

Disertační práce

Autor: Ing. Miroslava Rysová (miroslava.rysova@tul.cz)

Školitel: doc. Ing. Lenka Martinová, CSc. (lenka.martinova@tul.cz)

Studijní program: P3901 Aplikované vědy v inženýrství

Obor: 3901V055 Aplikované vědy v inženýrství

Address:

Technical University of Liberec

Faculty of Mechatronics, Informatics and Interdisciplinary Studies

Studentská 1402/2

461 17 Liberec

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 léčivy 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, kationní léčiva, 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.

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

Obsah

ÚVOD	7
CÍLE PRÁCE	9
NEJVÝZNAMNĚJŠÍ VÝSLEDKY	11
1. PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE KŘEMIČITÝCH NANOVLÁKEN	11
2. KONJUGACE KYSELINY HYALURONOVÉ A CHARAKTERIZACE	14
2.1 Vliv podmínek na účinnosti silanizace	14
2.2 Vliv podmínek na konjugaci kyseliny hyaluronové	17
2.3 Vliv funkcionalizace na biodegradabilitu a biokompatibilitu	23
3. HODNOCENÍ INTERAKCÍ NANOVLÁKEN S MODELOVÝMI LÉČIVY	26
ZÁVĚR	28
SEZNAM PUBLIKACÍ	31
POUŽITÉ ZDROJE	32

Seznam obrázků

<i>Obr. 1 Schéma jednotlivých kroků přípravy a modifikace křemičitých nanovláken zahrnutých v disertační práci.</i>	9
<i>Obr. 2 Schéma vlivů jednotlivých parametrů při výběru substrátu pro další konjugaci.</i>	11
<i>Obr. 3 Schéma procesu hodnocení vlivu viskozity a procesních parametrů elektrostatického zvlákňování na morfologii nanovláčkové vrstvy.</i>	13
<i>Obr. 4 Biokompatibilita nanovláken stabilizovaných při různých teplotách.</i>	14
<i>Obr. 5 Účinnost silanizace povrchu nanovláken v závislosti na (A) podmínkách procesu a (B) podmínkách skladování.</i>	16
<i>Obr. 6 Reakční schéma znázorňující kroky vedoucí ke kovalentní vazbě HA na substrát obsahující primární aminoskupiny.</i>	18
<i>Obr. 7 Vliv podmínek na konjugaci HA.</i>	20
<i>Obr. 8 SEM snímky nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou</i>	23
<i>Obr. 9 Vývoj morfologie nanovláken v průběhu degradace v simulovaných podmínkách.</i>	24
<i>Obr. 10 Biokompatibilita funkcionalizovaných nanovláken.</i>	25
<i>Obr. 11 Antibakteriální účinnost nanovláken s imobilizovaným Polymyxinem B.</i>	27
<i>Obr. 12 Vývoj antibakteriální aktivity nanovláken v čase. Hodnoceno léčivo vázané na povrch bez kapilární frakce. Imobilizace z 0.1% roztoku.</i>	27

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].

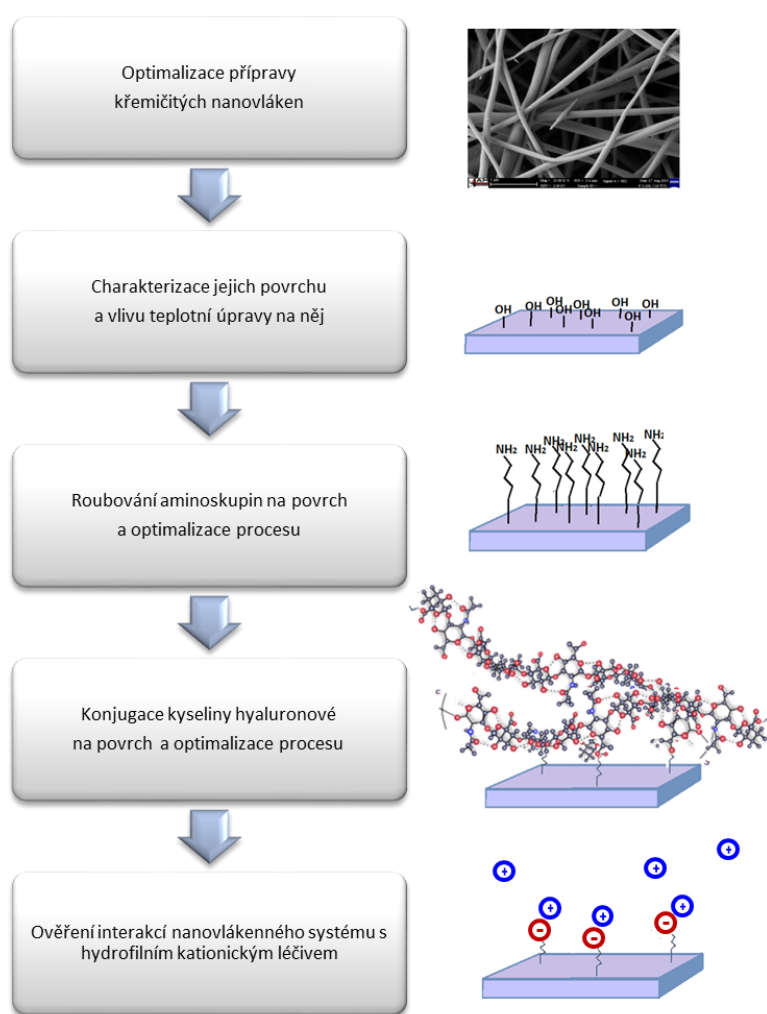
Materiálem s vysokým potenciálem pro využití v hojení ran a dopravě léčiv je také kyselina hyaluronová, a to především díky jejím unikátním vlastnostem, vysoké bioaktivitě [13, 14] a schopnosti stimulovat prostředí rány. Její silně hydrofilní, záporně

nabité 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.

Cíle práce

Cílem této disertační práce bylo vyvinout biokompatibilní nanovláknenný systém založený na kombinaci dvou bioaktivních materiálů – tedy křemičitých nanovláken a vysokomolekulární kyseliny hyaluronové, a to tak aby zůstala zachována nanovláknenná struktura a zároveň byly zlepšeny povrchové vlastnosti materiálu. Dále pak vyhodnotit využitelnost takového materiálu při vazbě a lokálním uvolňování hydrofilních kationických léčiv. Vývoj takového materiálu zahrnoval kroky uvedené na schématu níže (obr. 1).



Obr. 1 Schéma jednotlivých kroků přípravy a modifikace křemičitých nanovláken zahrnutých v disertační práci.

