

Univerzita Karlova

Fakulta tělesné výchovy a sportu

Doktorský studijní program: Biomechanika



MUDr. Jiří Beznoska

**Regenerace osteochondrálních defektů kloubních ploch s použitím
nebuněčných obohacených nanovláknenných gelů**

Functionalized non-cellular nanofibrous gels for
regeneration of articular osteochondral defects.

Disertační práce

Školitel: prof. RNDr. Evžen Amler, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systém meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 23.4.2024

MUDr.Jiří Beznoska

Poděkování:

Na tomto místě bych v první řadě rád poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Eženu Amlerovi DrSc., který mě po celou dobu vedl ke zdárnému dokončení této práce. Dále bych rád poděkoval celé řadě spolupracovníků z počátečních ale i konečných stadií výzkumu.

ABSTRAKT

Poškození kloubních povrchů tvořených hyalinní chrupavkou je nevratný proces, organismus ho sám již nedokáže reparovat. Naší snahou je vytvořit metodu, která by reparaci defektu nastartovala a vytvořila jakousi konstrukci pomocí níž by poškozený organismus dokázal reeparaci defektu dokončit. Byl získán nebuněčný implantát optimálních biomechanických parametrů určený k sanaci defektních kloubních povrchů zejména traumatologické etiologie a současně byl vytvořen gelový injikovatelný materiál na bázi inteligentních nanovláken funkcionalizovaných mediátory stimulujícími migraci buněk.

ABSTRACT

Damage of the joint surfaces formed by hyaline cartilage is an irreversible process, the organism cannot repair it by itself. Our effort is to create the method that would start a repair of the defect and create a kind of construction helping the damaged organism to complete a repair of the defect.

A non-cellular implant with optimal biomechanical parameters was obtained. It was intended for the reparation of defective joint surfaces, especially of traumatological etiology. Simultaneously a gel injectable material based on intelligent nanofibers functionalized with mediators stimulating cell migration was created.

SEZNAM ZKRATEK

SC	kmenová buňka (<i>stem cell</i>)
MSC	mezenchymální kmenová buňka (<i>mesenchymal stromal cell</i>)
PRP	plazma bohatá na krevní destičky (<i>platelet rich plasma</i>)
PAN	polyakrylonitril
miRNA	malé nekódující molekuly ribonukleových kyselin
PCL	poly-ε-kaprolakton
PVA	polyvinylalkohol
API	účinná farmaceutická látka (<i>active pharmaceutical ingredient</i>)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
EPR	vyšší účinek pronikání a retence (<i>enhanced permeability and retention effect</i>)
IRCS	Mezinárodní společnost pro obnovu chrupavky (<i>The International Cartilage Repair Society</i>)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
NP	nanočástice (<i>nanoparticles</i>)
CL	kardiolipin
PC	fosfatidylcholin
PE	fosfatidyletanolamin
PS	fosfatidylserin
PI	fosfatidylinositol
PA	kyselina fosfatidová
PG	fosfatidylglycerol
PEG	polyethylenglykol

OBSAH

1.		7
2.		7
2.1	Kloubní povrch a jeho poškození	9
2.2	Klasifikace poškození chrupavky	10
2.3	Kmenové buňky v řešení chondrálních a osteochondrálních lézí	11
2.4	Vlastnosti nanovláken a jejich modifikace	13
2.5	Klíčová role nanovláken v theragnostice a personalizované medicíně	15
2.6	Řízené dodávání látek v theragnostice a personalizované medicíně	15
2.7	Transport látek v buňce	16
2.7.1	Pasivní transport	15
2.7.2.	Aktivní cílení léčiv	16
2.8	Lipozomy jako sekundární nosič pro enkapsulaci do nanovláken	17
2.9	Složení lipozomů	18
2.10	Specifický ultrasensitivní detektor na bázi funkcionalizovaných nanovláken.	20
2.11	Detekce extrémně nízkých koncentrací v plynném prostředí.	21
3.		20
3.1	PVA and PCL nanofibers are suitable for tissue covering and regeneration	23
3.2	Hydrogel containing anti-cd44-labeled microparticles, guide bone tissue formation in osteochondral defects in rabbits	25
3.3	Polycaprolactone foam functionalized with chitosan microparticles – a suitable scaffold for cartilage regeneration	26
3.4	The control of osteochondral regeneration in rabbits using type I collagen/fibrin scaffold enriched with thrombocytes and chitosan/poly-ε-caprolactone microparticles	28
3.5	Efekt frakcionalizovaných nanovláken na Youngův modul pružnosti	31
3.6	Smart nanofibers with natural extracts prevent senescence patterning in a dynamic cell culture model of human skin	31
4.		33
4.1	Nebuněčný implantát optimálních biomechanických parametrů určený k sanaci defektních kloubních povrchů zejména traumatologické etiologie.	34
4.2	Gelový injikovatelný materiál optimálních biomechanických parametrů pro 3D medicínské aplikace na bázi inteligentních nanovláken funkcionalizovaných mediátory stimulujícími migraci buněk.	35
4.3.	Časově regulovatelné systémy dodávání léčiv a dalších bioaktivních látek a verifikovat in vitro experimenty	36
4.4	Vyhodnocení in vivo biokompatibility a účinnosti nanovláčenných systémů pro theragnostické aplikace.	36
5.	Literatura	39
6.	Seznam publikací	43
6.1	Původní vědecké práce, které jsou podkladem této disertační práce	38
7.		43

1. CÍLE PRÁCE

Záměrem této práce v obecném smyslu je přispět k moderní theragnostice (personalizované léčebné strategii, která kombinuje diagnostiku s terapií) v ortopedii aplikací funkcionalizovaných nanovláken s využitím mezenchymálních kmenových buněk (MSC) lokalizovaných v okolí postiženého místa. Aplikace vhodně funkcionalizovaných nanovláken, včetně nanovláken frakcionovaných ve formě disperzního roztoku, je slibným prostředkem moderní personalizované medicíny, který umožní cílenou a časově řízenou migraci MSC a využití regeneračního potenciálu autologních MSC ke zhojení defektu po jednotlivých vrstvách miniinvazivní chirurgickou cestou. Tento přístup navíc též minimalizuje nároky na schvalovací procesy zdravotnickými autoritami (SÚKL, EMA), což umožňuje akceleraci transferu poznatků základního výzkumu do ortopedické praxe a cílenou personalizovanou léčbu aplikací tzv. *precision medicine*.

Konkrétní cíle této práce byly:

- a. získat nebuněčný implantát optimálních biomechanických parametrů určený k sanaci defektních kloubních povrchů zejména traumatologické etiologie. Je třeba zdůraznit slovo nebuněčný. Chondrogenní transplantáty získávané kultivací autogenních chondrocytů tzv. chondrografty jsou používány ať už s větším či menším úspěchem řadu let. Jejich většímu rozšíření brání především velmi vysoká cena, poměrně dlouhá doba kultivace a v neposlední řadě nutnost dvoudobého operačního výkonu. Firemně zhotovované přípravky typu polymeru z kyseliny polyglykolové spolu s kyselinou hyaluronovou (*Chondrotissue*[®]) jsou určené spíše jen k dočasnému překrytí defektu a není možné je v pravém slova smyslu počítat mezi transplantáty.
- b. Vytvořit gelový injikovatelný materiál optimálních biomechanických parametrů pro 3D medicínské aplikace na bázi inteligentních nanovláken funkcionalizovaných mediátory stimujícími migraci MSC do místa defektu, tedy funkcionalizovaný gel, kde nanovlákná slouží jako síť určená k adhezi buněk na bázi PRP, které nanovláknem funkcionalizují. Mezenchymální stromální buňky z okolí migrují po gradientním spádu do místa defektu vyplněného gelem a postupně se transformují na chondrocyty, eventuálně na osteoblasty dle lokality, do které přicestovaly.
- c. Vytvořit časově-regulovatelné systémy dodávání léčiv a dalších bioaktivních látek a verifikovat *in vitro* experimenty.
- d. Vyhodnotit *in vivo* biokompatibilitu a účinnost nanovláknenných systémů pro theragnostické aplikace.

2. ÚVOD

2.1 Kloubní povrch a jeho poškození

Poškození kloubních povrchů, ať už traumatologické nebo degenerativní etiologie, je jednou z nejčastějších příčin bolesti kloubu, omezení hybnosti a následného rozvoje artrózy. Stále se zvyšující nároky na sportovní výkony vrcholových sportovců, ale i sportovců rekreačních, přinášejí množící se nálezy těžkých defektů kloubních ploch.

Kloubní povrch je fyziologicky kryt hyalinní kloubní chrupavkou. Jedná se o pružnou mezenchymální tkáň vyživovanou prostou difuzí s nízkou potřebou kyslíku a anaerobním metabolismem. Hyalinní chrupavka samotná nemá žádné cévní zásobení. Základními složkami hyalinní chrupavky jsou chondrocyty (asi 10 % hmotnosti) syntetizující mezibuněčnou hmotu (matrix), která obsahuje kolagen II. typu (na rozdíl od vazivové chrupavky obsahující kolagen I. typu), proteoglykany (chondroitin-sulfát, keratansulfát, agrekan), kyselinu hyaluronovou a glykoproteiny (fibronektin a chondronektin). Nemalou měrou, cca 80% hmotnosti, je zastoupena voda.

Hyalinní chrupavka je od povrchu ke kosti tvořena těmito vrstvami:

- Povrchovou zónou sestávající z polysacharidové blanky, elipsoidních chondrocytů a kolagenních vazivových vláken.
- Přechodnou zónou sestávající ze sférických chondrocytů bohatých na organely, vertikálně uspořádaných kolagenních vláken s velkým množstvím proteoglykanu.
- Mineralizovanou zónou, která obsahuje malé chondrocyty a již částečně kalcifikované ostrůvky.

Různé uspořádání kolagenních vláken v jednotlivých zónách chrupavky je odpovědí na tlakové poměry, které se v jednotlivých vrstvách mění a pouze v povrchové vrstvě je výsledný vektor tlakové síly horizontální. Růst chrupavky je buď intersticiální nebo apoziční. Na artikulárních plochách v místech, kde dochází k opotřebenosti chondrocytů i matrix, dochází též mitotickým dělením chondrocytů k intersticiálnímu růstu. V místech, kde se uplatňuje perichondrium, tj. při bázi chrupavky dochází k růstu mechanismem apozyce. Chondroblasty perichondria proliferují a diferencují se v chondrocyty produkující matrix a doplňují následně vrstvu chrupavky. V obou případech chondrocyty vytvářejí kolagenní vlákna a extracelulární matrix. Regenerační schopnosti hyalinní chrupavky jsou však minimální a částečně může docházet k regeneraci jen v perichondriu. Chondroblasty z perichondria pronikají do místa poškození, diferencují se v chondrocyty a vytvářejí zde novou chrupavku. Je-li však rozsah poškození větší nebo je defekt lokalizován povrchově dojde maximálně, a to jen v lepším

případě k překrytí chrupavkou vazivovou. Názory na regeneraci chrupavky nejsou jednotné. Jedno křídlo tvoří konzervativní zastánci Hunterova sloganu z roku 1743 „*Cartilage once destroyed can't be repaired*“. Poslední dobou ale získává převahu názor (podložený zejména experimentálními studiemi) zastávající možnosti její částečné reparace.

Defekty kloubních povrchů představují jeden z nejčastějších problémů v oboru ortopedie. Chondrální léze tvoří kolem 60 % všech patologických nálezů v kolenním kloubu. Malé povrchové defekty do velikosti cca 1×1 cm jsou většinou asymptomatické. Rozsáhlejší defekty se ale většinou časem zvětšují a jsou predispozicí pro degeneraci kloubního povrchu s následným předčasným rozvojem artrózy.

2.2 Klasifikace poškození chrupavky

Pro studium možnosti sanace chondrálních kloubních postižení traumatické etiologie je zcela zásadní vytvoření klasifikace defektů. Tak jako v mnoha dalších případech i zde máme k dispozici několik klasifikací. Nejčastěji jsou používány klasifikace Outerbridgeova (Tab.1) a Noyes-Stablerova (Tab. 2).

Tab. 1. Outerbirdgeova klasifikace

Stupeň	Poškození
0	Normální chrupavka
1	Chrupavka změklá, oteklá
2	Lokalizované částečné zeslabení chrupavky s jemnými fisurami nezasahujícími k subchondrální kosti a nepřesahujícími rozsah 1,5 cm v průměru
3	Defigurace kloubního povrchu zasahující k subchondrální kosti a přesahující rozsah 1,5 cm v průměru
4	Volný fragment, odhalená subchondrální kost

Tab. 2. Noyes-Stablerova klasifikace

Stupeň	Poškození
0	Normální chrupavka
1A	Mírné změknutí nebo změna barvy chrupavky
1B	Těžké změknutí nebo změna barvy chrupavky
2A	Částečný defekt postihující méně než polovinu vrstvy chrupavky
2B	Částečný defekt postihující více než polovinu vrstvy chrupavky
3A	Defekt celé šíře chrupavky postihující subchondrální kost s intaktním povrchem kosti
3B	Defekt celé šíře chrupavky postihující subchondrální kost s kavitacemi povrchu kosti

V roce 1997 byla Mezinárodní společností pro výzkum obnovy chrupavky (IRCS) vytvořena nová klasifikace defektů kolenního kloubu (Tab. 3).

