SiO₂ thin film and SiC nanofibers to improve of graphite oxidation resistance. *Journal of the European Ceramic Society*, 2016, 36 (16), pp. 3947–3956.

257. Chen, Z. et al. Highly active SiO₂@C nanofiber: high rate and long cycling for lithium ion batteries. *Ionics*, 2021, 27, pp. 1385–1392.
258. Chang, M.-J. et al. Facile Preparation of Porous Inorganic SiO₂ Nanofibrous Membrane by Electrospinning Method. *Journal of Nanomaterials*, 2017, n. 9621515.
259. Queslati, N. et al. CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 112, pp. 102–108.
260. Marques, M. R. C. et al. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technolgis*, 2011, 18 (3), pp. 15 – 28.
261. Svěchota V. *Imobilizace kyseliny hyaluronové na nanovláknenné substráty*. Liberec, 2016. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce: Rysová, M.
262. Tománková, H., Rysová, M. and Pazourek, A. Plasma treatment in surface modification of silica dioxide nanofibers. In: *NANOCON 2018 - 10th International Conference on Nanomaterials - Research and Application, Conference Proceeding*. Brno, Tanger, 2019, pp. 448–453. ISBN: 978-808729489-5
263. Liu, Y., Li, Y. and He, T. Kinetics of (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2013, 29 (49), pp. 15275 – 17382.
264. Hettegger, H. et al. Aqueous modification of nano- and microfibrillar cellulose with a click synthon. *ChemSusChem*, 2016, 9 (1), pp. 75 – 79.
265. Beaumont, M. et al. A general aqueous silanization protocol to introduce vinyl, mercapto or azido functionalities onto cellulose fibers and nanocelluloses. *Molecules*, 2018, 23 (6), n. 1427.
267. Mahmoudi, H. et al. A review of Fischer Tropsch synthesis process, mechanism, surface chemistry and catalyst formulation. *Biofuels Engineering*, 2017, 2, p. 11–31.
268. Shioji, S. et al. Rehydroxylation of dehydrated silica surfaces by water vapor adsorption. *Advanced Powder Technology*, 2001, 12 (3), pp. 331 – 342.
269. Schrader, A. M. et al. Surface chemical heterogeneity modulates silica surface hydration. *he Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 2018, 115 (12), pp. 2890-2895.
270. Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, 2nd ed., 2008, pp. 1-1155. San Diego, Elsevier, USA. ISBN: 978-0-12-370501-3