Vzhledem k šíři analýz vyžadovaných při ověřování jednotlivých kroků povrchové modifikace nanovláken byla experimentální část práce rozdělena do tří samostatných kapitol, které na sebe vzájemně navazují a dokumentují vývoj materiálu včetně hodnocení vlastností relevantních pro další krok modifikace nebo aplikaci v oblasti dopravy léčiv a hojení ran.

Kapitoly zahrnuté v experimentální části jsou:

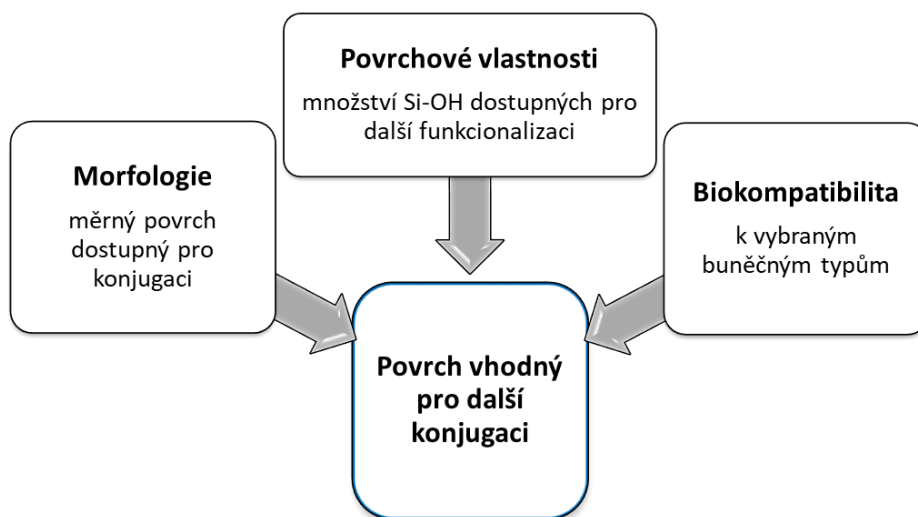
1. Příprava a charakterizace křemičitých nanovláken;
2. Konjugace kyseliny hyaluronové a charakterizace a
3. Hodnocení interakcí nanovláčenného systému s modelovými léčivy.

Nejvýznamnější výsledky

1. Příprava a charakterizace křemičitých nanovláken

Příprava solu pro výrobu křemičitých nanovláken probíhala metodou sol-gel s hydrolyzou a kondenzací katalyzovanými v kyselém prostředí.

U substrátů pro dopravu léčiv a konjugaci je vyžadován co nejvyšší specifický povrch dostupný pro vazbu molekula. Ten je závislý na morfologii nanovláken, především jejich průměrem, který je při výrobě nanovláken elektrostatickým zvlákňováním určován procesními parametry zvlákňování 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. Všechny tyto parametry hrají významnou roli při volbě optimálních podmínek přípravy křemičitých nanovláken, jak ukazuje schéma na obrázku 2.



Obr. 2 Schéma vlivu jednotlivých parametrů při výběru substrátu pro další konjugaci.

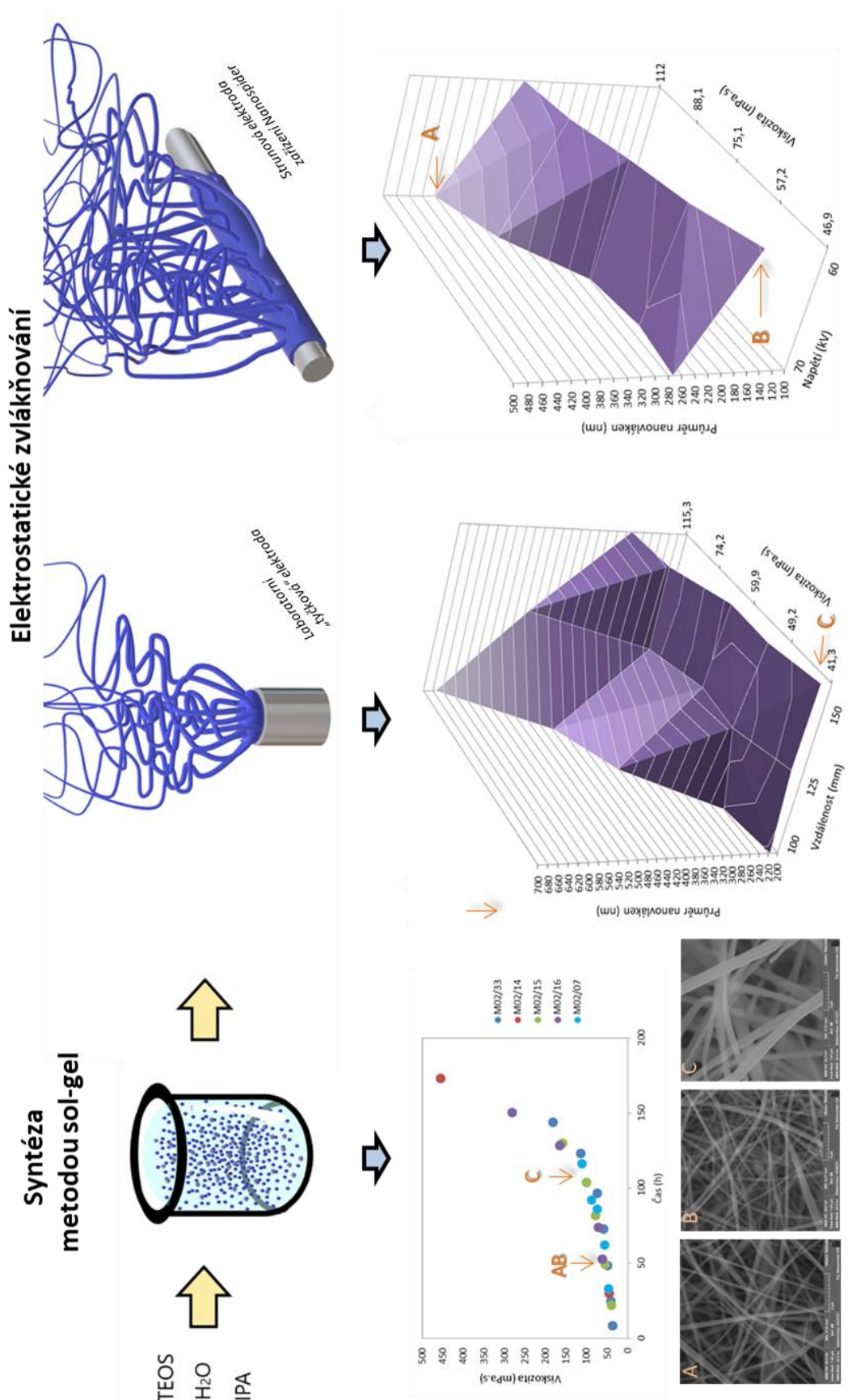
Proto byla při přípravě nosného nanovláčenného substrátu křemičitých nanovláken pozornost věnována rychlosti přechodu mezi jednotlivými fázemi vnitřního uspořádání solu projevujícího se změnou viskozity. Byl ověřen vliv viskozity solu a vybraných