Tab. 3. Nová klasifikace defektů kolenního kloubu (IRCS)

Stupeň	Hloubka poškození	Plocha	Lokalizace
0	Bez poškození	0	Koleno
1a	Fibrilace	10-15 mm	kondyly, česka
1b	Praskliny	10-15 mm	kondyly, česka
2	50% hloubky	20 mm	kondyly, česka
3a	Radiální zóna	25 mm	kondyly, česka
3b	Mineralizovaná zóna	25 mm	kondyly, česka
3c	Plná tloušťka chrupavky	25 mm	kondyly, česka
3d	Puchýře	25 mm	kondyly, česka
4	Zasahující do kosti	Nad 25 mm	kondyly, česka

2.3 Kmenové buňky v řešení chondrálních a osteochondrálních lézí.

Kmenové buňky (*stem cells*, SC) jsou buňky schopné obnovovat poškozené nebo opotřebované části a udržovat homeostázu organismu. Jedná se o buňky s časově neomezenou schopností sebeobnovy, jejichž mitotickým dělením vzniká jedna buňka identická s mateřskou (pro udržení *poolu* kmenových buněk) a buňka, která může dát vzniknout alespoň jednomu vysoce diferenciovanému buněčnému typu.

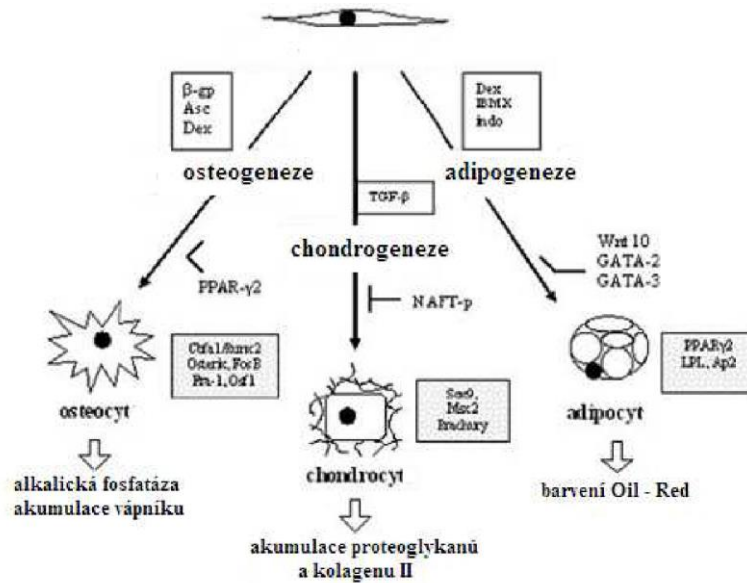
Mezenchymální stromální buňky (MSC) jsou multipotentní buňky, které mohou být izolovány z kostní dřeně, tukové tkáně, pupčnickové krve a různých zárodečných tkání. Mají schopnost diferencovat se do tkání mezodermálního původu – kostí, chrupavek, šlach, svalů a tukové tkáně; produkují specifické růstové faktory a cytokiny, které podporují expanzi a diferenciaci hematopoetických buněk.

Mezenchymální kmenová buňka (MSC) musí splňovat čtyři kritéria:

1. podstupuje mnohočetná mitotická dělení, kterými se regeneruje;
2. dceřiné buňky se diferencují ve více než jeden buněčný typ
3. při transplantaci jsou schopné funkčního znovuosídlení tkáně svého původu;
4. *in vivo* přispívají k tvorbě diferenciovaných buněčných populací (i bez poškození).

MSC buňky se mohou vyskytovat v různých typech tkání ve specializovaných oblastech zvaných „*stem cell niches*“, které slouží jako rezervoár kmenových buněk. Ty zůstávají v klidové fázi a uplatňují svou schopnost sebeobnovy až po poranění, při chorobách nebo při procesech stárnutí [14]. Hypotéza o specifických „*nikách*“ pro buňky kostní dřeně byla postulována *Schofieldem et al.*, který jako první vyslovil domněnku, že určitá skladba mikroprostředí kostní dřeně může udržovat kmenové buňky v primitivním, klidovém stavu [49]. Pozorování týkající se distribuce MSC v kostní dřeni ukázala, že buňky jsou lokalizovány v těsné blízkosti endostu [41]. Tato místa tedy mohou být považována za potenciální útočiště pro MSC. Po částečné stimulaci mohou kmenové buňky opustit svou *niche* a přejít do oběhového systému [51]. Buňky však musí být následně přitahovány pomocí atraktans do jiného místa, kde jsou schopny za specifických vlivů mikroprostředí vstoupit do programu diferenciaci [52]. Studie zabývající se takzvaným *homingem* MSC ukazují, že exprese chemokinových receptorů napomáhá MSC v pronikání do různých tkání, kostní dřeh nevyjímaje [53]. Z výsledků dřívějších studií vyplývalo, že MSC se mohou diferencovat pouze v buňky mezodermálního původu – adipocyty, chondrocyty nebo osteoblasty (Obr. 1). V současnosti se však na základě rozsáhlých studií biologie kmenových buněk toto dogma změnilo. Byla prokázána úspěšná diferenciaci MSC do širokého spektra buněk nejen mezodermálního původu – osteoblastů, chondrocytů, adipocytů, ale i do fibroblastů, myoblastů a

Obr. 1 *In vitro* diference MSC.



2.4 Vlastnosti nanovláken a jejich modifikace

Nanovlákná mohou být definována jako vlákna o průměru menším než 1000 nm. Nanovlákná se dají vyrobit několika způsoby – elektrostatickým zvlákňováním, zvlákňováním z tavenin, dále např. metodami *electroblowing* a *centrifuge spinning*. V současnosti existuje jediná průmyslově používaná metoda výroby nanovláken, a to je metoda elektrostatického zvlákňování, při které se používá roztok polymeru jako zdroje pro tvorbu nanovláken, a vysoké elektrické napětí. Mezi nejzajímavější vlastnosti nanovláken, která lze s výhodou využít v medicínské oblasti patří především:

- nízká hustota,
- velký specifický měrný povrch,
- malá velikost pórů – dobrá prodyšnost,
- vysoký objem pórů,
- vysoká porozita,
- výborné mechanické vlastnosti v poměru k hmotnosti,
- možnost aditivovat nanovláknenný materiál.

Kromě těchto obecných fyzikálně-chemických parametrů mají nanovlákná ještě jednu zásadní výhodu, která je předurčuje jako vynikající materiál pro medicínské aplikace: jejich rozměry jsou biomimetické a připomínají svými rozměry extracelulární hmotu.

Tyto vlastnosti předurčují nanovlákná pro využití ve dvou důležitých oblastech moderní medicíny: personalizované medicíně a theragnostice. *Vytvoření technologie produkce ultrasenzitivního detektoru plyných i kapalných stop na bázi funkcionalizovaných nanovláken na vyšší než laboratorní úrovni, čímž lze realizovat možnost široké aplikace nové technologie, by otevřelo unikátní cestu pro rychlou orientační detekci markerů závažných chorob v jejich*

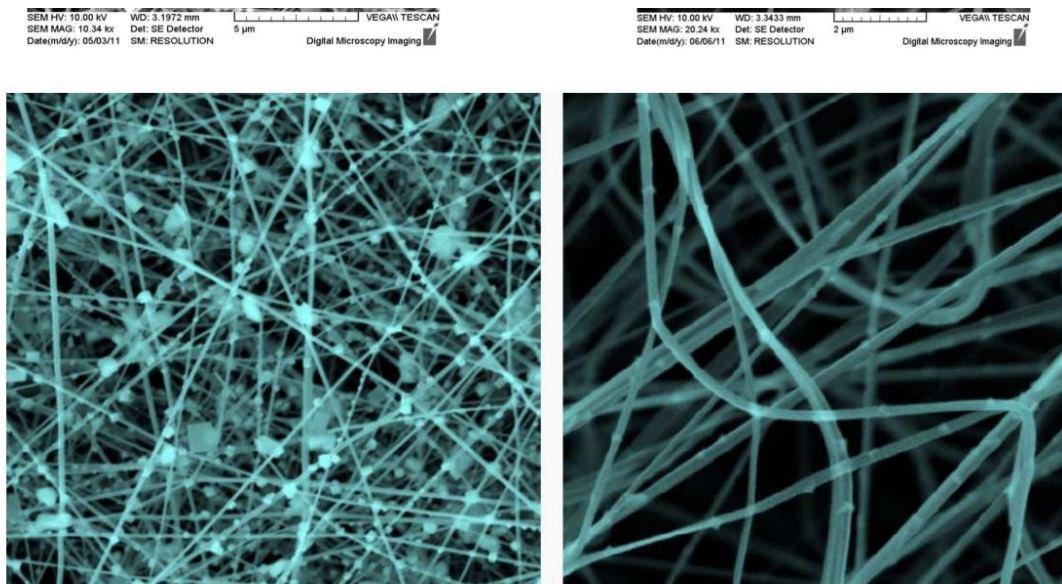
časné fázi a též orientační detekci markerů pro určení průběhu léčby a efektivity medikace přímo v ordinacích. Řešení tohoto problému spočívá využití nanovláken jako ultrasenzitivního detektoru v theragnostice.

Nanovláknna byla připravována také z chitosanu, který se přes své aminoskupiny váže na stěnu bakterií (Helander et al. 2001; Liu et al. 2004). Nanovláknna z polyakrylonitrilu (PAN) se považují za superhydrofobní materiál s kontaktním úhlem až 170° (Feng et al. 2002). Povrchové buňky jsou přirozeně hydrofobní a díky vysokému obsahu lipidů mají malou smáčivost.

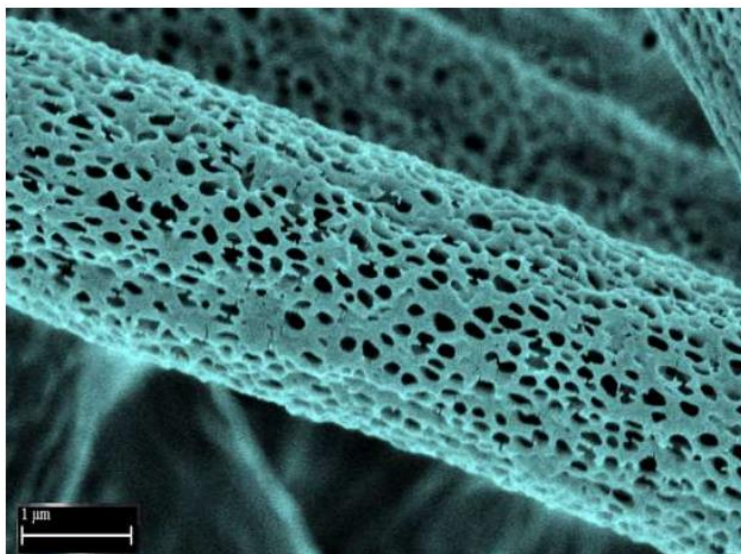
Pro časnou detekci nízkých koncentrací specifických markerů je nutné mít zařízení fungující jako velmi účinný filtr, a to s extrémně velkou plochou a další důležitou vlastností, možností modifikace nebo funkcionalizace nanovláknenné vrstvy s využitím různých chemických nebo fyzikálních procesů během výroby nebo po ní. Funkcionalizací lze podstatně zlepšit povrchové vlastnosti a získat tak například superhydrofobní (vodoodpudivé) nebo superhydrofilní (silně nasákavé) materiály, na které lze navázat specifické protilátky nebo miRNA.

K modifikaci biodegradabilních hydrogelů jsou nejčastěji používána nanovláknna z poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) nebo polyvinylalkoholu (PVA; Obr. 2, 3). PVA mají hydrofilní charakter, ve vodném prostředí zvětšují svůj objem a jsou ve vodě rozpustná. Jejich stabilitu lze zvýšit tzv. crosslinkem.

Obr. 2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) PCL and PVA



Obr. 3



PCL jsou naopak hydrofobní a vyznačují se dobrými mechanickými vlastnostmi.

2.5 Klíčová role nanovláken v theragnostice a personalizované medicíně

Personalizovanou medicínou rozumíme cílenou terapii s maximálním profitem a bezpečností pro konkrétního jednotlivého pacienta. Personalizovaná medicína se svým posláním zabezpečit časnou diagnózu, dobrým odhadem rizika terapie a její optimalizaci otevírá dveře ke zlepšení péče o pacienta s nižšími náklady. Funkcionalizovaná nanovlákná hrají v této moderní strategii klíčovou roli, neboť mohou být využita pro vytvoření systémů cílené a časově řízené léčby na buněčné úrovni. Rozšíření aplikace nanovláken je klíčovým milníkem pro personalizovanou medicínu a theragnostiku.

Pro účelné a reprodukovatelné dodávání bioaktivních látek je ale výhodné zvolit transportní systém, který bude možné použít pro transport přesně definovaného množství bioaktivní látky k cílové tkáni, kde se bioaktivní látka řízeným způsobem uvolní.