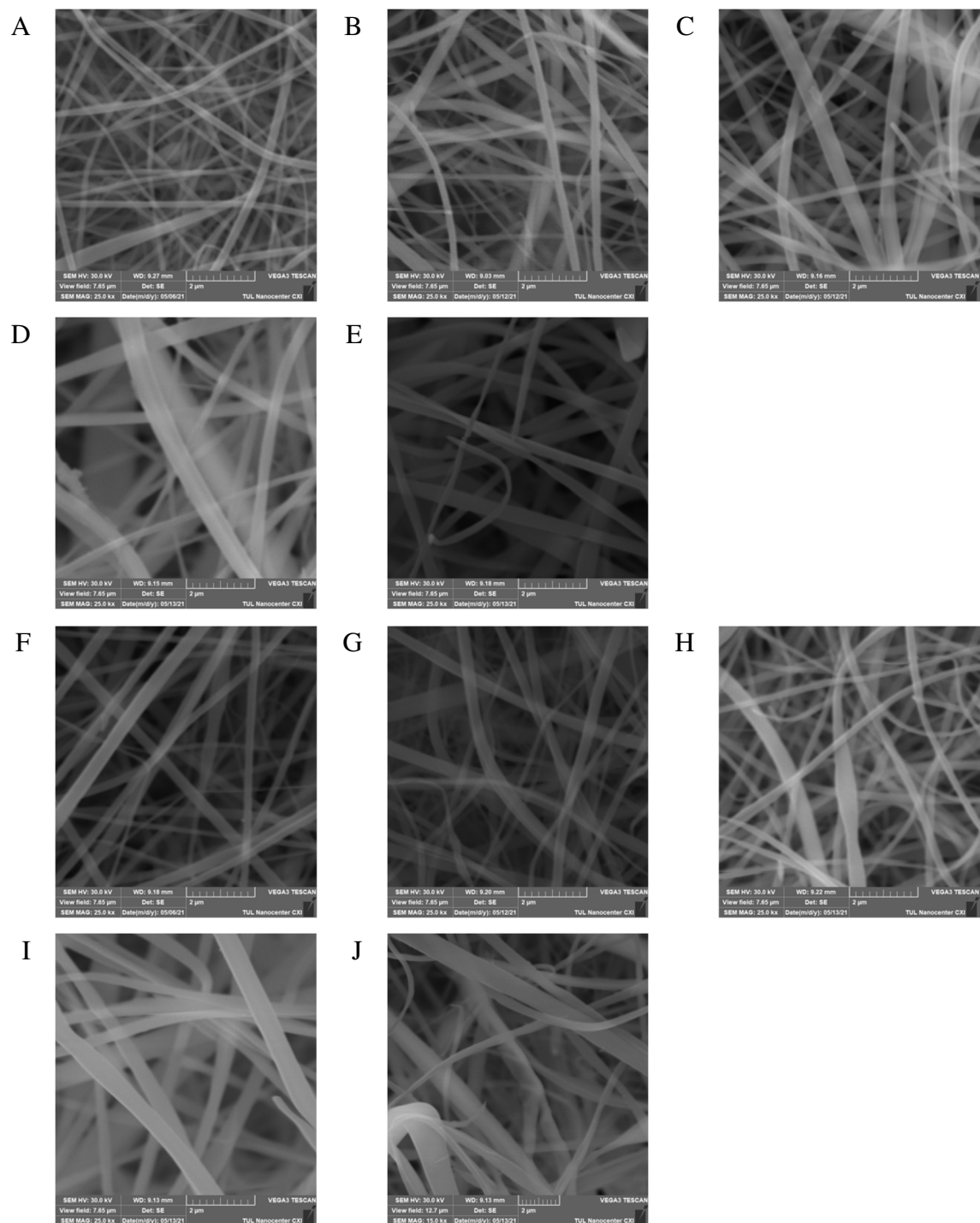
271. Yang, X. et al. Hyaluronic acid/EDC/NHS-crosslinked green electrospun silk fibroin nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *RSC Advances*, 2016, 6, pp. 99720 – 99728.
272. Pan, W. et al. combination of hydrotropic nicotinamide with nanoparticles for enhancing tacrolimus percutaneous delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2016, 11, pp. 4037 - 4405.
273. Moghaddam, S. P. H., Mohammadpour, R. and Ghandehari, H. In vitro and in vivo evaluation of degradation, toxicity, biodistribution, and clearance of silica nanoparticles as a function of size, porosity, density, and composition. *Journal of Controlled Release*, 2019, 311 – 312, pp. 1 - 15.
274. Hao, N. et al. In vitro degradation behaviour of silica nanoparticles under physiological conditions, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2012, 12, pp. 6345 – 6354.
275. Chen, G. et al. Unique biological degradation behaviour of Stober mesoporous silica nanoparticles from their interior to their exteriors. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2015, 11, pp. 1 – 8.
276. He, Q. et al. The three-stage in vitro degradation behaviour of mesoporous silica in simulated body fluid. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2010, 131, pp. 314 – 320.
277. Wickramathilaka, M. P. and Tao, B. Y. Characterization of covalent crosslinking strategies for synthesizing DNA-based bioconjugates. *Journal of Biological Engineering*, 2019, 13, n. 63.
278. Almond, A. and Hardingham, T. E. Hyaluronan : Current macromolecular and micromolecular views. *Glycoforum*, 2008, 12, A3.
279. Gatej, I., Popa, M. and Rinaudo, M. Role of the pH on hyaluronan behavior in aqueous solution. *Biomacromolecules*, 2005, 6 (1), pp. 61 – 67.
280. Chang, L. C. and Cox, B. G. Kinetics of amide formation through carbodiimide/ N-hydroxybenzotriazole (HOBt) couplings. *Journal of Organic Chemistry*, 2007, 72, pp. 8863 – 8869.