procesních parametrů elektrostatického zvlákňování na morfologii připravených křemičitých nanovláken a jejich měrný povrch. A to u dvou metod bezjehlového elektrostatického zvlákňování. Vliv parametrů byl testován zvlákňováním na laboratorním zařízení vybaveném „tyčkovou“ elektrodou a na poloprovozním zařízení Nanospider NS line 1WS500U (Elmarco, Česká republika) vybaveném drátovou elektrodou. Byla popsána závislost průměru nanovláken na viskozitě (fázi přechodu solu) a zvlákňovací vzdálenosti a napětí u obou zvlákňovacích zařízení. Schéma zobrazují jak systém práce, tak vliv viskozity jako významného parametru majícího zásadní vliv na průměr nanovláken a vybrané dosažené výsledky je na obrázku 3. Kompletní výsledky a popis závislostí je uveden v disertační práci v kapitole 5. 3. 1. Pro dosažení homogenní nanovláčenné vrstvy na zařízení Nanospider byla jako optimální stanovena viskozita solu $> 50 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ při zvlákňovací vzdálenosti 175 mm a napětí 70 kV. Tímto způsobem byla zvlákňováním solu o viskozitě $43.2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ připravena nanovláčenná vrstva se střední hodnotou průměru vláken $241.3 \pm 76.3 \text{ nm}$, u níž byl vypočtený specifický povrch dostupný pro další modifikace $> 8 \text{ m}^2/\text{g}$.

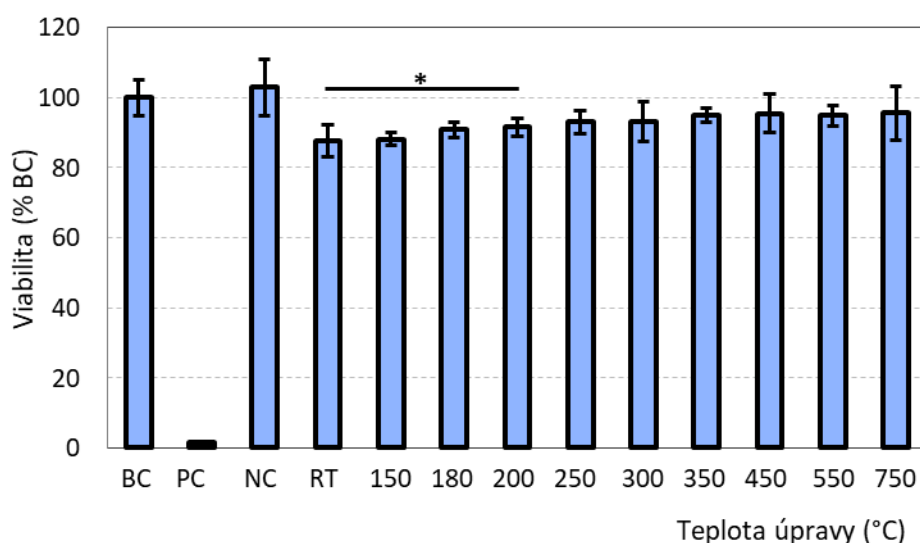
V případě hodnocení vlivu tepelné stabilizace na množství silanolových skupin na povrchu byla prokázána jejich ztráta rostoucí s teplotou při $250 \text{ }^\circ\text{C}$ a vyšší a jejich přeměna na siloxanové vazby. Tento výsledek byl potvrzen TGA i FTIR analýzou. Zároveň nebyl prokázán významný vliv teplotní úpravy na strukturu nanovláčenné vrstvy ani střední hodnotu průměru nanovláken.

Následně byl ověřen vliv teplotní stabilizace na biokompatibilitu nanovláken na vůči myším fibroblastům 3T3. Výskyt silanolových skupin na povrchu křemičitých materiálů ve vyšší míře je spojován s toxicitou nanomateriálů způsobenou oxidačním stresem [115, 253]. Tento předpoklad potvrdili i výsledky studie, kdy s rostoucí teplotou úpravy a snižujícím se množstvím silanolových skupin na povrchu rostla také viabilita buněk. Z $87.6 \pm 4.6 \%$ dosažených u neupravených nanovláken (R.T.) viabilita stoupla na $90.8 \pm 2.3 \%$ úpravou při $180 \text{ }^\circ\text{C}$, $93 \pm 3.3 \%$ úpravou při $250 \text{ }^\circ\text{C}$, a $\sim 95 \%$ úpravou při teplotách přesahujících $350 \text{ }^\circ\text{C}$. Dosažené výsledky jsou uvedeny na obrázku 4.

Vzhledem k významu silanolových skupin pro další konjugaci a buněčnou viabilitě $90.8 \pm 2.3 \%$, kdy je možné materiál označit za biokompatibilní vůči danému buněčnému typu, byla pro další funkcionalizace nanovláken zvolena nanovláčna tepelně stabilizovaná při teplotě $180 \text{ }^\circ\text{C}$.



Obr. 3 Schéma procesu hodnocení vlivu viskozity a procesních parametrů elektrostatického zvláknování na morfologii nanovláčkové vrstvy. Schematicky zobrazeny elektrody použité při elektrostatickém zvláknování a zároveň vybrané výsledky závislosti průměru nanovláken na viskozitě solu a procesních parametrech elektrostatického zvláknování (3D grafy).



Obr. 4 Biokompatibilita nanovláken stabilizovaných při různých teplotách.

Test v přímém kontaktu expozicí po dobu 24 hodin. Buněčná viabilita vztažena 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 $p < 0.005$.