2.6 Řízené dodávání látek v theragnostice a personalizované medicíně

Řízené dodávání bioaktivních látek bylo definováno jako "*The technique and route by which an active pharmaceutical ingredient (API) is supplied to promote its desired pharmacological impact and/or convenience, and/or to reduce undesirable effects*" [48], což můžeme shrnout jako „vylepšení funkce medikace“. Systém řízeného dodávání je definován jako "*formulation or device that delivers an API in site-directed applications or delivers the API in a timely (i.e., immediate, delayed, or sustained) manner*". Systém samotný není

farmaceuticky aktivní, ale zlepšuje účinnost a/nebo bezpečnost dodávaných látek [49]. Systém řízeného dodávání slouží jako prostředník medikace pro pacienta, ať už dopravuje medikaci nebo zdravotnický prostředek, přičemž rozdíl mezi léčivem a prostředkem je dramatický [50]. V rámci našich experimentálních prací se podařilo vytvořit systém frakcionovaných nanovláken, který může být v kombinaci s vhodným gelovým nosičem použit jako specifický kompozitní disperzní **injikovatelný** systém s možností lokální imobilizace, řízeného cíleného dodávání tělními tekutinami či pro **mikrotvarování** cílové tkáně s variabilní buněčnou adhezí.

2.7 Transport látek v buňce

2.7.1 Pasivní transport

Pojem pasivního *targetingu* se využívá k ošetření určitého místa zájmu udržovacím léčivem nebo systémem s nosičem léčiva na základě fyzikálně-chemických nebo farmakologických parametrů. Přírodní a polymerní/pevné lipidové nanočástice, lipozomy, polymerní micely a dendrimery jsou koloidní nanonosiče, které interagují s buněčnými nosiči, jako jsou erytrocyty, sérový albumin a protilátky. Chemické parametry, jako jsou proléčiva, hydrofilní/hydrofobní struktura, pozitivní/negativní zeta potenciál a fyzikální faktory, jako je velikost, tvar a molekulová hmotnost, jsou důležité vlastnosti pasivního cílení [2].

Na rozdíl od aktivních cílených systémů, které obsahují specifický cílený ligand, vyžadují tyto typy systémů pro podávání léčiv dlouhou dobu setrvání v krvi, aby se do cílového místa dostalo dostatečné množství léčiva. Jev známý jako EPR efekt, který objevili Matsumura a Maeda, umožňuje akumulaci léčiv nebo nosičů léčiv. První fáze EPR efektu, zvýšená permeabilita, je charakterizována anomáliemi v krevním řečišti nádoru, které vedou ke zvýšené cévní propustnosti. Například v nádorové tkáni chybí nebo je nedostatečný odtok lymfy ve srovnání se zdravými tkáněmi, což vede k neúčinné lymfatické drenáži z nádorové tkáně. Toto způsobuje, že se v místě nádoru hromadí systémy pro podávání léčiv, což je stav známý jako zvýšená retence. Léčiva uvolněná z nosičů léčiv, které se nahromadily od jejich extravazace přes netěsné cévy, nádory, zánětlivé oblasti a infarkty, působí velmi dobře. Pasivní cílení bylo použito v jednom z výzkumů, ve kterém bylo zjištěno, že nanočástice chitosanu naložené paklitaxelem mají lepší biodistribuci než *Taxol*[®], se zvýšenou akumulací léčiva v játrech a slezině a nižšími koncentracemi léčiva v srdci a ledvinách. Bylo by tedy vhodnější nahradit termín "pasivní cílení" termínem "krevní oběh a extravazace", protože pasivní cílení má vysoké riziko neúmyslné orgánové akumulace [2].

Matsumura a Maeda prokázali, že makromolekuly o molekulové hmotnosti 15 000–70 000 g/mol se mohou snadno koncentrovat v nádorové tkáni. Z důvodu biokompatibility a "utajení" v krevním řečišti obsahuje většina pasivních cílených nanosystémů povrch potažený

PEG. Dalším předpokladem odvozeným z literatury je, že všechny částice mohou pasivně cílit na konkrétní místo (např. nádor) a že změna částic pomocí ligandů nezvyšuje počet částic, které dosáhnou cíle. Strategie proléčiva, při níž se neaktivní části po injekci přemění na aktivní formy, je chemickou metodou pasivního cílení. Mechanismem této přeměny jsou především enzymatické procesy, kterým je molekula vystavena. Při tomto enzymatickém procesu se neaktivní sloučeniny hromadí v místě onemocnění a přeměňují se na účinné aktivní sloučeniny s terapeutickým přínosem. Nejrozšířenější použití této strategie je u protinádorových léčiv s fyzikálně-chemickými nebo biologickými problémy. Tato metoda proléčiva dodává účinnou část pouze tam, kde je jí zapotřebí, a zabráňuje tak cytotoxicitě v nenádorových buňkách. Další dvě základní kritéria, která jsou užitečná pro cílení, jsou velikost částic a povrchové vlastnosti. Jedná se o vysoce manipulovatelné vlastnosti nanočástic pro změnu distribuce velikosti částic, zejména pro parenterální injekce. Z hlediska těchto proměnných lze polymerní nanočástice snadno upravit tak, aby po parenterální injekci poskytovaly pasivní cílení léčiva. Například nanonosiče musí mít průměr mezi 10 a 100 nanometry, aby se zabránilo filtraci ledvinami a zejména zachycení játry. Řízení molekulové hmotnosti kopolymerů umožňuje, aby polymerní nanočástice měly do značné míry monodisperzní distribuci velikosti částic. Například makromolekuly menší než 40000 Daltonů (přibližně 5 nm) jsou eliminovány filtračním systémem ledvin. Pro účinné zamezení eliminace ledvinami by měl být náboj systému pro podávání léčiv neutrální nebo aniontový [2]. Mezi takové systémy patří lipozomy.

2.7.2 Aktivní cílení léčiv

Nádorové mikroprostředí má jedinečnou strukturu, která ho odlišuje od zdravé tkáně. Nádorové prostředí získává abnormálně neuspořádanou cévní strukturu a obturovanou extravaskulární strukturu v důsledku neřízeného vývoje nádorových buněk a uvolňování angiogenních látek. Tyto strukturální nedostatky naopak přispívají jak k EPR efektu, tak jsou hlavním zdrojem nerovnoměrné akumulace a retence nanonosičů v nádorech. Aktivní cílení, známé také jako ligandem zprostředkované cílení, se snaží zajistit, aby nanonosiče navázané na ligand byly zadržovány a vychytávány buňkami onemocnění. Ligandy, které jsou specifické pro povrchové chemické látky nebo receptory, které jsou nadměrně exprimovány v poškozených orgánech, tkáních, buňkách nebo subcelulárních doménách, by měly být pečlivě vybrány pro zamýšlené použití. Aby bylo možné využít zvýšené afinity aktivně cíleného nosiče, musí být blízko svého cíle. Příkladem cílených ligandů jsou protilátky a jejich fragmenty, jiné proteiny, jako je transferin, peptidy, ligandy na bázi nukleových kyselin a drobné molekuly. Modifikace povrchu nanonosiče cílenou částí, která má mít afinitu k nádorovým buňkám, a to buď prostřednictvím fyzikální adsorpce, nebo rozsáhlejší kovalentní vazby, je jednou ze základních vlastností systémů cíleného podávání léčiv. Studie *in vitro* a *in vivo* v oblasti

cíleného podávání léčiv ukázaly, že zařazení cílených ligandů zlepšuje terapeutickou účinnost účinné látky ve srovnání s kontrolními systémy bez nich. Specifičnost cílení a kapacita podávání mohou ovlivnit úspěšnost aktivních cílených NP. Specifičnost cílení je dána biodistribucí ligandem funkcionalizovaných NP, zatímco doručovací kapacita je dána materiálem a strukturou NP. Jak již bylo uvedeno, cílené ligandy nejsou schopny poskytnout NP, pokud se nacházejí v blízkosti svého cíle. Aktivně cílené NP využívají k akumulaci v místech nádoru EPR efekt. Do strategie aktivního cílení by kromě cílených ligandů mělo být zahrnuto i prodloužení doby pobytu NP v krvi. V opačném případě budou NP rychle odstraněny z krevního oběhu dříve, než dosáhnou zamýšleného cíle.

Za základní principy aktivního cílení byly označeny techniky konjugace/připojení ligandu, architektura aktivně cílených NP, včetně hustoty ligandu, velikost a tvar NP, náboj povrchu a ligandu a hydrofobicita povrchu [2].

2.8 Lipozomy jako sekundární nosič pro enkapsulaci do nanovláken

Lipozomy byly objeveny na počátku šedesátých let. Lipozomy jsou sférické vezikuly na bázi lipidů, které představují novou platformu pro doručování léčiv do cílových buněk různými způsoby. *Bangham et al.* poprvé informovali o lipozomech v roce 1964 [12].

Lipozomy jsou od té doby předmětem mnoha výzkumů, jejichž hlavním cílem je zlepšit enkapsulaci, stabilitu, dobu cirkulace a specifické podávání léčiv. Lipozomy se v posledních dvou desetiletích staly jedním z nejvíce zkoumaných nových systémů pro podávání léčiv. V lékařském výzkumu lipozomy změnily léčbu rakoviny, genovou terapii, vakcíny, antimikrobiální látky a diagnostické látky. Ukázalo se, že jsou účinnými nosiči citlivých léčiv i makromolekul [13]. Dlouhodobě cirkulující neboli *stealth* lipozomy byly vytvořeny potažením povrchu lipozomu hydrofilními polymery, jako je polyetylglykol, který inhibuje vychytávání lipozomu retikuloendoteliálním systémem [14] a minimalizuje toxicitu zapouzdřených léčiv [15].

Tyto nanostruktury jsou tvořeny lipidovou dvojvrstvou a napodobují strukturu živočišné buňky. Tato lipidová dvojvrstva také umožňuje transport hydrofilních a hydrofobních molekul. A právě tyto vlastnosti přivedly lipozomy do oblasti systémů pro podávání léčiv [1].

Při tradiční léčbě jsou léčivé látky dodávány rovnoměrně do celého těla prostřednictvím regionálního průtoku krve. Aby se lék dostal do postižené oblasti, musí projít různými biologickými bariérami na úrovni orgánů, tkání nebo jednotlivých buněk. Během transportu léčiv však může dojít k jejich inaktivaci nebo k nežádoucím účinkům. Použitím vhodných nosičů léčiv lze tyto nežádoucí účinky potlačit, a tím zvýšit účinnost léčby [2]. Za tímto účelem byla vytvořena celá řada nosičů v nanorozměrech [3-5]. Lipozomální nosiče však mají oproti

ostatním jednu významnou výhodu. Jejich struktura sestává z lipidů, které se nacházejí i v buněčné membráně. A takové složení zajišťuje vysokou biokompatibilitu a ochranu transportovaných léčiv [1, 6, 7].

Za účelem zlepšení vlastností a použitelnosti lipozomů byla rozsáhle studována modifikace jejich povrchu. Povrchová modifikace zlepšuje zejména účinnost doručení léčiva do místa působení při *in vivo* aplikacích. Například funkcionalizace povlaku lipozomů polyethylenglykolem (PEG) nebo polyvinylalkoholem (PVA) snižuje opsonizaci, a tím se tyto lipozomy stávají méně náchylné k jaterní *clearance*, což vede k delšímu setrvání v systémovém oběhu [8, 9]. Dále byla zvýšená lokalizační selektivita lipozomů, navržena například vytvořením glycyrrhetinových lipozomů s naloženou oxaliplatinou pro cílenou distribuci léčiva do jater [1]. Kromě těchto modifikací existuje snaha kombinovat lipozomy s dalšími nanomateriály. Jedním ze zajímavých nanomateriálů, které by mohly být pro takovou kombinaci využity, jsou nanovlákná. Tenká jemná vlákna o průměru v řádu nanometrů jsou uspořádána v porézní struktuře, která je vhodná pro funkcionalizaci a modifikaci různými nanočásticemi. Kromě potenciálně snadné a výhodné enkapsulace lipozomů do struktury nanovláken je tato kombinace zajímavá také z hlediska zvýšení stability a účinnosti zavedeného systému pro podávání léčiv [10, 11].

Hlavními výhodami systémových lipozomů jako lékových forem jsou biologická rozložitelnost, nižší systémová toxicita, cílené podávání, ochrana citlivých molekul a lepší farmakokinetika. Jejich výhody pro lokální aplikaci naopak vyplývají z prokázané schopnosti omezit závažné inkompatibility a nežádoucí účinky, které mohou být důsledkem nepříjemně velké systémové absorpce léčiv, a také z výrazného zvýšení akumulace léčiv v požadovaném místě účinku díky vysoké podobnosti mezi složením lipozomů a biologickými membránami [16].

2.9 Složení lipozomů

Glycerofosfolipidy a sfingomyeliny jsou dva typy fosfolipidů, které tvoří většinu obalu lipozomů. Glycerofosfolipidy, jejichž páteří je glycerol, tvoří většinu fosfolipidů v eukaryotických buňkách. Chemickou strukturu glycerofosfolipidů tvoří hydrofilní hlavová skupina a hydrofobní postranní řetězec. Fosfatidylcholin (PC), fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylserin (PS), fosfatidylinositol (PI), kyselina fosfatidová (PA), fosfatidylglycerol (PG) a kardiolipin jsou jen některé z glycerofosfolipidů, které mohou vznikat v důsledku modifikace hlavové skupiny (CL) [17, 18]. Lipozomy lze použít k enkapsulaci, distribuci a uvolňování látek rozpustných v lipidech a amfifilních látek, léčiv a biologických molekul, jako jsou peptidy nebo geny, protože ve své struktuře obsahují jak hydratovanou, tak lipidovou fázi. Lipozomy

mají díky svým jedinečným vlastnostem různé potenciální aplikace v potravinářství, v současných systémech podávání léků a genové terapii [19].