281. Christ, H.-A., Bourgat, Y. and Menzel, H. Optimization of critical parameters for carbodiimide mediated production of highly modified chitosan. *Polymers*, 2021, 13, n. 2702.
282. Kohn, R. and Kováč, P. Dissociation constants of D-galacturonic and D-glucuronic acid and their O-methyl derivatives, *Chemical Papers*, 1978, 32 (4), pp. 478 – 485.
283. Burke, S. and Barrett, C. pH-responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/hyaluronic acid surfaces. *Biomacromolecules*, 2003, 4(6), pp. 1773 - 1783.
284. Sheehan, J. and Almond, A. Hyaluronan: Static, Hydrodynamic and Molecular Dynamic Views. *Glycoforum*, 2001, 5, A8.
285. Maleki, A., Kjøniksen, A. L. and Nyström, B. Effect of pH on the behavior of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions. *Macromolecular Symposia*, 2008, 274(1), pp. 131 – 140.
286. Tømmeraas, K. and Melander, C. Kinetics of Hyaluronan Hydrolysis in Acidic Solution at Various pH Values. *Biomacromolecules*, 2008, 9 (6), pp. 1535–1540.
287. Klíčová, M. *Příprava nanovláken na bázi kyseliny hyaluronové metodou elektrostatického zvláknování*, Liberec, 2016. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce: Rysová, M.
288. Moffett, J. R., Nambodiri, M. A. and Neale, J. H. Enhanced carbodiimide fixation for immunohistochemistry: Application to the comparative distributions of N-acetylaspartylglutamate and N-acetylaspartate immunoreactivities in rat brain. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1993, 41 (4), pp. 559 – 570.
289. Maryšková, M. *Enzymatically activated filters for water treatment*, Liberec 2020. Disertační práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce: Rotková, J. Konzultant: Ševců, A.
290. Musilová, L. et al. The behaviour of hyaluronan solutions in the presence of Hofmeister ions: A light scattering, viscometry and surface tension study. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 212, pp. 395 – 402.
291. Kutálková, E. et al. Effect of solvent and ions on the structure and dynamics of a hyaluronan molecule. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 234, n. 115919.
292. Vogus, D. R. et al. A hyaluronic acid conjugate engineered to synergistically and sequentially deliver gemcitabine and doxorubicin to treat triple negative breast cancer. *Journal of Controlled Release* 2017, 267, pp. 191 – 202.
293. Arpicco, S. et al. Effects of the Molecular Weight of Hyaluronic Acid in a Carbon Nanotube Drug Delivery Conjugate. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8, n. 1164.
294. Lih, E. et al. Optimal conjugation of catechol group onto hyaluronic acid in coronary stent substrate coating for the prevention of restenosis. *Journal of Tissue Engineering*, 2016, 7, n. 2041731416683745.
295. Chen, H., Qin, J. and Hu, Y. Efficient degradation of high-molecular-weight hyaluronic acid by a combination of ultrasound, hydrogen peroxide, and copper ion. *Molecules*, 2019, 24 (3), n. 617.
296. Vasi, A.-M. et al. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Materials Science and Engineering: C*, 2014, 38, pp. 177 – 185.