2. Konjugace kyseliny hyaluronové a charakterizace

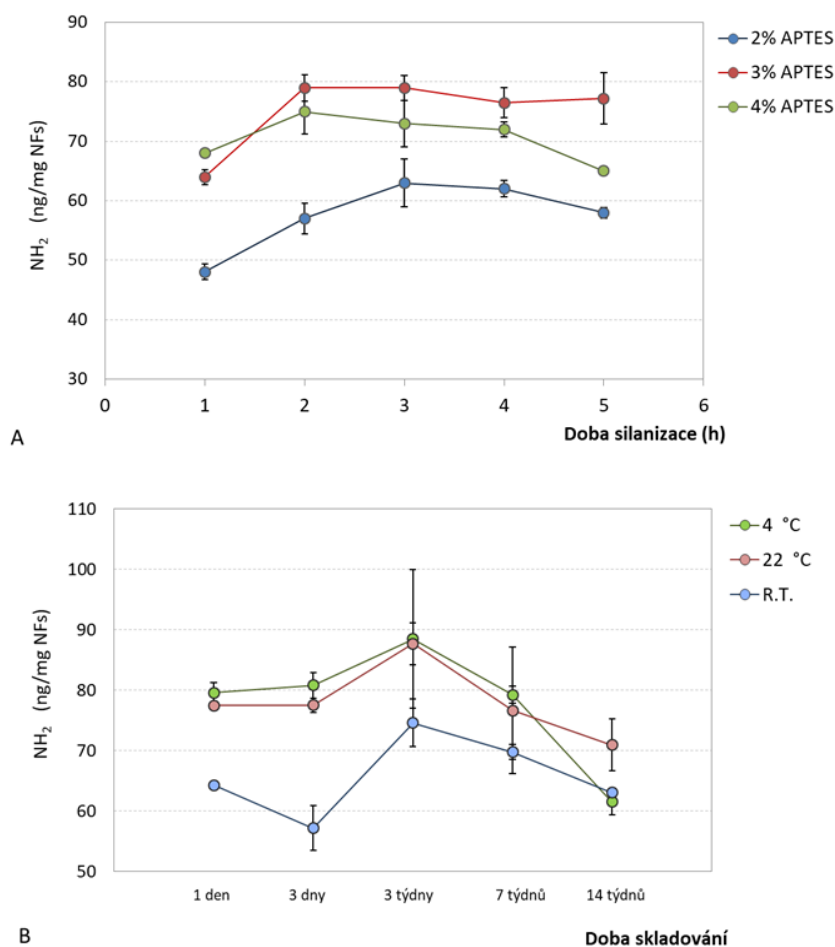
2.1 Vliv podmínek na účinnosti silanizace

Před konjugací kyseliny hyaluronové byla na povrchu křemičitých nanovláken provedena silanizace. Ta umožnila roubování primárních aminoskupin na povrch nanovláken. U silanizace povrchu byl studován vliv dvou parametrů – koncentrace silanizačního činidla (APTES) a doba silanizace.

U obou testovaných parametrů silanizace byl prokázán vliv na účinnost procesu. Výsledky jsou na obrázku 5A. 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 5A, 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]. 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 NH₂/ mg) dosaženo po 2 hodinách reakce. Delší doba silanizace vedla k poklesu dostupných aminoskupin až na 65 ± 0.21 ng NH₂ po 5 hodinách. Degradace povrchu nanovláken, která by snižování množství aminoskupin v čase také vysvětlovala, nebyla elektronovou mikroskopií potvrzena. 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.

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

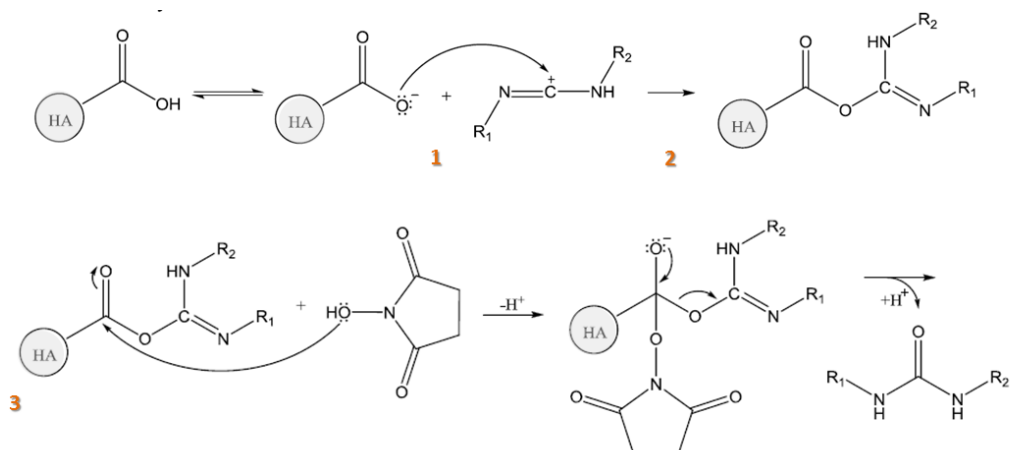
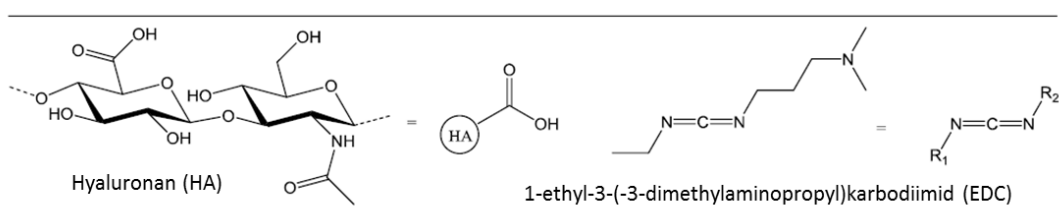
Kromě kinetiky reakce a vlivu koncentrace silanizačního činidla byl studován také vliv stáří nanovláken a podmínek skladování na účinnost procesu. Stárnutí nanovlákněné vrstvy po teplotní stabilizaci (180 °C) a skladovací teplota silně ovlivňují množství hydroxylových skupin dostupných na povrchu a tím 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 %

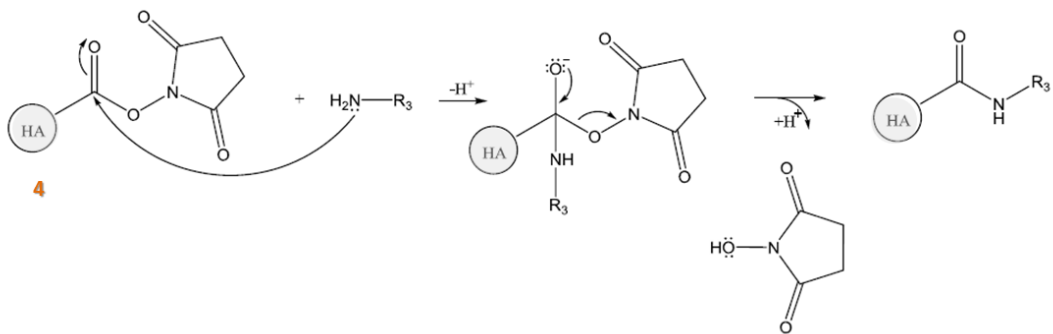
hydroxylových skupin na povrchu nanovláken k jejichž zpětné hydroxylaci došlo zhruba po třech týdnech skladování. Podobný trend vývoje byl zaznamenán u všech testovaných skladovacích podmínek. Skladování ve stabilním prostředí (4 °C, 22 °C) v uzavřené nádobě vedlo k vyšší míře rehydroxylace ve srovnání se skladováním při pokojové teplotě (R.T.). 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].