2.10 Specifický ultrasenzitivní detektor na bázi funkcionalizovaných nanovláken

Biosenzor je zařízení s biologickým nebo organickým selektivně citlivým receptorem, které reaguje na fyzikální nebo chemický podnět z okolí. Pro aplikaci biosenzorů v praxi je kritické rozhraní mezi povrchem senzoru a analyzovaným prostředím, sestávajícím z biologického nebo organického rozpoznávacího elementu (bioreceptoru), které je následně připojeno k elektronickému zesilovači signálu. Stabilní integrace bioreceptoru na pevný povrch je nejdůležitějším krokem při vytvoření biosenzorů použitelných v praxi. Rozpoznání signální molekuly povrchem biosenzoru je klíčové pro detekci pomocí biosenzorů. Bioreceptor na povrchu biosenzoru by měl disponovat vysokou specifíčností a afinitou k cílové signální molekule. Imobilizace bioreceptorů na povrchu biosenzoru pomocí nanovláken redukuje difúzní limity a zlepšuje citlivost. V důsledku velkého specifického povrchu a velké povrchové volné energie mohou nanovláknata zásadním způsobem zvětšit hustotu imobilizovaných bioreceptorů na povrchu biosenzorů a zlepšit jejich stabilitu. V posledních letech byly použity pro imobilizaci bioreceptorů různé vodivé polymery (polyanilin, polypyrrol), polymery z biologických materiálů (chitosan, polykatecholy), elektrovlákněné polymery (např. polyakrylnitril, polystyren) a polykationové polymery (polyetylénilin). Polymery z biologických materiálů poskytují nové kombinace různých vlastností pro biosenzorové aplikace

2.11 Detekce extrémně nízkých koncentrací v plynném prostředí

Vyvinutá modifikovaná nanovláknata s navázaným avidinem mohou být použita pro testování hraničních možností detekce. Vysoké detekční citlivosti a selektivity se dosahuje po reakci těchto modifikovaných nanovláken s příslušnými biotinylovanými protilátkami, dané metody pro široké použití. Ve druhém kroku by byl vytvářen a testován technologický postup tak, aby bylo možné v konečné fázi realizovat produkt pro větší než laboratorní aplikaci, tedy aby bylo možné jej použít pro širší použití. Ve třetím kroku by byl vytvářen biosenzor na bázi elektrického čipu k rychlému využití v terénních aplikacích.

3. VÝSLEDKY

Práce se opírá o výsledky pěti manuskriptů publikovaných v impaktovaných časopisech. Jedná se o:

- a. Beznoska J., Uhlík J., Kestlerová A., Královič M., Divín R., Fedačko J., Beneš J., Beneš M., Vocetková K., Sovková V., Nečas A., Nečasová A., Holešovský J., Amler E. PVA and PCL nanofibers are suitable for tissue covering and regeneration. *Physiol Res* 2019; 68 (Suppl 4): S501–S508, doi: 10.33549/physiolres.934389.
- b. Filová E., Tonar Z., Lukášová V., Buzgo M., Litvinec A., Rampichová M., Beznoska J., Plencner M., Staffa A., Daňková J., Sural M., Chvojka J., Malečková A., Králíčková M., Amler E. Hydrogel containing anti-CD44-labeled microparticles, guide bone tissue formation in osteochondral defects in rabbits. *Nanomaterials (Basel)* 2020; 10 (8): 1504, doi: 10.3390/nano10081504.
- c. Filová E., Jakubcová B., Danilová I., Kuželová Košťáková E., Jarošíková T., Chernyavskiy O., Hejda J., Handl M., Beznoska J., Nečas A., Rosina J., Amler E. Polycaprolactone foam functionalized with chitosan microparticles – a suitable scaffold for cartilage regeneration. *Physiol Res* 2016; 65 (1): 121–31, doi: 10.33549/physiolres.932998.
- d. Filová E., Tonar Z., Lukasova V., Buzgo M., Litvinec A., Rampichova M. Beznoska J. et al. The control of osteochondral reneeration in rabbits using type I collagen/fibrin scaffold enriched with thrombocytes and chitosan/poly-e-caprolacton microparticles. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2014; 8:79–79.
- e. Bellu E., Garroni G., Cruciani S., Balzano F., Serra D., Satta R., Montesu M. A., Fadda A., Mulas M., Sarais G., Bandiera P., Torreggiani E., Martini F., Tognon M., Ventura C., Beznoska J., Amler E., Maioli M. Smart nanofibers with natural extracts prevent senescence patterning in a dynamic cell culture model of human skin. *Cells* 2020; 9 (12): 2530, doi: 10.3390/cells9122530.

3.1 PVA and PCL nanofibers are suitable for tissue covering and regeneration

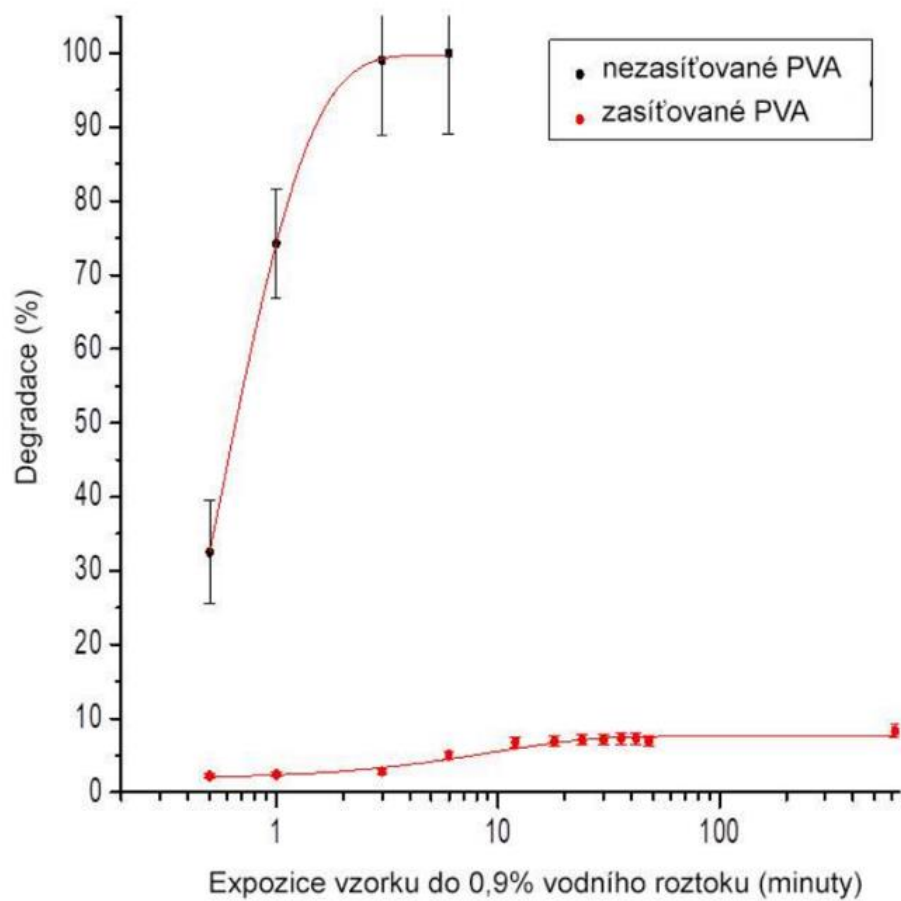
Tuto práci lze pokládat za jednu ze stěžejních. Cílem této práce bylo vytvoření časově regulovatelných systémů dodávání léčiv a dalších bioaktivních látek a verifikování *in vitro* experimenty a vyhodnocení *in vivo* biokompatibility a účinnosti nanovlákných systémů na bázi polyvinylalkoholu (PVA) a poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) pro theragnostické aplikace.

Jako modelový systém byly vybrány fibroblasty. Nejjednodušší zdroj fibroblastů poskytují kožní tkáně, proto byly experimenty orientovány na tento tkáňový model. V rámci této studie byly PVA a PCL nanovlákné membrány testovány na různou variaci jejich fyzikálně-chemických vlastností a způsobu výroby. V počátku jsme se soustředili na přípravu nanovlákných membrán, jejichž poločas rozpadu je regulovatelný. Obrázek 4 identifikuje horní a spodní limit poločasu rozpadu. Je zřejmé, že poločas rozpadu je možné regulovat v oblasti několika sekund do hodnot řádu dnů až týdnů.

V další části byly vytvořeny umělé defekty velikosti 4×4 cm (celkem 9) na modelu velkého zvířete (miniprase). Testovaný materiál byl aplikován společně s Jelonet parafinovou gázou a suturován v rozích defektu. Denní monitorování regeneračního procesu trvalo po dobu 27 dní. Hodnocení tkáňové regenerace bylo realizováno ve dnech 5, 12, a 27. Regenerační proces byl vizuálně hodnocen a současně byla realizována biopsie. Standardní patologické vyšetření bylo uskutečněno po skončení experimentu.

Z výsledků práce vyplynulo, že oba nanovlákné nosiče byly dobře tolerovány. Současně závěry experimentu potvrdily, že je možné pokročit k vytvoření inteligentních nanovlákných membrán pro theragnostické aplikace a k přípravě specifických protilátek a jejich navázání pro cílené dodávání bioaktivních látek, včetně enkapsulace krevních derivátů a antibiotik.

Obr. 5 Hranice poločasu rozpadu



3.2 Hydrogel containing anti-CD44-labeled microparticles, guide bone tissue formation in osteochondral defects in rabbits

Tento manuskript představuje další z klíčových prací. Cílem bylo vytvoření systému frakcionovaných nanovláken, verifikování injikovatelności gelového systému funkcionalizovaného frakcionovanými nanovláknými, optimalizace polymeru pro povrchovou funkcionalizaci, vytvoření systému cíleného (adresného) dodávání bioaktivních látek a verifikování efektivity materiálu *in vivo*. Cílovou tkání regenerace byla především kostní tkáň.

Vzhledem k tomu, že se jednalo o regeneraci trojrozměrného defektu, eliminovali jsme nedostatek pseudo dvourozměrné nanovlákněné membrány aplikací hydrogelu funkcionalizovaného nanovláknými mikropartikulemi.

Hydrogely jsou vhodné pro regeneraci osteochondrálních defektů, neboť mimikují řadu vlastností osteochondrální tkáně. Nedostatkem hydrogelů jsou ale jejich nevhodné biomechanické parametry, které nejsou odpovídající pro dostatečnou disipaci energie pocházející z tlakového zatěžování, navíc bez signifikantních deformací. K minimalizaci těchto nevýhod hydrogelů byla připravena kompozitní nanovlákná na bázi poly- ϵ -kaprolakton-chitosanu (PCL-chit) a polyetylenoxid-chitosanu (PEO-chit). FTIR analýza potvrdila úspěšné vytvoření směsi. Následně byla testována biokompatibilita nosičů na bázi PCL-chit a PEO-chit pro adhezi a proliferaci fibrochondrocytů a chondrocytů. Byla potvrzena vynikající metabolická aktivita buněk na obou druzích nosičů. Následně byly PCL-chit nanovlákná frakcionována na mikropartikule (střední velikosti 500 μm), která byla povrchově funkcionalizována polyetylen glykol-biotinem pro umožnění vazby anti-CD44 protilátky pro interakci s hyaluronovou kyselinou (PCL-chit-PEGb-antiCD44). Tento funkcionalizovaný systém byl použit do hydrogelu ke zlepšení jeho biomechanických i funkčních parametrů. Bylo dosaženo uspokojivého výsledku, a proto byl kompozitní gel dále testován *in vivo* na modelových osteochondrálních defektech králíka. Mohli jsme uzavřít, že komplex PCL-chit-PEGb-antiCD44 signifikantně zvýšil osteogenní regeneraci především desmogenní osifikací, ale též sníženou chondrogenní diferenciací defektů.

3.3 Polycaprolactone foam functionalized with chitosan microparticles – a suitable scaffold for cartilage regeneration.

Tento manuskript je další z klíčových prací, tentokrát zaměřený na chrupavku a pěnu jako variantu nosného materiálu pro frakcionovaná nanovlákná v injikovatelné formě. Cílem práce bylo otestovat osteoregenerační vlastnost chitosanových a PAN nanovláken, otestovat chitosanová nanovlákná na jejich specifickou interakci s buněčnými stěnami, vytvořit systém frakcionovaných nanovláken v pěnovém nosiči, verifikovat injikovatelnost pěnového systému funkcionalizovaného frakcionovanými nanovlákná, optimalizovat polymer pro povrchovou funkcionalizaci a připravit technologický postup přípravy kompozitního nosiče, verifikovat efektivitu materiálu *in vivo*, otestovat produkci nanovláken pro větší než laboratorní aplikace a otevřít cestu pro přípravu theragnostických materiálů na bázi funkcionalizovaných nanovláken.