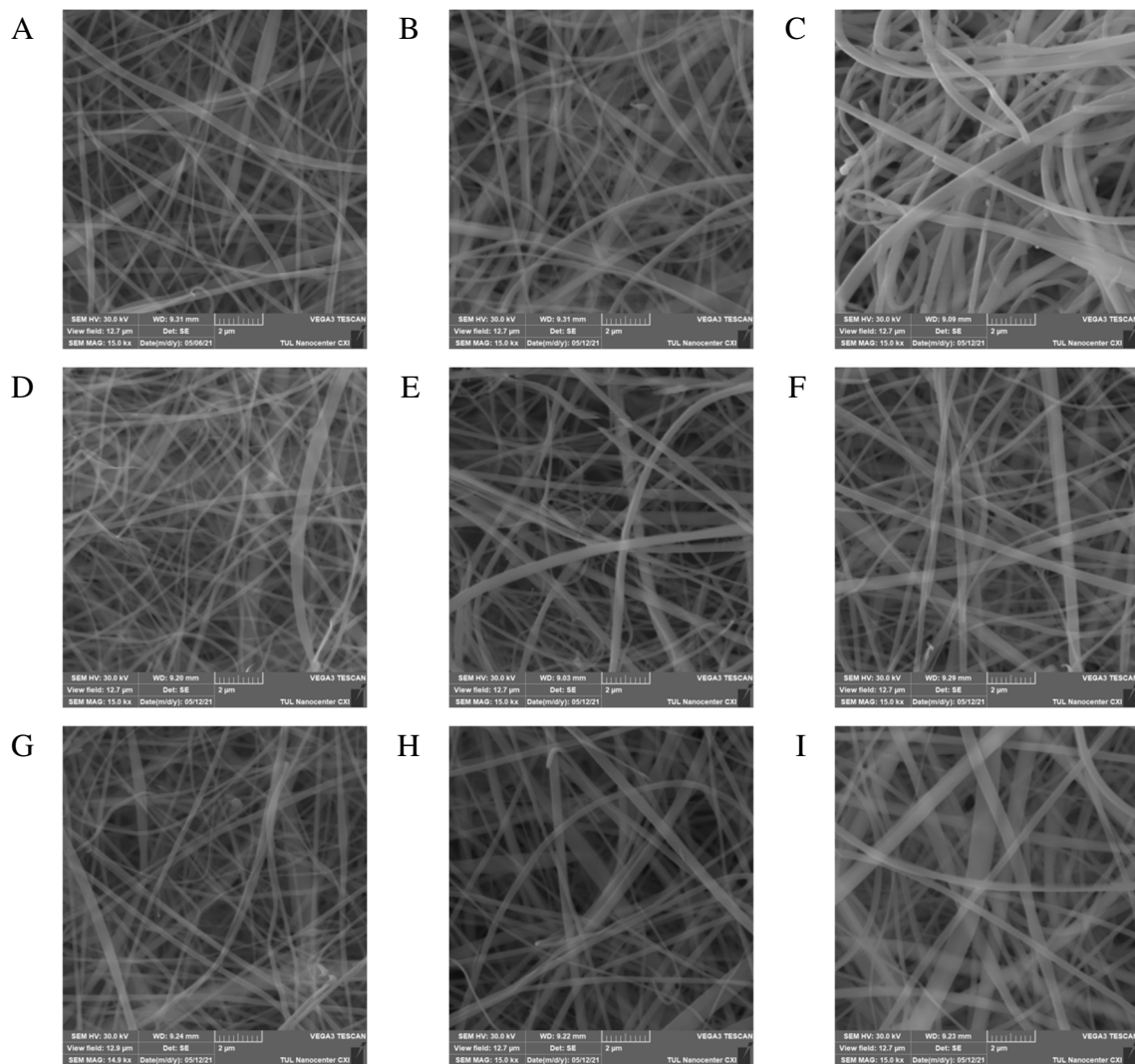
297. Powell, C. X-ray Photoelectron Spectroscopy Database XPS, Version 4.1, NIST Standard Reference Database 20. *National Institute of Standards and Technology*. 1989. doi:10.18434/T4T88K
298. Bywalez, R. et al. Stabilization of mid-sized silicon nanoparticles by functionalization with acrylic acid. *Nanoscale Research Letters*, 2012, 7 (1), n. 76.
299. Li, Y. et al. Functionalized Large-Pore Mesoporous Silica Microparticles for Gefitinib and Doxorubicin Codelivery. *Materials* (Basel). 2019, 12 (5), n. 766.
300. Cauda, V. et al. Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: Effect of surface functionalization with organo-silanes and poly(ethylene glycol). *Microporous and Mesoporous Materials*, 2010, 132 (1–2), pp. 60 – 71.
301. Asefa, T. and Tao, Z. Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 2012, 25 (11), pp. 2265 – 2284.
302. Shi, Y. et al. Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles? *A Journal of Critical Discussion of the Current Literature*, 2016, 36 (2), pp. 51 – 68.
303. Zavascki, A. P. et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 60 (6), pp. 1206 – 1215.
304. Poirel, L., Jayol, A. and Nordmann, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology reviews*, 2017, 30 (2), pp. 557 – 596.
305. Lim. T.-P. et al. In-Vitro Activity of Polymyxin B, Rifampicin, Tigecycline Alone and in Combination against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Singapore. *PLoS ONE*, 2011, 6 (4), n. e18485.
306. Vaara, M. Polymyxin Derivatives that Sensitize Gram-Negative Bacteria to Other Antibiotics. *Molecules*, 2019, 24 (2), 249.
307. Tran, T. B. et al. Novel Polymyxin Combination With Antineoplastic Mitotane Improved the Bacterial Killing Against Polymyxin-Resistant Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 12 (9), 721.
308. Ali, A., Botha, J. and Tiruvoipati, R. Fatal skin and soft tissue infection of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: A case report. *International Journal of Surgery Case Reports*, 2014; 5 (8), pp. 532–536.
309. Avedissian, S. N. et al. A Review of the Clinical Pharmacokinetics of Polymyxin B. *Antibiotics* (Basel), 2019, 8 (1), pp. 31.
310. Maragakis, L. L. et al. An Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Associated With Pulsatile Lavage Wound Treatment. *JAMA*, 2004, 292 (24), pp. 3006 – 3011.
311. Geurrero, D. M. et al. *Acinetobacter baumannii*-Associated Skin and Soft Tissue Infections: Recognizing a Broadening Spectrum of Disease. *Surgical Infections*, 2010, 11 (1) pp. 49–57.
312. Presta, L. et al. Constraint-based modeling identifies new putative targets to fight colistin-resistant *A. baumannii* infections. *Scientific Reports*, 2017, 7, n. 3706.