Na základě dosažených výsledků byla jako optimální stanovena silanizace 3% roztokem APTES po dobu 2 hodin.

2.2 Vliv podmínek na konjugaci kyseliny hyaluronové

Kyseliny hyaluronová (HA) byla konjugována povrch silanizovaných křemičitých nanovláken prostřednictvím karbodiimidové chemie s použitím linkerů EDC/NHS. Ty při vazbě využívají reakční schéma uvedené na obrázku 6. Ta umožňuje vznik kovalentní vazby mezi karboxyly HA a primárními aminoskupinami na povrch nanovláken. Proces byl studován z hlediska kinetiky a vlivu pH, použitého pufru a složení reakční směsi na množství kyseliny hyaluronové vázané na povrch.





Obr. 6 Reakční schéma znázorňující kroky vedoucí ke kovalentní vazbě HA na substrát obsahující primární aminoskupiny.

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

Vliv doby konjugace

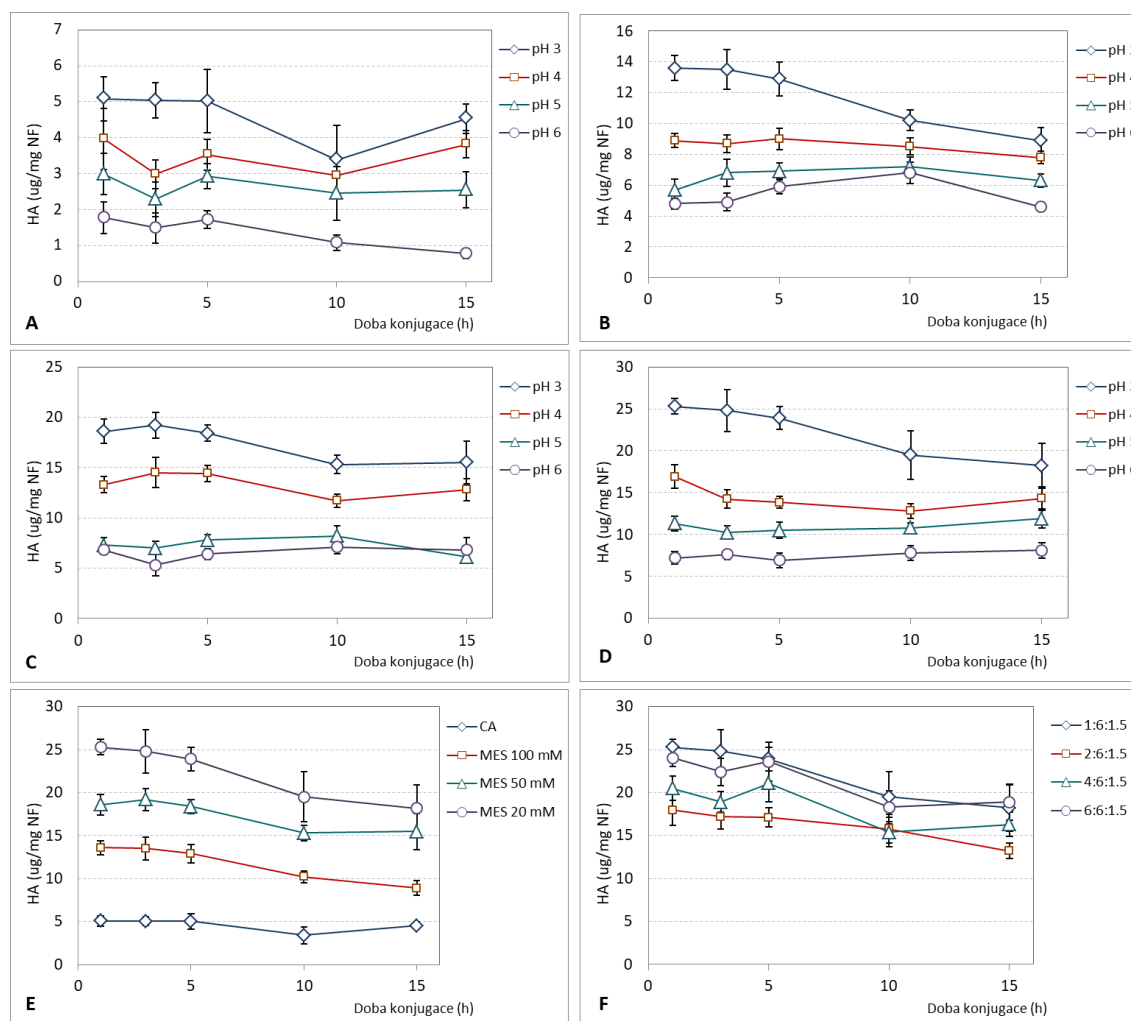
Při optimalizaci byla testována doba konjugace 1, 3, 5, 10 a 15 hodin. Výsledky, uvedené na obrázku 7, jasně ukazují, že 1 hodina je pro konjugaci kyseliny hyaluronové dostačující a po jejím překročení nejenže většinou nedochází k dalšímu nárůstu množství HA, ale v závislosti na složení konjugačního 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 a vést k jejímu zkracování. Vliv iontové síly pufru je pozorovatelný u konjugačního pufru MES, kdy u jeho nejvyšší koncentrace (100 mM, obr. 7B) 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. 7D) 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. 7D). Optimální doba konjugace je tedy silně závislá na použitém pufru a pH.

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 nejúspěšnější 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 7A-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. 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.



Obr. 7 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 pufrách při pH 3. (F) Srovnání vlivu poměru HA:EDC:NHS na konjugaci (20 mM MES, pH 3).