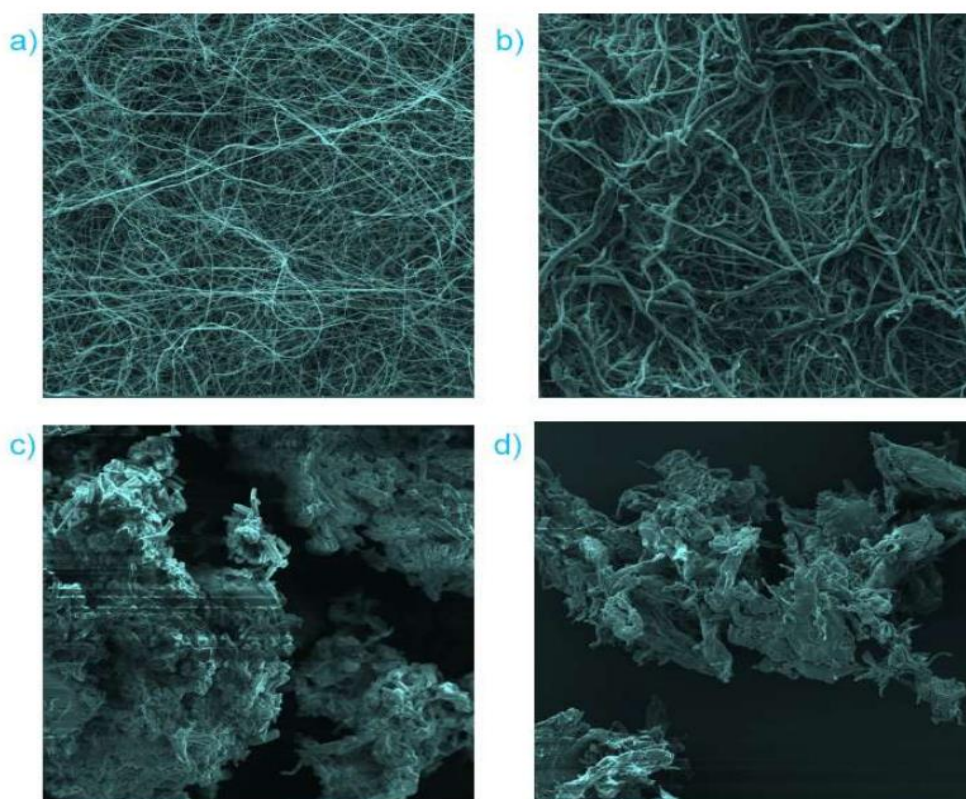
V rámci tohoto experimentu byla připravena nanovlákná z několika polymerů. Nanovlákná z polyakrylonitrilu byla uvažována primárně, neboť se považují za superhydrofobní materiál s kontaktním úhlem až 170° (Feng *et al.* 2002). PAN nanovlákná mají vysoký potenciál pro interakci s buňkami. Povrchové tělní buňky jsou totiž přirozeně hydrofobní. Prokázalo se však, že vyšší potenciál má chitosan, který se přes své aminoskupiny váže na stěnu bakterií (Helander *et al.* 2001; Liu *et al.* 2004), v kompozitní formě s poly- ϵ -kaprolaktonem (PCL). Pro regeneraci chrupavčité tkáně je potřeba vysoce porézní nosič, který umožňuje proliferaci chondrocytů, diferenciaci kmenových buněk, a přitom je charakterizován odpovídajícími biomechanickými parametry. Vhodné polymery pro tento účel byly testovány se zaměřením na chitosan, který byl vybrán jako kandidát pro optimalizaci biomechanických parametrů nanovláknenného nosiče. Ukázalo se, že optimálním řešením je kompozitní nosič na pěnovém základu.

Byl vyvinut pěnový nosič na bázi PCL s inkorporovanými chitosanovými mikroparticulami. Technologie přípravy byla vypracována a optimalizována: Konstrukce (*scaffold*) byly připraveny technikou loužení soli z 10% nebo 15% hmotnostního roztoku PCL obsahující 0, 10 a 20% hmotnostní zlomek mikročástic chitosanu, přičemž ve všech případech bylo použito stejné množství a velikost NaCl jako porogenu. Během experimentu v délce trvání 22 dnů byl prokázán vyšší obsah DNA u konstrukcí bez chitosanu nebo s nízkým obsahem chitosanu (0 a 10% hmotnostní zlomek) v porovnání s konstrukcí s vysokým obsahem chitosanu. Roztok PCL s 10% hmotnostním zlomkem s 10% a 20% hmotnostním zlomkem chitosanu prokázal signifikantně zvýšené viskoelastické vlastnosti v porovnání s konstrukcí s PCL s 15% hmotnostním zlomkem s 0% a 10% hmotnostním zlomkem chitosanu. Z experimentů vyplývá, že konstrukce s 10% hmotnostním zlomkem PCL s 0% a

10% hmotnostním zlomkem chitosanu představují potenciální konstrukci pro regeneraci chrupavky.

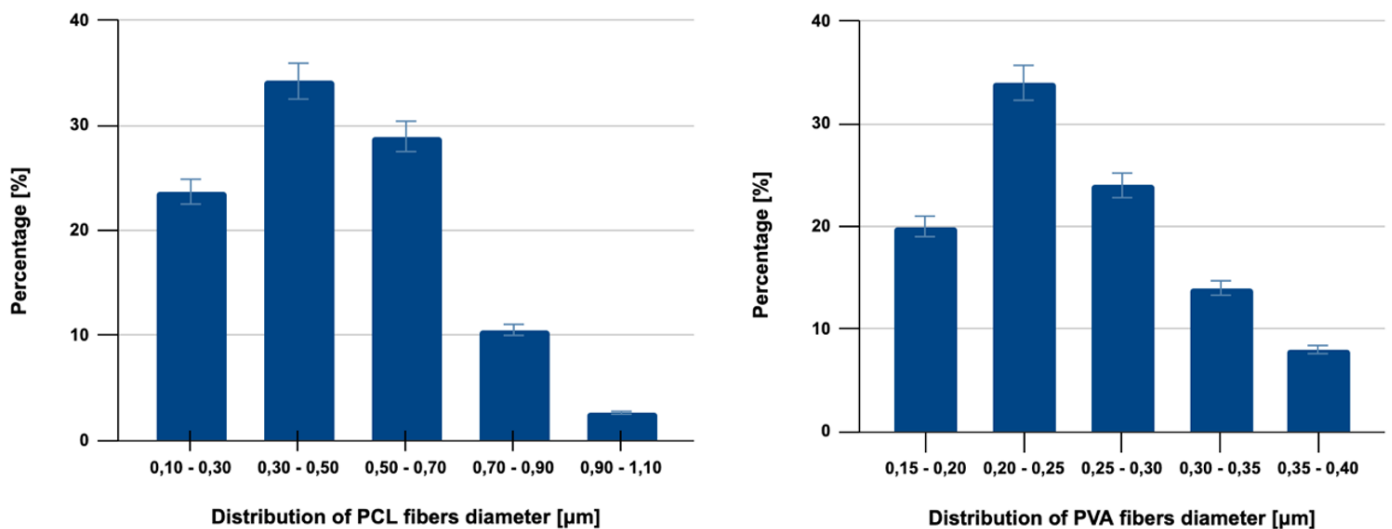
Nanovlákná z PVA a PCL byla opět připravena technologií elektrospinningu a jejich struktura vizualizována metodou *scanning electron microscopy* (SEM, viz obr. 5 níže), která prokázala jasně vláknennou strukturu.

Obr. 6: SEM nanovláken. a) SEM celého PVA, b) PCL, c) základní vlákno PVA, d) základní vlákno PCL Zvětšení 2000x.



SEM analýza byla provedena vždy na nejméně 50 různých filamentech, u kterých byl měřen specializovaným TESCAN softwarem průměr a data statisticky zpracována vždy ve formě, kterou dokumentuje Obr. 7 níže.

Obr. 7 Rozložení průměru jednotlivých nanovláken



Prokázali jsme, že systém frakcionovaných nanovláken v pěnovém nosiči je vhodný pro řešení 3D osteochondrálních lézí. Systém lze použít jako disperzi k injekční aplikaci, čímž jsme udělali další krok pro přípravu theragnostických materiálů na bázi funkcionalizovaných nanovláken.

3.4 The control of osteochondral regeneration in rabbits using type I collagen/fibrin scaffold enriched with thrombocytes and chitosan/poly-ε-caprolactone microparticles

Tento manuskript představuje další z klíčových prací, tentokrát zaměřený na *in vivo* regeneraci osteochondrálních defektů s využitím gelu funkcionalizovaného mikropartikulemi na bázi nanovláken s enkapsulovanými bioaktivními látkami.

Cílem práce bylo otestovat osteoregenerační vlastnost kompozitních chitosan/PCL nanovláken funkcionalizovaných trombocytárními deriváty, prokázat funkčnost systému enkapsulovaných bioaktivních látek ve frakcionovaných nanovláčkách, optimalizovat formu a koncentraci krevních derivátů pro přípravu funkčního systému stimulujícího regeneraci osteochondrálních defektů, verifikovat efektivitu materiálu *in vivo* a otevřít cestu pro přípravu materiálů na bázi frakcionovaných nanovláken s krevními deriváty.

V rámci tohoto experimentu byla připravena nanovláčka z několika polymerů. Nanovláčkové sítě připravené, jak bylo popsáno výše, představují dvourozměrné materiály z důvodu jejich minimální tloušťky. To je stěžejní pro vyplnění velkých trojrozměrných lézí. K vyřešení této překážky jsme připravili nanovláčkové materiály vhodné pro disperzi v kapalinách nebo gelech. Nanovláčková síť byla nejprve frakcionována na mikročástice při teplotě pod tranzicí do gelové fáze. Následně byla smíchána s vhodným gelem. Takovýto trojrozměrný systém zachoval všechny výhody nanovláken, protože frakcionalizace při teplotách kapalného dusíku poskytla jemný prášek se zachovanou vnitřní strukturou nanovláken.

V práci byly srovnávány polymery a jejich složení vhodné pro proliferaci osteochondrálních buněk. Bylo zjištěno, že maturace gelů patří mezi klíčové parametry pro optimalizaci biomechanických parametrů implantátu. Nejdříve byly vybrány agarozové gely jako potenciální implantátový trojrozměrný nosič frakcionovaných nanovláčkových systémů.

Porovnávali jsme dva čerstvě připravené vzorky, agar a agarózu, s maturovanými vzorky uchovávanými po dobu jednoho týdne o teplotě 5 °C a vlhkosti 100 %. Následně byla změřena relativní deformace ϵ při teplotách mezi 31–45 °C. Ve vzorku agaru byla identifikována fáze tranzice mezi teplotami 30–37 °C (Obr. 7), což indikuje, že daný materiál je příliš měkký pro implantaci v rámci teploty lidského těla. Nicméně, agarózový gel prokázal lepší vlastnosti a signifikantně širší fázi tranzice, což jej upřednostňuje pro klinickou aplikaci. Je zřejmé, že tento postupný přechod činí implantát stabilnější v případě kolísání teploty kolem 37 °C. Navíc, jsme zjistili, že týdenní maturace při teplotě 5 °C vyústila v další rozšíření fáze tranzice (Tab. 4), což činí umělé implantát ještě více biomimetickým. Maturaci tedy

můžeme aplikovat jako metodu kontroly biomechanických parametrů.

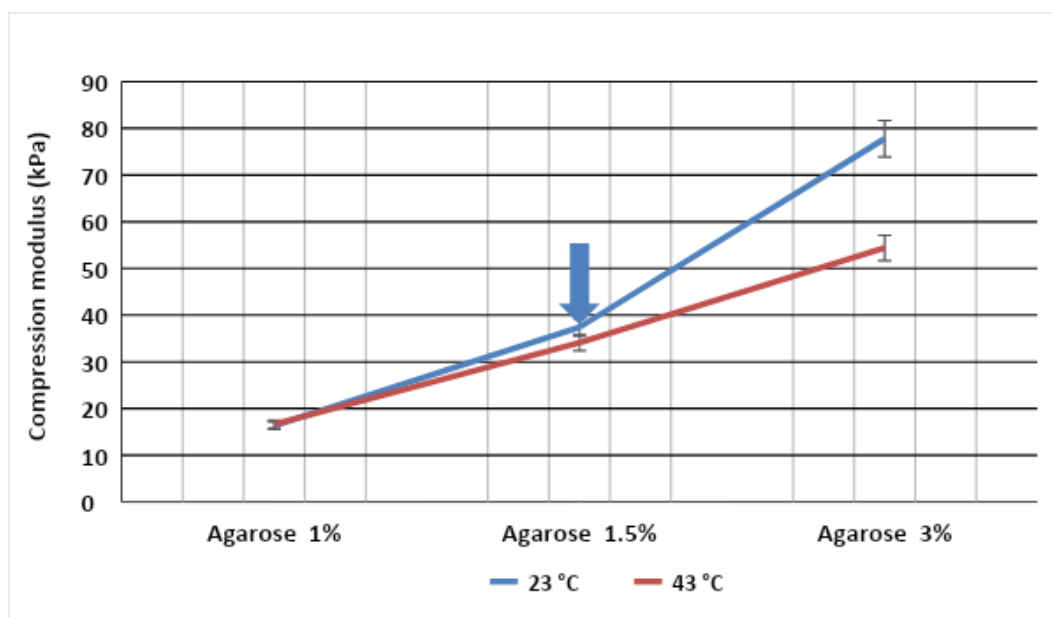
Tab. 4 Závislost relativní deformace na zrání gelu

Kompozice gelu zahřátá na teplotu 37 °C	$\varepsilon = \Delta l/l$ (%)
Agaróza 1,5 % zralá	14 ± 1
Agaróza 1,5 % čerstvá	18 ± 2
Agar-Agar 1,5%	24 ± 2

Struktura implantátu by měla vydržet alespoň tlak vyvinutý při aplikaci během laparoskopické chirurgie. Byla tedy vytvořena sada gelů odolávajících doporučenému tlaku a jejich biomimetické parametry byly vyhodnoceny chirurgy. Na základě zkušeností chirurgů byl gel s Youngovým modulem pružnosti pro 1,5% agarózu identifikován jako nejvíce biomimetický, makroskopicky připomínající nativní tkáň indikovanou modrou šipkou na obr. 8.