313. Hikari, Y. Successful treatment of skin and soft tissue infection due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by ampicillin-sulbactam and meropenem combination therapy. *International Journal of Infectious Diseases*, 2013, 17 (12), n. e1234-6.
314. Davis, S. C. et al. Effects of commonly used topical antimicrobial agents on *Acinetobacter baumannii*: an in vitro study. *Military Medicine*, 2008, 173 (1), pp. 74 - 78.
315. Landersdorfer, C. B. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of systemically administered polymyxin B against *Klebsiella pneumoniae* in mouse thigh and lung infection models. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, 73 (2), pp. 462 – 468.
316. Karnik, N. D. et al. 2019 Polymyxin B – A Renaissance in “Criticare” Infection Management. *The Indian Practitioner*, 2019, 72 (7), pp. 28 – 37.
317. Ristroph, K. D. and Prud'homme, R. K. Hydrophobic ion pairing: encapsulating small molecules, peptides, and proteins into nanocarriers. *Nanoscale Advances*, 2019, 1, pp. 4207 – 4237.
318. Insua, I. et al. Preparation and antimicrobial evaluation of polyion complex (PIC) nanoparticles loaded with polymyxin B. *European Polymer Journal*, 2017, 87, pp. 478 – 486.
319. Li, Q., Montalban-Lopez, M. and Kuipers, O. P. Increasing the antimicrobial activity of nisin-based lantibiotics against gram-negative pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84 (12), n. 00052-18.
320. Heunis, T. D. J. et al. Evaluation of a Nisin-Eluting Nanofiber Scaffold To Treat *Staphylococcus aureus*-Induced Skin Infections in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57 (8), pp. 3928 – 3935.
321. Mouritzen, M. V. et al. Immunomodulatory potential of Nisin A with application in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2019, 27 (6), pp. 650 – 660.
322. Mouritzen, M. V. Improved diabetic wound healing by LFCinB is associated with relevant changes in the skin immune response and microbiota. *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*, 2021, 20, pp. 726 – 739.
323. Fael, H. and Demirel, A. L. Nisin/polyanion layer-by-layer films exhibiting different mechanisms in antimicrobial efficacy. *RSC Advances*, 2020, 10, pp. 10329 – 10337.
324. Arnison, P. G. et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Products Reports*, 2013, 30, pp. 108 – 160.
325. Scott, J. E. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences. *Glycoforum*, 1998, 2, A1.