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 $\text{pH} < 4$ a $\text{pH} > 11$ [285]. Rychlost zkracování řetězců HA, ke kterému dochází štěpením zejména u β -(1 \rightarrow 4) glykosidové vazby, je potom závislé nejen na pH, ale i na teplotě. Tømmeraaas 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. 7 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

Vliv pufru

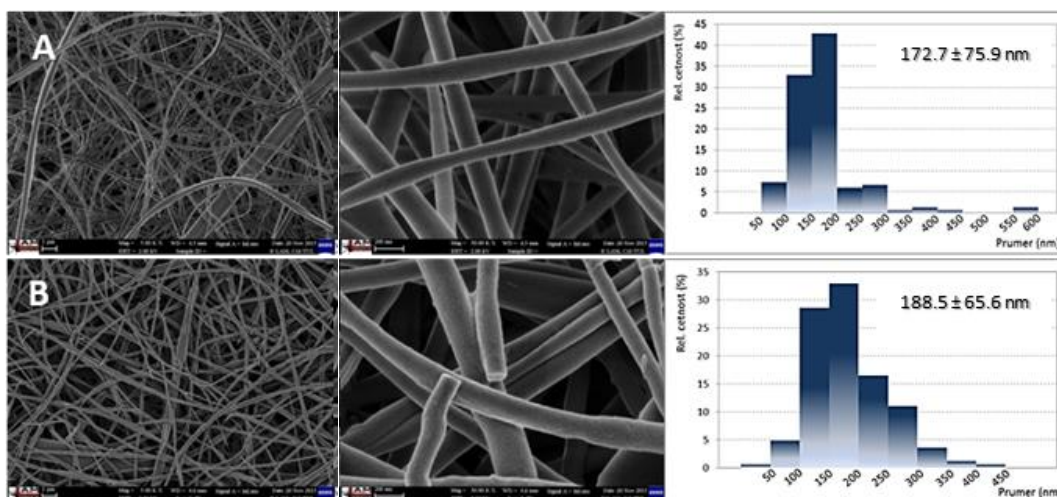
Ověřen byl také vliv použitého pufru na účinnost konjugace. Z porovnání výsledků uvedených na obrázku 7 A-D vyplývá, že vyšší účinnost konjugace HA je při použití MES pufru v porovnání s McIlvainovým pufrem. Tento efekt je možné vysvětlit přítomností kyseliny citronové v McIlvainově pufru, kdy EDC může 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. 7 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, iontová síla pufru může mít vliv také na degradaci křemičitých nanovláken.

Tento efekt se projevuje zejména při delší době konjugace (viz obr. 7 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.

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.

Z výsledků vyplývá (viz obr. 7 F), že nejnižší testovaný hmotnostní poměr (HA: EDC: NHS 1: 6: 1.5) vede k vazbě dostatečného množství kyseliny hyaluronové na povrch ($25.3 \pm 0.9 \mu\text{g HA} / \text{mg nanovláken}$) a další zvyšování podílu HA v reakční směsi nevede k vyšší výtěžnosti konjugace. 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. 8). Rovnoměrnou distribuci kyseliny hyaluronové v nanovláčkové vrstvě potom prokázalo barvení toluidinovou modří O (TBO).



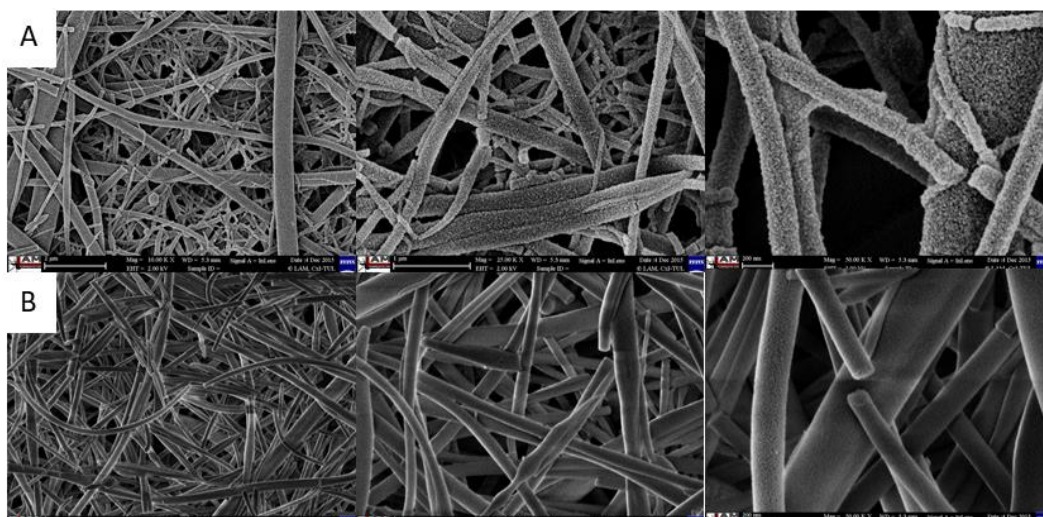
Obr. 8 SEM snímky nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou

(A) Křemičitá nanovlákná před konjugací. (B) Nanovlákná po konjugaci s poměrem HA: EDC: NHS 1: 6:1.5, pH 3, 20 mM MES. Zvětšení 5 kx a 50 kx doplněné o histograme průměrů nanovláken.

2.3 Vliv funkcionalizace na biodegradabilitu a biokompatibilitu

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]. V tomto případě vedla povrchová funkcionalizace ke zpomalení degradace nanovláken. 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. Konjugace kyseliny hyaluronové (25.3 HA $\mu\text{g}/\text{mg}$) vedla ke zpomalení degradace po dobu 72 hodin. U konjugované kyseliny hyaluronové (25.3 HA $\mu\text{g}/\text{mg}$) mělo uvolňování Si 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 nanovláknky lze vysvětlit narušením hyaluronového obalu nanovláken. To potvrdila také SEM analýza, kde je patrný rozdíl v narušení povrchu nanovláken zejména po 24

hodinách v STT, kdy u neupravených nanovláken již probíhá eroze povrchu, zatímco nanovláčna s konjugovanou kyselinou hyaluronovou vykazují stále hladký povrch. Po dalších 24 hodinách degradace už narušení povrchu vykazují i ona. Analýza povrchu nanovláken po degradaci zároveň prokázala, že křemičitá nanovláčna vykazují schopnost popsanou i u jiných nanomateriálů na bázi oxidu křemíku – tedy degradaci bez botnání a schopnost uchování strukturní integrity i po ztrátě až 85% podílu hmoty [275, 276].

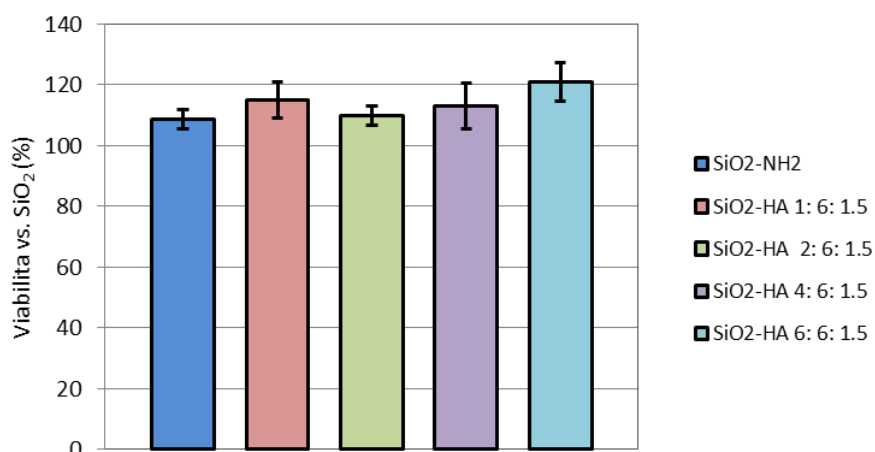


Obr. 9 Vývoj morfologie nanovláken v průběhu degradace v simulovaných podmínkách.