Biomechanické vlastnosti gelu patří bezesporu mezi klíčové parametry optimálního implantátu. Vliv frakcionovaných nanovláken na rigiditu gelu byl považován za potenciálně významný, a proto byl pečlivě zkoumán. Je zřejmé, že jejich přítomnost signifikantně ovlivnila Youngův modulus elasticity již při velmi nízkých koncentracích. Nanovlákná z PVA ovlivňují modulus elasticity gelů více než nanovlákná z PCL. Oba typy nanovláken však dramaticky zvyšují Youngův modulus elasticity již při koncentraci kolem 1,5 %. Jejich efekt byl nicméně jasně pozorován už při desetinásobně nižším měřítku, tedy již kolem 1,5 ‰ frakcionovaných gelů.

Obr. 8 Závislost Youngova modulu pružnosti na koncentraci agarózy



3.5 Efekt frakcionovaných nanovláken na Youngův modul pružnosti

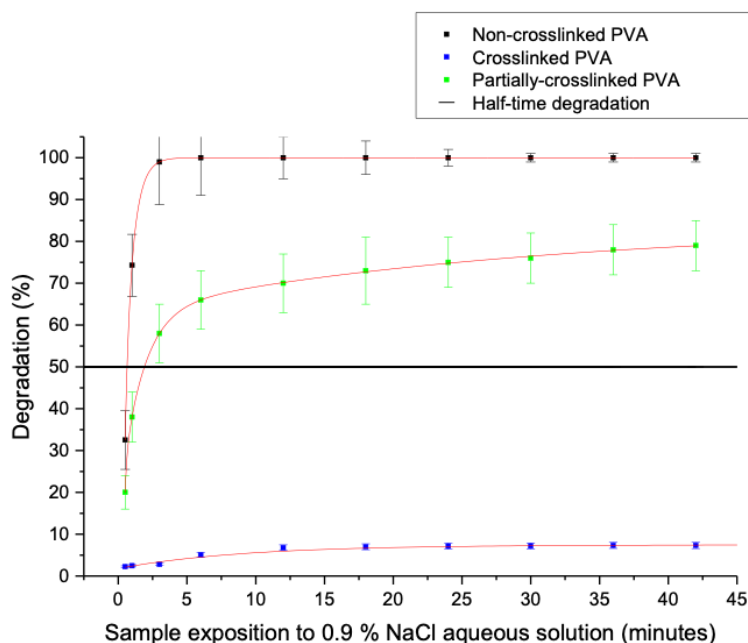
V rámci vývoje nové generace chytrých *scaffolds* s modifikovanými biochemickými a chemickými vlastnostmi byla provedena funkcionalizace gelu frakcionovanými nanovláknami. V první řadě jsme testovali vliv frakcionovaných nanovláken na strukturální vlastnosti gelu. Optimálním popisem biomechanických vlastností je diagram napětí-deformace odrážející vlastnosti v širokém rozsahu aplikovaného stresu. Stanovili jsme diagram napětí-deformace pro agarózový gel obohacený nanovláknami PCL nebo PVA. Prokázali jsme, že přidání obou typů nanovláken významně modifikuje diagram napětí-deformace s hlouběji vyjádřeným efektem PVA. Testy byly provedeny v rámci determinace maximální hmotnostní kapacity gelů. Z grafu je patrné, že příměs nanovláken významně ovlivňuje pevnost kluzu a relativní elongaci. Oproti agaróze, která je zničena při tlaku 6 mmHg, PVA nanovláknami zvyšují pevnost kluzu o přibližně 80 % a umožňují použití operačního tlaku až 10 mmHg. V případě PCL nebylo zvýšení tak významné (50 %), což koresponduje s destruktivním tlakem kolem 8 mmHg. Ruku v ruce se zvýšením pevnosti kluzu nanovláknami také umožňují větší relativní kompresi/elongaci materiálu z 0,29 na 0,37, což představuje zvýšení asi o 25 %.

3.6 Frakcionovaná nanovlákná slouží jako systém pro kontrolované podávání léků

V první řadě bylo zjištěno, že frakcionovaná nanovlákná jsou esenciální pro rigidifikaci gelu. Kromě toho by však funkcionalizace gelu pomocí degradabilních nanovláken mohla také otevřít dveře k vývoji gelů s kontrolovaným uvolňováním enkapsulovaných bioaktivních substancí. Byl tedy zkoumán efekt nanovláken s kontrolovanou degradací, přičemž nanovlákná PVA sloužila jako modelový systém. PVA nanovlákná jsou však jako hydrofilní substance snadno rozložitelná ve vodním prostředí. Nicméně kontrolovaný crosslinking může prodloužit jejich poločas rozkladu ve vodě.

PVA nanovlákná byla produkována z polymerů s různým stupněm crosslinkingu a jejich degradace byla měřena v destilované deionizované vodě za teploty 36 °C na vibrační vyhřívané plošině s vibrační frekvencí 51 Hz. Jako determinující marker poločasu degradace byla použita sloučenina fluorescein-isothiokyanát-dextran. Podle naměřených dat jasně vyplývá, že crosslinking může signifikantně prodloužit poločas rozpadu (Obr. 8). Zatímco vlákna PVA byla charakterizována poločasem degradace kratším než minutu, crosslinking prodloužit tento poločas o několik řádů (Obr. 8). Vzorok PVA bez crosslinkingu byly kompletně rozpuštěny v 0,9% roztoku NaCl během 6 minut. Na druhou stranu v tomto roztoku bylo rozpuštěno pouze 8 % hmotnosti vzorku s crosslink modifikací během 12 hodin.

Obr. 9 Degradace zesíťovaných nanovláken PVA a nezesíťovaných nanovláken PVA.



3.7 Smart nanofibers with natural extracts prevent senescence patterning in a dynamic cell culture model of human skin

Tento manuskript byl zaměřený na verifikaci systému řízeného dodávání buněk *in vivo*. Experiment byl pro simplifikaci observace aplikován topikálně a zaměřen na regeneraci kožních defektů s využitím vyvinutého nanovláčenného materiálu s enkapsulovanými bioaktivními látkami.

Cílem experimentální práce bylo prokázat funkčnost systému enkapsulovaných bioaktivních látek ve frakcionovaných nanovláčcích, verifikovat efektivitu materiálu *in vivo* a otevřít cestu pro přípravu materiálů na bázi frakcionovaných nanovláček pro kosmetické a medicínské aplikace.

Přirodní kosmetické produkty se v poslední době znovu objevily jako nový nástroj schopný působit proti stárnutí a poškození souvisejícím s kůží. Nedávno dosažený pokrok v nanomedicíně navíc otevírá přístup vycházející z kombinace moderní nanotechnologie s tradiční léčbou pro inovativní farmakoterapeutika. V recentně publikované studii jsme zkoumali protistárnoucí efekt předlččení přírodním extraktem s *Myrtus communis* v kombinaci s konstrukcí (*scaffoldem*) z polykaprolaktonových nanovláček (NanoPCL-M) na populaci kožních buněk vystavených UV záření. Vytvořili jsme nový model kůže na bioreaktoru mimikujícím *crosstalk* mezi keratinocyty, kmenovými buňkami a fibroblasty, obdobně jako v kůži. Pomocí testu beta-galaktosidázy indikujícího množství senescentních buněk a testu viability jsme objevili, že fibroblasty a kmenové buňky předlččené NanoPCL-M a poté vystavené UV záření jsou superponovatelné ke kontrolním buňkám, které nebyly léčeny a vystaveny UV záření. Na druhou stranu buňky vystavené pouze UV záření bez předlččení NanoPCL-M vykazovaly signifikantně vyšší výtěžnost senescentních elementů. Trojrozměrné struktury založené na keratinocytech se po působení UV záření jeví jako nespojené v porovnání se vzorky předlččenými NanoPCL-M. Provedena analýza genové exprese na rozdílných genech asociovaných se senescencí prokázala aktivaci molekulárního programu rejuvenace u kmenových buněk předlččených NanoPCL-M a následně vystavených UV záření. Naše výsledky tak celkově zdůrazňují budoucí translační aplikaci NanoPCL-M v rámci prevence stárnutí kůže.

Vhodnou kombinací těchto tří typů nanovláček bude vyvíjen univerzální senzor pro specifickou vazbu eukaryotních i prokaryotních buněk. Zachycené vzorky budou zpracovávány k detekci signálu.

3.8 Příprava a charakterizace frakcionalizovaných nanovláken

Byly testovány dva typy nanovláken, a to jmenovitě PCL (polykaprolakton) a PVA (polyvinylalkohol). První z nich, nanovlákně PCL, je založeno na monomeru kaprolaktonu, cyklickém esteru se sedmičlenným kruhem, který je mísitelný, ale těžko rozpustný ve vodě. Tato vlastnost ho předurčuje k biologické a medicínské aplikaci jako materiálu s dlouhou dobou degradací ve vodném prostředí, mezi které patří i lidské tělo. Další z nanovláken, polyvinylalkohol (PVA), představuje ve vodě rozpustný polymer. Polyvinalkohol je používán v různých medicínských aplikacích kvůli své biokompatibilitě, nízké tendenci k adhezi proteinů a nízké toxicitě. Představuje ve vodě rozpustnou látku používanou v lékařství a kosmetice. Vykazuje krátký poločas rozkladu ve vodě, který je možné regulovat stupněm polymerace.

4. DISKUSE A ZÁVĚR

V rámci práce bylo dosaženo všech vytyčených cílů, především byl získán nebuněčný implantát optimálních biomechanických parametrů určený k sanaci defektních kloubních povrchů zejména traumatologické etiologie.

Současně byl vytvořen gelový injikovatelný materiál na bázi inteligentních nanovláken funkcionalizovaných mediátory stimulujícími migraci buněk.

Dále byly vytvořeny časově-regulovatelné systémy dodávání léčiv a dalších bioaktivních látek, přičemž tyto systémy byly verifikovány *in vitro* experimenty.

V poslední řadě byl vytvořen biokompatibilní nanovláknový systém pro theragnostické aplikace, jehož účinnost byla prokázána *in vivo*.

4.1 Nebuněčný implantát optimálních biomechanických parametrů určený k sanaci defektních kloubních povrchů zejména traumatologické etiologie

Byl vyvinut nebuněčný implantát, který se ukázal jako vhodný pro *in vivo* aplikace. Tento implantát je založen na gelu, jehož biomechanické vlastnosti jsou optimalizovány aplikací mikrofrakcionovaných nanovláken funkcionalizovaných bioaktivními látkami (další detaily viz níže). Prokázali jsme, že nanovlákná z námi použitých polymerů (zejména PCL a PVA) v gelu jsou biomimetické a díky svému velmi vysokému poměru povrch/objem mají vynikající vlastnosti pro adhezi buněk i dalších bioaktivních látek. Tím si získávají významnou pozici pro svou aplikaci v regenerativní medicíně a modelování tkání (tkáňovou mikroarchitekturu) [30].

Nanovláknenné membrány mají řadu pozitivních vlastností, ale též některé nedostatky, které jim nyní brání v širším rozšíření v medicínských aplikacích. Nanovlákná jsou především pseudo dvourozměrnými strukturami s velmi malou tloušťkou. Pokusy o přípravu silnějších vrstev přitom selhávaly na jednoduchém problému. Delší náhodné ukládání vláken netkané textilie při jejich přípravě postupně zmenšuje porozitu materiálu až k mezi, kde se výhodné parametry nanovláknenných struktur ztrácí a začínají převládat vlastnosti mikrostruktur. To přináší dilema buď aplikovat mikro- či makrostrukturu a ztratit tak výhody nanotechnologického přístupu, nebo aplikovat nanovláknennou vrstvu ve velmi malé tloušťce. To následně, samozřejmě minimalizuje efekt funkcionalizovaných nanovláknenných membrán, neboť jejich účinnost je lokalizována jen na velmi malý objem.

V námi vyvinutém technologickém postupu jsme použili frakcionovaná nanovlákná jako aditiva do inovativního trojrozměrného hydrogelového implantátu.

Jako polymery pro výrobu nanovláken jsme použili PVA a PCL. Zatímco PVA je lékařskými úřady schválený, ale mírně iritabilní materiál [24,25], PCL polymer je plně biokompatibilní [26]. Nanovláknenná síťka (tj. materiál podobný dvourozměrné struktuře) byla frakcionována na mikročástice při teplotě pod tranzicí gelové fáze. Velikost mikročástic byla srovnatelná s tloušťkou sítě nanovláken. Tento krok vedle k produkci zajímavého materiálu, který bylo možné smíchat s makroskopickými trojrozměrnými systémy, tedy v našem případě s hydrogelem na bázi agaru. Takový kompozitní materiál má několik výhod, přičemž jednou z nejdůležitějších je bezpochyby možnost aplikace pomocí endoskopické či laparoskopické chirurgie.

Byla použita mikrofrakcionovaná nanovlákná, tedy mikrostruktury frakcionované z nanovláknenné membrány za teploty tekutého dusíku ve velikosti několika desítek mikrometrů, které si zachovaly svou vnitřní nanovláknennou strukturu se všemi výhodami, které nanostruktury přináší pro medicínské aplikace. Na takto připravené struktury mohou adherovat

buňky, ale jejich velikost jim umožňuje difúzi disperzí či gelem. Tím se vytváří optimální trojrozměrný systém, který kombinuje výhody nanostrukturního charakteru nanovláken s biomechanickými výhodami makrostruktur.