9 Přílohy: Morfologie zvlákněvaných nanovláken

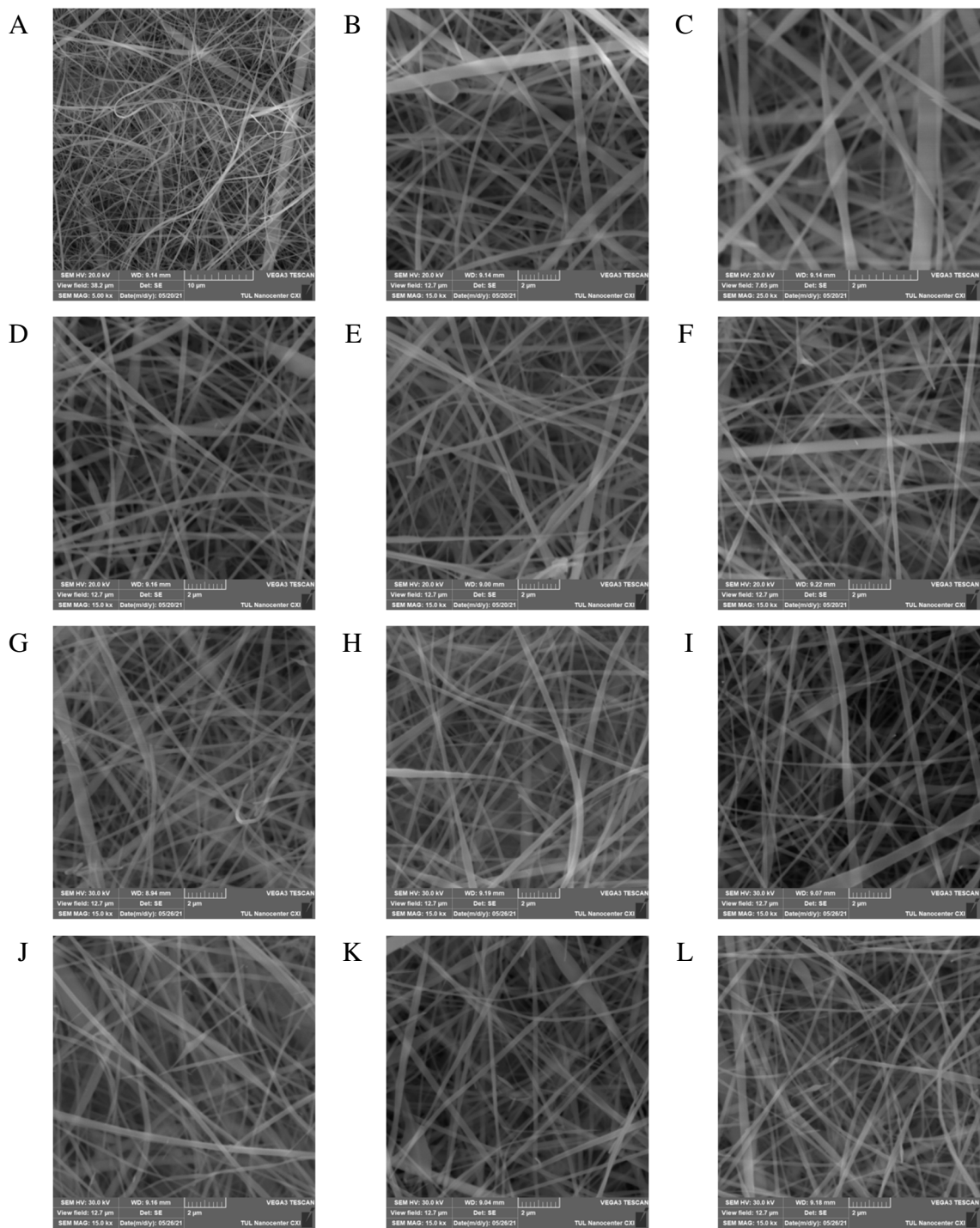


Obr. 1 Morfologie nanovláken připravených na zařízení Nanospider NS 1W500U vybaveném drátovou elektrodou. Sledován vliv viskozity solu na morfologii nanovláken. Nanovláknna byla připravena ze solů o viskozitě 46.9 mPa.s (A, F), 57.2 mPa.s (B, G), 75.1 mPa.s (C, H), 88.1 mPa.s (D, I) a 112 mPa.s (E, J). Procesní parametry byly nastaveny na 160 mm a 60 kV pro sadu 1 (A, B, C, D, E) a 175 mm a 70 kV pro sadu 2 (F, G, H, I, J). Zvětšení 25.000x.



Obr. 2 Morfologie nanovláken připravených na zařízení Nanospider NS 1W500U vybaveném drátovou elektrodou.

Sledován vliv procesních parametrů při zachování konstantní viskozity (57.2 mPa.s). Vzdálenost mezi elektrodami byla měněna mezi 150 mm (A, B, C), 160 mm (D, E, F) a 170 mm (G, H, I). Pro přípravu jednotlivých vzorků bylo napětí měněno mezi 50 kV (A, D, G), 60 kV (B, E, H) a 70 kV (C, F, I). Zvětšení 15.000x



Obr. 3 Vliv tepelné úpravy na morfologii nanovláken. Nanovlákná bez tepelné úpravy (A, B, C) a tepelně stabilizovaná po dobu 2 hodin při teplotách 150 °C (D), 180 °C (E), 200 °C (F), 250 °C (G), 300 °C (H), 350 °C (I), 450 °C (J), 550 °C (K) a 750 °C (L). Zvětšení 15.000x, příp. 5.000x (A) a 25.000x (C).