(A) Neupravená nanovláčna a (B) Nanovláčna s konjugovanou HA po 24 hodinách degradace v STT in vitro.

U nanovláken s konjugovanou kyselinou hyaluronovou byl také potvrzen pozitivní vliv na biokompatibilitu nanovláčkové vrstvy.

Zatímco silanizace vedla k viabilitě myších fibroblastů $3T3\ 108.8 \pm 3.1\ %$. Konjugace kyseliny hyaluronové vedla k dalšímu zvýšení viability buněk v závislosti – a to na $115.1 \pm 5.9\ %$ v případě poměru HA: EDC 1: 6 a $120.9 \pm 6.2\ %$ u HA: EDC 6: 6 (viz obr. 10). 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. 10 Biokompatibilita funkcionalizovaných nanovláken.

Viabilita 3T3 myších fibroblastů vyjádřena jako procentuální podíl z viability buněk vystavených neupraveným SiO₂ nanovláknům v přímém kontaktu po dobu 24 hodin.

Studován byl také vliv na modifikace povrchu na adhezi a proliferaci buněk na povrchu nanovláken. Hodnocení viability buněk (MTT) bylo doplněno ověřením morfologie buněk fluorescenčním barvením i elektronovou mikroskopií. I přes zvýšenou adhezi buněk v prvních 24 hodinách, u žádného z nanovláknenných substrátů s konjugovanou HA nebyla pozorována podpora buněčné proliferace.

Z těchto výsledků vyplývá, že konjugace HA vede ke zlepšení biokompatibility a zpomalení degradace nanovláken, ale nepodporuje proliferaci buněk na jejich povrchu. Tento efekt je významný zejména z pohledu aplikace v hojení ran, kdy ani u funkcionalizovaných nanovláken nedochází při degradaci k uzavírání mezivláknenných 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. Nízká buněčná proliferace na povrchu nanovláken zabrání při aplikaci krytu na ránu jeho adhezi ke spodině rány.

3. Hodnocení interakcí nanovláken s modelovými léčivými

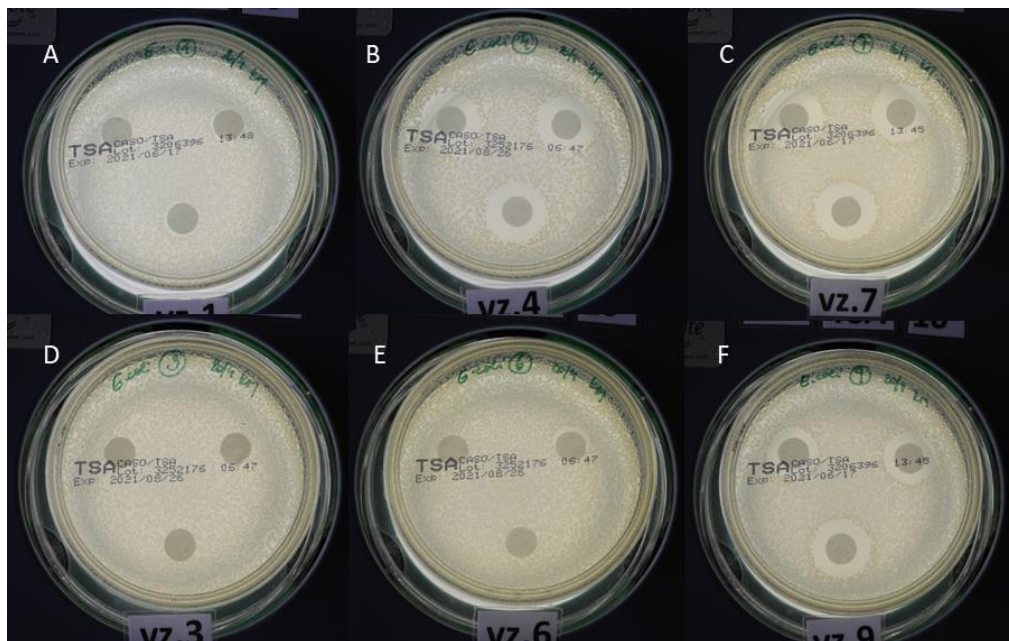
V závěru práce byly ověřeny interakce modifikovaných nanovláken se zvolenými modelovými léčivými – polymyxinem B a nisinem. Polymyxin B je kationní hydrofilní antibiotikum s účinkem proti gramnegativním bakteriím včetně multirezistentního kmene *Acinetobacter baumannii*. Nisin je polycyklický antibakteriální peptid náležící do skupiny lantibiotik s účinkem proti grampozitivním bakteriím.

Sledována byla sorpce léčiv na povrch modifikovaných nanovláken, kinetika jejich uvolňování liberací do simulované tělní tekutiny. Zároveň bylo provedeno hodnocení antibakteriální účinnosti v závislosti na typu vazby léčiva a také ověření doby trvání antibakteriálního účinku.

U modifikovaných nanovláken byla potvrzena schopnost vazby většího množství léčiva ve srovnání s neupravenými a silanizovanými nanovláknami a to i z roztoků o nízké koncentraci. Zároveň byl potvrzen vliv pH média na množství uvolněného léčiva.