4.2 Gelový injikovatelný materiál optimálních biomechanických parametrů pro 3D medicínské aplikace na bázi inteligentních nanovláken funkcionalizovaných mediátory stimujícími migraci buněk

Aplikace frakcionovaných nanovláken funkcionalizovaného gelu má navíc tu výhodu, že tento materiál může být aplikován injekčně. Připravili jsme nanovláknenný materiál vhodný pro přípravu kapalných disperzí či gelů. V rámci experimentálních prací byl vyvinut a testován injikovatelný trojrozměrný gelový implantát založený na kompozitním kolagenovém hydrogelu funkcionalizovaný frakcionovanými nanovláknny, který byl srovnáván s agarovými hydrogely. Bylo prokázáno, že připravené gely byly biokompatibilní s intenzivním růstem chondrocytů a fibroblastů. Naše pozitivní závěry ohledně aplikací obou typů gelů jako tkáňové výplně a pro přípravu biokompatibilních implantátů jsou plně v souladu se závěry jiných laboratoří potvrzujících minimální indukci zánětlivých procesů [16, 23].

Důležitým poznatkem práce bylo i to, že frakcionovaná nanovláknna výrazně modifikují mechanické parametry hydrogelů už v mikromolárních koncentracích. Tento biomechanický fenomén nepochybně stojí za další zkoumání, neboť může zásadním způsobem ovlivnit medicínské aplikace. Zjistili jsme, že pravděpodobná dolní hranice hodnoty Youngova modulu pružnosti pro medicínské aplikace je 7-12 kPa [27–29], což bylo odvozeno z tlaku způsobeným gravitačními silami orgánů v dutině břišní. Tato hodnota je dosažitelná v technologiích přípravy námi aplikovaných gelů, ale je nízká pro ortopedické aplikace. Je zřejmé, že pro ortopedické aplikace je nutné optimalizovat hodnotu Youngova modulu pružnosti. Naše práce ukázaly, že této optimalizace je možné dosáhnout distribucí frakcionovaných nanovláken, a to už ve velmi nízkých koncentracích.

4.3 Časově-regulovatelné systémy dodávání léčiv a dalších bioaktivních látek a verifikovat in vitro experimenty

Připravili jsme a porovnali *in vitro* řadu hydrogelů a pěn funkcionalizovaných frakcionovanými nanovláknými s enkapsulovanými trombocyty a dalšími bioaktivními látkami. Identifikovali jsme biokompatibilní hydrogely a charakterizovali je z hlediska jejich biomechanických parametrů, biokompatibility a biostability. Prokázali jsme také adsorpci bioaktivních molekul na povrch nanovláken, jako například růstových faktorů, které evokovaly akceleraci tkáňové regenerace, antibiotik inhibujících prokaryotní proliferaci, což bylo v souladu s výsledky ostatních laboratoří [31,32,33,34]. Zřejmou výhodou nanovláken je jejich biomimetický průměr (s ohledem na extracelulární matici), což je zvýhodňuje pro buněčnou adhezi, ale také dlouhodobé uvolňování bioaktivních látek.

Prokázali jsme také, že nanovlákná mohou ve svém nitru enkapsulovat bioaktivní látky a fungovat tak jako velmi účinný systém pro cílené a kontrolované dodávání těchto bioaktivních látek pro řešení nejen osteochondrálních defektů, ale mohou takto fungovat i pro regeneraci jiných tkání. Je třeba ale zdůraznit, že jednoduchá a reprodukovatelná technologie pro přípravu funkcionalizovaných nanovláken musí být dále vyvíjena (či budou muset být optimalizovány současné technologie) pro širší aplikaci tohoto systému v personalizované medicíně.

4.4 Vyhodnocení *in vivo* biokompatibility a účinnosti nanovláknenných systémů pro theragnostické aplikace.

Porovnali jsme *in vivo* řadu hydrogelů a pěn funkcionalizovaných frakcionovanými nanovláknny s enkapsulovanými trombocyty a dalšími bioaktivními látkami. Uzavřeli jsme, že hydrogely obohacené o frakcionovaná nanovláknna s enkapsulovanými bioaktivními substancemi (protizánětlivé látky, růstové faktory, atd.) mohou efektivně řešit tkáňové léze, a to nejen nespecifickou interakcí s buňkami, ale též specifickou interakcí.

Frakcionovaná nanovláknna mohou také sloužit jako vynikající systém pro časově i cíleně regulované dodávání látek. Modifikace povrchů nanovláken patří mezi nejzajímavější, ale také nejjednodušší funkcionalizace nanovláken, neboť jednak umožňuje modifikovat buněčnou adhezi i vazbu bioaktivních látek ve velmi nízké koncentraci, dále pak připravit adresu místa dodání (*target tissue*), což je esenciální pro theragnostiku. Nanovláknna ale mohou být funkcionalizována i ve svém jádru a vytvářet tak optimální systém **řízeného** a **cíleného** dodávání bioaktivních látek. Nedávné experimenty spojené s inkorporací lipozomů ještě zvyšují aplikační potenciál této metody. Nicméně další úsilí bude muset být věnováno technologickým krokům, které povedou k dostatečné reproducibilitě procesu internalizace bioaktivních látek do nanovláknenného nitra. Splněním této podmínky se však otevírá zcela nová cesta k moderním oborům theragnostiky a personalizované medicíny.

5. LITERATURA:

1. Crovetti G., Martinelli G., Issi M. et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci* 2004; 30 (2): 145–151, doi: 10.1016/j.transci.2004.01.004
2. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M. S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16 (5): 585–601, doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.
3. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003 Jul; 83 (3): 835–70, doi: 10.1152/physrev.2003.83.3.835.
4. Rieger K. A. , Birch N. P. , Schiffman J. D. Designing electrospun nanofiber mats to promote wound healing - a review. *J Mater Chem B*. 2013 Sep 28; 1 (36): 4531–4541, doi: 10.1039/c3tb20795a.
5. Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg*. 2004 May; 187 (5A): 65S–70S, doi: 10.1016/S0002-9610(03)00306-4.
6. Hess C. T. The art of skin and wound care documentation. *Adv Skin Wound Care*. 2005 Jan-Feb; 18 (1): 43–53; quiz 54–5, doi: 10.1097/00129334-200501000-00017.
7. Zahedi P., Rezaeian I., Ranaei-Siadat S. O. et al. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polym Adv Technol* 2010; 21: 77-95.
8. Chakraborty P. D., De D., Bandyopadhyay S., Bhattacharyya D. Human aqueous placental extract as a wound healer. *J Wound Care* 2009 Nov; 18 (11): 462, 464–7, doi: 10.12968/jowc.2009.18.11.44987.
9. Zhang Y. Z., Su B., Ramakrishna S., Lim C. T. Chitosan nanofibers from an easily electrospinnable UHMWPEO-doped chitosan solution system. *Biomacromolecules* 2008;9 (1): 136–41, doi: 10.1021/bm701130e.
10. Nirmala R., Navamathavan R., Kang H. S. et al. Preparation of polyamide-6/chitosan composite nanofibers by a single solvent system via electrospinning for biomedical applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; 83 (1): 173–8, doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.11.026.
11. Nirmala R., Kang H. S., Park H. M. et al. Silver-loaded biomimetic hydroxyapatite grafted poly(epsilon-caprolactone) composite nanofibers: a cytotoxicity study. *J Biomed Nanotechnol* 2012; 8 (1): 125–32, doi: 10.1166/jbn.2012.1359.
12. Yang M. R.; Chen K. S., Tsai J. C. et al. The Antibacterial Activities of Hydrophilic-Modified Nonwoven Pet. *Mater. Sci. Eng. C* 2002, 20, 167–173.
13. Chen H., Fan X., Xia J. et al. Electrospun chitosan-graft-poly (epsilon-caprolactone)/poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous scaffolds for retinal tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 453–61, doi: 10.2147/IJN.S17057.
14. Zivanovic S., Li J., Davidson P. M., Kit K. Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. *Biomacromolecules* 2007; 8 (5): 1505–10, doi: 10.1021/bm061140p.
15. Zhou F. L., Gong R. H., Porat I. Mass production of nanofibre assemblies by electrostatic spinning. *Polym. Int.* 2009; 58: 331–342.
16. Jin J., Song M., Hourston D. J. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. *Biomacromolecules* 2004; 5 (1): 162–8, doi: 10.1021/bm034286m.
17. Van Der Schueren L., Steyaert I., De Schoenmaker, B., De Clerck K. Polycaprolactone/chitosan Blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system. *Carbohydr. Polym* 2012; 88 (4): 1221–1226, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.01.085.
18. Van der Schueren L., De Meyer T., Steyaert I. et al. Polycaprolactone and polycaprolactone/chitosan nanofibres functionalised with the pH-sensitive dye Nitrazine Yellow. *Carbohydr Polym* 2013; 91 (1): 284–93, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.08.003.
19. Noriega S. E., Hasanova G. I., Schneider M. J. et al. Effect of fiber diameter on the spreading, proliferation and differentiation of chondrocytes on electrospun chitosan matrices. *Cells Tissues Organs* 2012; 195 (3): 207–21, doi: 10.1159/000325144.
20. Lukasova V., Buzgo M., Vocetkova K. et al. Osteoinductive 3D scaffolds prepared by blend centrifugal spinning for long-term delivery of osteogenic supplements. *RSC Adv* 2018; 8 (39): 21889–21904, doi: 10.1039/c8ra02735h.
21. Vocetkova K., Sovkova V., Buzgo M. et al. A simple drug delivery system for platelet-derived bioactive molecules, to improve melanocyte stimulation in vitiligo treatment. *Nanomaterials (Basel)* 2020; 10 (9): 1801, doi: 10.3390/nano10091801.
22. Bolaina-Lorenzo E., Martínez-Ramos C., Monleón-Pradas M. et al. Electrospun polycaprolactone/chitosan scaffolds for nerve tissue engineering: physicochemical characterization and Schwann cell biocompatibility. *Biomed Mater* 2016; 12 (1): 015008, doi: 10.1088/1748-605X/12/1/015008.
23. Schexnailder P. J., Gaharwar A. K., Bartlett R. L. 2nd et al. Tuning cell adhesion by incorporation of charged silicate nanoparticles as cross-linkers to polyethylene oxide. *Macromol Biosci* 2010; 10 (12): 1416–23, doi: 10.1002/mabi.201000053.
24. Anamelechi C. C., Truskey G. A., Reichert W. M. Mylar and Teflon-AF as cell culture substrates for studying endothelial cell adhesion. *Biomaterials* 2005; 26 (34): 6887–96, doi:

- 10.1016/j.biomaterials.2005.04.027.
25. Tsai W. B., Wang M. C. Effect of an avidin-biotin binding system on chondrocyte adhesion, growth and gene expression. *Biomaterials* 2005; 26 (16): 3141–51, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.08.014.
 26. Tsai W. B., Wang M. C. Effects of an avidin-biotin binding system on chondrocyte adhesion and growth on biodegradable polymers. *Macromol Biosci* 2005; 5 (3): 214–21, doi: 10.1002/mabi.200400144.
 27. Feng S., Yan Z., Guo C. et al. Effects of an avidin-biotin binding system on Schwann cells attachment, proliferation, and gene expressions onto electrospun scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2011; 97 (3): 321–9, doi: 10.1002/jbm.a.33063.
 28. Chow G., Nietfeld J. J., Knudson C. B., Knudson W. Antisense inhibition of chondrocyte CD44 expression leading to cartilage chondrolysis. *Arthritis Rheum* 1998;41 (8): 1411–9, doi: 10.1002/1529-0131(199808)41:8<1411::AID-ART10>3.0.CO;2-Z.
 29. Knudson W., Casey B., Nishida Y. et al. Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum* 2000; 43 (5): 1165–74, doi: 10.1002/1529-0131(200005)43:5<1165::AID-ANR27>3.0.CO;2-H.
 30. Kucharová M., Doubal S., Klemra P. et al. Viscoelasticity of biological materials - measurement and practical impact on biomedicine. *Physiol Res* 2007; 56 Suppl 1: S33–S37, doi: 10.33549/physiolres.931299.
 31. Lebourg M., Martínez-Díaz S., García-Giralt N. et al. Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic acid-polycaprolactone scaffolds: a study in vivo. *J Biomater Appl* 2014; 28 (9): 1304–15, doi: 10.1177/0885328213507298.
 32. Lincks J., Boyan B. D., Blanchard C. R. et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998; 19 (23): 2219–32, doi: 10.1016/s0142-9612(98)00144-6.
 33. Liu L., Wang Y., Guo S. et al. Porous polycaprolactone/nanohydroxyapatite tissue engineering scaffolds fabricated by combining NaCl and PEG as co-porogens: structure, property, and chondrocyte-scaffold interaction in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 100 (4): 956–66, doi: 10.1002/jbm.b.32658.
 34. Lutz V., Sattler M., Gallinat S. et al. Characterization of fibrillar collagen types using multi-dimensional multiphoton laser scanning microscopy. *Int J Cosmet Sci* 2012; 34 (2): 209–15, doi: 10.1111/j.1468-2494.2012.00705.x.
 35. Malheiro V. N., Caridade S. G., Alves N. M., Mano J. F. New poly(epsilon-caprolactone)/chitosan blend fibers for tissue engineering applications. *Acta Biomater* 2010;6 (2): 418–28, doi: 10.1016/j.actbio.2009.07.012.
 36. Neves S. C., Moreira Teixeira L. S., Moroni L. et al. Chitosan/poly(epsilon-caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. *Biomaterials* 2011; 32 (4): 1068–79, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.073.
 37. Pamula E., Filová E., Bacáková L. et al. Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: the influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. *J Biomed Mater Res A* 2009; 89 (2): 432–43, doi: 10.1002/jbm.a.31977.
 38. Prosecká E., Rampichová M., Litvinec A. et al. Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect in vivo. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103 (2): 671–82, doi: 10.1002/jbm.a.35216.
 39. Puppi D., Chiellini F., Piras A. M., Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci* 2010; 35: 403–440.
 40. Saito E., Suarez-Gonzalez D., Murphy W. L., Hollister S. J. Biomaterial coating increases bone formation by ex vivo BMP-7 gene therapy in rapid prototyped poly(L-lactic acid) (PLLA) and poly(epsilon-caprolactone) (PCL) porous scaffolds. *Adv Healthc Mater* 2015; 4 (4): 621–32, doi: 10.1002/adhm.201400424.
 41. Lu Y., Zhang S., Liu X. et al. Silk/agarose scaffolds with tunable properties via SDS assisted rapid gelation. *RSC Adv.* 2017; 7: 21740–21748.
 42. Ishizaki Y., Bandai Y., Shimomura K. et al. Safe intraabdominal pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopic surgery. *Surgery* 1993; 114(3): 549–54.
 43. Atkinson T. M., Giraud G. D., Togioka B. M. et al. Cardiovascular and ventilatory consequences of laparoscopic surgery. *Circulation* 2017; 135 (7): 700–710, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023262.
 44. Kralovic M., Vjaclovsky M., Kestlerova A. et al. Electrospun nanofibers as support for the healing of intestinal anastomoses. *Physiol Res* 2019; 68(Suppl 4): S517–S525, doi: 10.33549/physiolres.934387.
 45. Nayak K. K., Gupta P. In vitro biocompatibility study of keratin/agar scaffold for tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2015; 81: 1–10, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.025.
 46. Wester K., Andersson A. C., Ranefall P. et al. Cultured human fibroblasts in agarose gel as a multi-functional control for immunohistochemistry. Standardization Of Ki67 (MIB1) assessment in routinely processed urinary bladder carcinoma tissue. *J Pathol* 2000; 190 (4): 503–11, doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200003)190:4<503::AID-PATH537>3.0.CO;2-E.

47. Varoni E., Tschon M., Palazzo B. et al. Agarose gel as biomaterial or scaffold for implantation surgery: characterization, histological and histomorphometric study on soft tissue response. *Connect Tissue Res* 2012; 53 (6): 548–54, doi: 10.3109/03008207.2012.712583.
48. Alexandre N., Ribeiro J., Gärtner A. et al. Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting--In vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102 (12): 4262–75, doi: 10.1002/jbm.a.35098.
49. Tanwar A., Ladage P., Kodam K. M., Ottoor D. Biodegradable and biocompatible agarose–poly (vinyl alcohol) hydrogel for the in vitro investigation of ibuprofen release. *Chem. Pap.* 2020; 74: 1965–1978.
50. Christen M. O., Vercesi F. Polycaprolactone: how a well-known and futuristic polymer has become an innovative collagen-stimulator in esthetics. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2020; 13: 31–48, doi: 10.2147/CCID.S229054.
51. Engler A. J., Griffin M. A., Sen S. et al. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol* 2004; 166 (6): 877–87, doi: 10.1083/jcb.200405004.
52. Levental I., Georges P. C., Janmey P. A. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* 2007; 3 (3): 299–306, doi: 10.1039/b610522j.
53. McKee C. T., Last J. A., Russell P., Murphy C. J. Indentation versus tensile measurements of Young's modulus for soft biological tissues. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; 17 (3): 155–64, doi: 10.1089/ten.TEB.2010.0520.
54. Ma Z., Kotaki M., Inai R., Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng* 2005; 11 (1–2): 101–9, doi: 10.1089/ten.2005.11.101.
55. Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26 (7): 573–7, doi: 10.1046/j.1365-2230.2001.00893.x.
56. Shin J. W., Kwon S. H., Choi J. Y. et al. Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *Int J Mol Sci* 2019; 20 (9): 2126, doi: 10.3390/ijms20092126.
57. Quan T., He T., Kang S. et al. Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. *Am J Pathol* 2004; 165 (3): 741–51, doi: 10.1016/s0002-9440(10)63337-8.
58. Maioli M., Rinaldi S., Pigliaru G. et al. REAC technology and hyaluron synthase 2, an interesting network to slow down stem cell senescence. *Sci Rep* 2016; 6: 28682, doi: 10.1038/srep28682.
59. Ahmed A. S., Sheng M. H., Wasnik S. et al. Effect of aging on stem cells. *World J Exp Med* 2017; 7: 1–10.
60. Rinaldi S., Maioli M., Pigliaru G. et al. Stem cell senescence. Effects of REAC technology on telomerase-independent and telomerase-dependent pathways. *Sci Rep* 2014; 4: 6373, doi: 10.1038/srep06373.
61. Park I. K., Morrison S. J., Clarke M. F. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest* 2004; 113 (2): 175–9, doi: 10.1172/JCI20800.
62. Wang Y., Lauer M. E., Anand S. et al. Hyaluronan synthase 2 protects skin fibroblasts against apoptosis induced by environmental stress. *J Biol Chem* 2014; 289(46): 32253–32265, doi: 10.1074/jbc.M114.578377.
63. Bellu E., Garroni G., Balzano F. et al. Isolating stem cells from skin: designing a novel highly efficient non-enzymatic approach. *Physiol Res* 2019; 68(Suppl 4): S385–S388, doi: 10.33549/physiolres.934373.
64. Torreggiani E., Rossini M., Bononi I. et al. Protocol for the long-term culture of human primary keratinocytes from the normal colorectal mucosa. *J Cell Physiol* 2019; 234 (7): 9895–9905, doi: 10.1002/jcp.28300.
65. Wei J. C. J., Edwards G. A., Martin D. J. et al. Allometric scaling of skin thickness, elasticity, viscoelasticity to mass for micro-medical device translation: from mice, rats, rabbits, pigs to humans. *Sci Rep* 2017; 7 (1): 15885, doi: 10.1038/s41598-017-15830-7.
66. Cruciani S., Garroni G., Ginesu G. C. et al. Unravelling cellular mechanisms of stem cell senescence: an aid from natural bioactive molecules. *Biology (Basel)* 2020; 9 (3): 57, doi: 10.3390/biology9030057.
67. Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S. et al. Anti-senescence efficacy of radio-electric asymmetric conveyer technology. *Age (Dordr)* 2014; 36 (1): 9–20, doi: 10.1007/s11357-013-9537-8.
68. Maioli M., Contini G., Santaniello S. et al. Amniotic fluid stem cells morph into a cardiovascular lineage: analysis of a chemically induced cardiac and vascular commitment. *Drug Des Devel Ther* 2013; 7: 1063–73, doi: 10.2147/DDDT.S44706.
69. Maioli M., Basoli V., Santaniello S. et al. Osteogenesis from dental pulp derived stem cells: a novel conditioned medium including melatonin within a mixture of hyaluronic, butyric, and retinoic acids. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 2056416, doi: 10.1155/2016/2056416.
70. Rebelo S. P., Costa R., Silva M. M. et al. Three-dimensional co-culture of human hepatocytes and mesenchymal stem cells: improved functionality in long-term bioreactor cultures. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11 (7): 2034–2045, doi: 10.1002/term.2099.
71. Cruciani S., Santaniello S., Montella A. et al. Orchestrating stem cell fate: Novel tools for regenerative medicine. *World J Stem Cells* 2019; 11 (8): 464–475, doi: 10.4252/wjsc.v11.i8.464.

72. D'Arcangelo D., Tinaburri L., Dellambra E. The role of p16^{INK4a} pathway in human epidermal stem cell self-renewal, aging and cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18 (7): 1591, doi: 10.3390/ijms18071591.
73. Rando T. A. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 2006; 441 (7097): 1080–6, doi: 10.1038/nature04958.
74. Klapper W., Parwaresch R., Krupp G. Telomere biology in human aging and aging syndromes. *Mech Ageing Dev* 2001; 122 (7): 695–712, doi: 10.1016/s0047-6374(01)00223-8.
75. Tzellos T. G., Klagas I., Vahtsevanos K. et al. Extrinsic ageing in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. *Exp Dermatol* 2009; 18 (12): 1028–35, doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00889.x.
76. Itahana K., Zou Y., Itahana Y. et al. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 2003; 23 (1): 389–401, doi: 10.1128/MCB.23.1.389-401.2003.
77. Kim E. K., Kim H. O., Park Y. M. et al. Prevalence and risk factors of depression in geriatric patients with dermatological diseases. *Ann Dermatol* 2013; 25 (3): 278–84, doi: 10.5021/ad.2013.25.3.278.
78. Draeos Z. D. Cosmetics and skin care products. A historical perspective. *Dermatol Clin* 2000; 18 (4): 557–9, doi: 10.1016/s0733-8635(05)70206-0.
79. Tundis R., Loizzo M. R., Bonesi M., Menichini F. Potential role of natural compounds against skin aging. *Curr Med Chem* 2015; 22 (12): 1515–38, doi: 10.2174/0929867322666150227151809.
80. Barry B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14 (2): 101–14, doi: 10.1016/s0928-0987(01)00167-1.
81. Farokhzad O. C., Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* 2009; 3 (1): 16–20, doi: 10.1021/nn900002m.
82. Amler E., Filová E., Buzgo M. et al. Functionalized nanofibers as drug-delivery systems for osteochondral regeneration. *Nanomedicine (Lond)* 2014;9 (7): 1083–94, doi: 10.2217/nmm.14.57.
83. Chakraborty S., Liao I. C., Adler A., Leong K. W. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2009 5; 61 (12): 1043–54, doi: 10.1016/j.addr.2009.07.013.
84. Chew S. Y., Hufnagel T. C., Lim C. T., Leong K. W. Mechanical properties of single electrospun drug-encapsulated nanofibres. *Nanotechnology* 2006 14; 17 (15): 3880–3891, doi: 10.1088/0957-4484/17/15/045.
85. Charles D. J. Myrtle in antioxidant properties of spices, herbs and other sources; *Springer: New York* 2013; pp. 409–410.
86. Olga G., Stavros L., Ioanna C., John T. Revaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur Food Res Technol.* 2008; 226: 583–590.
87. Bachir R. G., Benali M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(9): 739–42, doi: 10.1016/S2221-1691(12)60220-2.
88. Evans W. C. Trease and Evans' Pharmacognosy, 15th ed.; W.B. Sanders: Nottingham, UK, 2002; p. 477.
89. Mendes M. M., Gazarini L. C., Rodrigues M. L. Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments - effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. *Environ Exp Bot* 2001; 45(2): 165–178, doi: 10.1016/s0098-8472(01)00073-9.
90. Cruciani S., Santaniello S., Garroni G. et al. *Myrtus* Polyphenols, from Antioxidants to Anti-Inflammatory Molecules: Exploring a Network Involving Cytochromes P450 and Vitamin D. *Molecules* 2019; 24 (8): 1515, doi: 10.3390/molecules24081515.

6. SEZNAM PUBLIKACÍ

6.1 Původní vědecké práce, které jsou podkladem této disertační práce:

1. Beznoska J., Uhlík J., Kestlerová A., Královič M., Divín R., Fedačko J., Beneš J., Beneš M., Vocetková K., Sovková V., Nečas A., Nečasová A., Holešovsky J., Amler E. PVA and PCL nanofibers are suitable for tissue covering and regeneration. *Physiol Res* 2019; 68 (Suppl 4): S501–S508, doi: 10.33549/physiolres.934389.
2. Filová E., Tonar Z., Lukášová V., Buzgo M., Litvinec A., Rampichová M., Beznoska J., Plencner M., Staffa A., Daňková J., Sural M., Chvojka J., Malečková A., Králíčková M., Amler E. Hydrogel containing anti-CD44-labeled microparticles, guide bone tissue formation in osteochondral defects in rabbits. *Nanomaterials (Basel)* 2020; 10 (8): 1504, doi: 10.3390/nano10081504.
3. Filová E., Jakubcová B., Danilová I., Kuželová Košťáková E., Jarošíková T., Chernyavskiy O., Hejda J., Handl M., Beznoska J., Nečas A., Rosina J., Amler E. Polycaprolactone foam functionalized with chitosan microparticles – a suitable scaffold for cartilage regeneration. *Physiol Res* 2016; 65 (1): 121–31, doi: 10.33549/physiolres.932998.
4. Filová E., Tonar Z., Lukasova V., Buzgo M., Litvinec A., Rampichova M. Beznoska J. et al. The control of osteochondral regeneration in rabbits using type I collagen/fibrin scaffold enriched with thrombocytes and chitosan/poly-e-caprolacton microparticles. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2014; 8:79–79.
5. Bellu E., Garroni G., Cruciani S., Balzano F., Serra D., Satta R., Montesu M. A., Fadda A., Mulas M., Sarais G., Bandiera P., Torreggiani E., Martini F., Tognon M., Ventura C., Beznoska J., Amler E., Maioli M. Smart nanofibers with natural extracts prevent senescence patterning in a dynamic cell culture model of human skin. *Cells* 2020; 9 (12): 2530, doi: 10.3390/cells9122530.