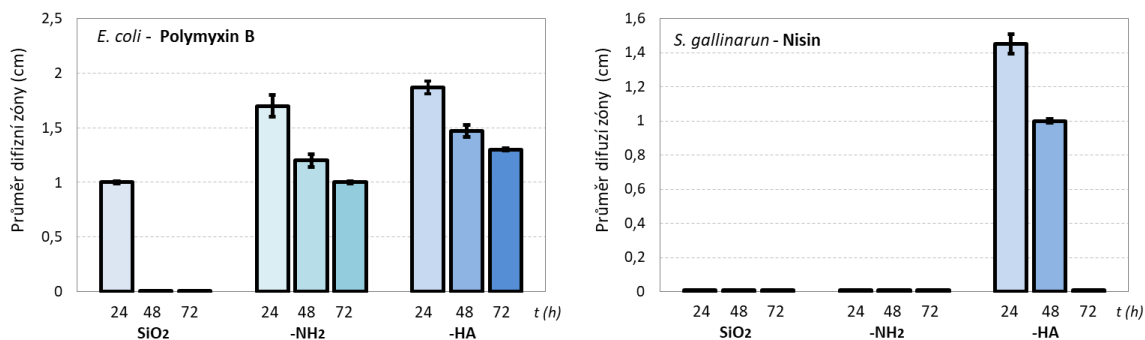
Liberační i antibakteriální testy potvrdily formování silnější vazby podílu léčiva na nanovlákně díky elektrostatickým interakcím s molekulami kyseliny hyaluronové. V případě nisinu bylo potvrzeno také prodloužené uvolňování - a to po dobu 8 hodin. Zvýšená sorpce léčiva vedla k také ke zvýšené antibakteriální aktivitě vůči oběma sledovaným bakteriím (*E. coli* a *S. gallinarum*). Zároveň byl u obou modelových léčiv prokázán prodloužený antibakteriální účinek spojený se zvýšenou vazbou a stabilitou léčiva na nanovlákněch s konjugovanou HA. Ta byla schopna uvolňovat aktivní polymyxin B po dobu 72 hodin a nisin po dobu 48 hodin.

Dokumentace dosažené antibakteriální účinnosti hodnocené jako rozměr difuzní zóny v okolí vzorku a vývoj antibakteriální účinnosti v čase jsou zobrazeny na obrázcích 11 a 12.



Obr. 11 Antibakteriální účinnost nanovláken s imobilizovaným Polymyxinem B.

Rozeř difuzních zón. Léčivo vázané (A, B, C) adsorpcí vč. kapilárních frakce a vázané (D, E, F) elektrostatickými interakcemi na (A, D) neupravená SiO₂, (B, E) SiO₂-NH₂ a (C, F) SiO₂-NH₂-HA nanovládkna. Testováno na bakterii E. coli..



Obr. 12 Vývoj antibakteriální aktivity nanovláken v čase. Hodnoceno léčivo vázané na povrch bez kapilární frakce. Imobilizace z 0.1% roztoku.

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. Nanovlákná 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 nanovlákná představují v tomto směru biokompatibilní a biodegradabilní materiál vyznačující se unikátním způsobem degradace, který nevede k uzavírání mezivláknenných 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 zvláknování na morfologii připravovaných nanovláken. Zjištěné souvislosti vedly ke stanovení optimální viskozity solu ($< 50 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) a procesních parametrů umožňujících přípravu homogenní nanovláknenné vrstvy se střední hodnotou průměru nanovláken $\leq 250 \text{ nm}$ 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 $180 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 2 hodin.

Pro zajištění konjugace kyseliny hyaluronové na povrch nanovláken byla křemičitá nanovlákná 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 μg 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 léčivými 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 léčivy. 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.

Seznam publikací

týkajících se tématu

1. RYSOVÁ, M., TOMÁNKOVÁ, H., ROTKOVÁ, J., SCHAABOVÁ, M., NEVOLOVÁ, I. KADLEČÍK, D. Surface functionalization of silica nanofibres for sustained drug release in wound healing. *Materials Science and Engineering C*. (Odesláno k recenznímu řízení, 10/2021).
2. STEINEROVÁ, M., MATĚJKA, R., ŠTĚPANOVSKÁ, J., FILOVÁ, E., STAŇKOVÁ, L., RYSOVÁ, M., MARTINOVÁ, L., DRAGOUNOVÁ, H., DOMOSKOSE, M., ARTEMENKO, A., BABCHENKO, O., OTAHAL, M., BACA KOVA, L., KROMKA, A. Human osteoblast-like SAOS-2 cells on submicron-scale fibers coated with nanocrystalline diamond films. 2021, *Materials Science and Engineering: C*, 2021, 121, 111792
3. MÁKOVÁ, V., HOLUBOVÁ, B., TETOUR, D., BRUS, J., ŘEZANKA, M., RYSOVÁ, M., HODÁČOVÁ, J. (1S,2S)-cyclohexane-1,2-diamine-based organosilane fibres as a powerful tool against pathogenic bacteria. *Polymers*, 2020, 12(1), 206
4. DANILOVÁ, I., LOVĚTÍNSKÁ-ŠLAMBOROVÁ, I., ZAJÍCOVÁ, V., VOLESKÝ, L., RYSOVÁ, M. Immobilization of Esterase enzyme onto silica nanofibres for biomedical applications. 2014, *Fibres and Textile 2*, ISSN 1335-0617.

Plné texty vedené ve Scopus/WoS

1. TOMÁNKOVÁ, H., RYSOVÁ, M., PAZOUREK, A. Plasma treatment in surface modification of silica dioxide nanofibres. 2018, In: *NANOCON Conference Proceedings - the 10th International Conference on Nanomaterial*, Tanger Ltd., Brno, 2018, ISBN: 978 80 87294 85 7
2. ROTKOVÁ, J., TOMÁNKOVÁ, H., RYSOVÁ, M. Inorganic silica nanofibres in role of bioactive compound carrier. In: *NANOCON Conference Proceedings - The 7th International conference Nanocon 2015 proceedings*, Tanger, Brno, 2016. ISBN: 978-80-87294-63-5
3. SYROVÁ, Z., MAZEL, T., CHUDOBA, J., RYSOVÁ, M., POLÁKOVÁ, D., PYTLÍK, R. Study of silica-based electrospun nanofibres as a scaffold for human bone marrow mesenchymal stem cells. *NANOCON Conference Proceedings - The 7th International conference Nanocon 2015 proceedings*. Tanger, Brno, 2016. ISBN: 978-80-87294-63-5

Použité zdroje

1. Stehlíková, K. Moderní přístupy k hojení chronických ran. *Remedia*, 2017, 5, PND.
2. Blanko-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 to 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. *Pharmaceutics (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 pH 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. Poly(lactide) 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/poly(vinyl alcohol) nanofiber 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 nanofibers 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/poly(vinyl 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. Moradkhannehada, 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 electrospinning. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 99, pp. 218-225.
58. Yu, L. et al. An antimicrobial peptide-loaded chitosan/poly(ethylene 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 poly(vinyl 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 nanovlákná na bázi oxidu křemičitého*. Liberec, 2008. Disertační práce. Technická univerzita v Liberci. Školitel: Odvárky, J., Školitel specialista: 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 Science 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 Society 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. *Therapeutic 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 Biomedical 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. Veveřková, 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. Shahhosseini, M., Bazgir, 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. Hromádka, 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., Fariás, 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 alkoxyxilanes and organoalkoxyxilanes 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 funkcí 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, Tangerang, 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. *Orthopedic 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 Societati 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. *Pharmaceutics*, 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 zvláknování*. 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 Technologia*, 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. *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 Nordmanna, 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.