



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie Genetyki Molekularnej,
Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej

Marta Kędzierska

**Ocena właściwości biologicznych
modyfikowanych kompozytów
alginianowych oraz chitozanowo-
celulozowych jako potencjalnych
czynników przyspieszających proces
gojenia ran**

Assessment of biological properties of modified
alginate and chitosan-cellulose composites as
potential factors accelerating the wound healing
process

Praca doktorska
wykonana w Katedrze Biofizyki Ogólnej
Instytutu Biofizyki
Promotor: dr. hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ

➔ Łódź, 2022

SPIS TREŚCI

I.	SPIS PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	3
II.	OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I UZYSKANYCH WYNIKÓW.....	4
III.	STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	22
IV.	STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	24
V.	DOROBEK NAUKOWY.....	26
VI.	KOMPLET PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	
VII.	OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PRAC	

I. SPIS PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

(I) Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna* (2019) Zastosowanie biomateriałów na bazie chitozanu w leczeniu trudno gojących się ran. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 73: 768-781.

Praca przeglądowa

Punkty MNiSzW₂₀₁₉: **40**

Impact Factor: **0,878**

(II) Blilid Sara, Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365.

Praca oryginalna

Punkty MNiSzW₂₀₁₉: **140**

Impact Factor: **8,198**

(III) Marta Kędzierska*, Sara Blilid, Katarzyna Miłowska, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Mohammed Lahcini, Abdelkrim El Kadib, Maria Bryszewska (2021) Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films. *International Journal of Molecular Sciences*, 22,11386.

Praca oryginalna

Punkty MEiN₂₀₂₁: **140**

Impact Factor: **5,924**

(IV) Marta Kędzierska*, Nisrine Hammi, Joanna Kolodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Maria Bryszewska, Katarzyna Miłowska, Abdelkrim El Kadib* (2022) Glassy-like Metal Oxide Particles Embedded on Micrometer Thicker Alginate Films as Promising Wound Healing Nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5585.

Praca oryginalna

Punkty MEiN₂₀₂₂: **140**

Impact Factor: **5,924**

(*) autor korespondencyjny

Łączny IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej: 20,924 (460 pkt MNiE).

II. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I UZYSKANYCH WYNIKÓW

WPROWADZENIE

Jednym z kluczowych problemów współczesnej medycyny jest proces gojenia ran przewlekłych. Charakteryzuje się on ogromną złożonością i zaangażowaniem wielu czynników molekularnych (Han i Ceilley, 2017). Dotyczy to szczególnie pacjentów w podeszłym wieku obciążonych różnymi chorobami takimi jak nowotwory, cukrzyca czy choroby autoimmunologiczne, u których proces ten znacznie się wydłuża, powodując dyskomfort życia uniemożliwiający normalne funkcjonowanie (Velier i wsp., 2018).

Przerwanie ciągłości morfologicznej tkanek uruchamia kaskadową odpowiedź organizmu mającą na celu odbudowanie zranionej tkanki i powstanie blizny. Proces ten jest złożonym łańcuchem reakcji biochemicznych (Ellis i wsp., 2018). Jego prawidłowy przebieg jest możliwy dzięki współpracy wielu typów komórek, elementów morfotycznych krwi, czynników molekularnych oraz cytokin. W gojeniu ran wyróżnić można następujące fazy: oczyszczanie (hemostaza), proliferacja (migracja) komórek oraz odbudowa i obkurczanie rany efektem czego jest powstawanie blizny (Rodríguez-Acosta i wsp., 2022; Cheng i wsp., 2019).

Natychmiast po urazie dochodzi do zatamowania krwawienia z uszkodzonych naczyń krwionośnych poprzez wytworzenie się skrzepu. Utworzenie czopu płytkowego jest bardzo istotne, ponieważ zapobiega dalszej utracie płynów i elektrolitów z rany, a także ogranicza zanieczyszczenia pochodzące ze środowiska zewnętrznego (Lih i wsp., 2012; Smigiel i Parks, 2018). W prawidłowych warunkach fizjologicznych skrzep składa się z siatki fibryny i osadzonych w niej płytek krwi. Ze względu na to, że skrzep jest jedynie chwilową strukturą, stanowi on bazę składowych biomolekuł procesu gojenia. Płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) jest kluczowym białkiem stymulującym aktywację fibroblastów i makrofagów, które odpowiadają za oczyszczanie rany (Rodrigues i wsp., 2019; Karahan i wsp., 2018). Kolejnym etapem gojenia jest proliferacja i migracja komórkowa. Zachodzi wtedy angiogeneza, odkładany jest kolagen, tworzy się ziarnina i następuje obkurczanie rany. W angiogenezie, komórki śródbłónki naczyniowego tworzą nowe naczynia krwionośne. Następuje wzmożona proliferacja fibroblastów i tworzy się nowa, tymczasowa macierz zewnątrzkomórkowa przez syntezę kolagenu i fibronektyny.

Efektem powyższych procesów jest całkowite zamknięcie rany (Du i wsp., 2018; Ammann i wsp., 2019; Torres i wsp., 2018).

W celu usprawnienia procesu gojenia i skrócenia czasu jego trwania naukowcy skupiają swoją uwagę na opracowaniu innowacyjnych biomateriałów stosowanych jako opatrunki.

Biomateriały to naturalne materiały biozgodne, które są jak najbardziej zbliżone do naturalnych warunków panujących w organizmie człowieka. Rolą biomateriału jest częściowe lub całkowite zastępowanie tkanki lub organu i pełnienie ich funkcji w organizmie (Ratner, 2019). Opatrunki z biomateriałów powinny być wykonane ze specjalnych biodegradowalnych polimerów, będących dobrymi promotorami wchłaniania substancji czynnej. Ogromne zróżnicowanie rodzajów ran spowodowało opracowanie wielu opatrunków z nowymi substancjami, często wprowadzanymi w celu ukierunkowania procesu gojenia. Dopasowanie odpowiedniego opatrunku zależy od etiologii rany, jej lokalizacji, rozległości, stopnia zakażenia oraz od ogólnego stanu zdrowia pacjenta. Idealny opatrunek powinien doprowadzić do szybkiego gojenia przy możliwie niskich kosztach i najmniejszych niedogodnościach dla pacjenta (Murray i wsp., 2019; Kumar i wsp., 2018).

Inżynieria biomateriałów coraz częściej skupia się na polimerach pochodzenia naturalnego, takich jak: celuloza, chityna czy alginian. Związki te charakteryzują się nietoksycznością, biokompatybilnością oraz biodegradowalnością. Ich budowa umożliwia stosunkowo łatwe modyfikacje chemiczne i enzymatyczne, co sprawia, że cieszą się dużą popularnością w badaniach eksperymentalnych (Azuma i wsp., 2015; Kanikireddy i wsp., 2020; Agrawal i wsp., 2014; Sun i wsp., 2013).

Liczne doniesienia o pozytywnym wpływie biomateriałów z chitozanem, celulozą i alginianem na proces gojenia ran stały się podstawą do opracowania innowacyjnych modyfikacji biomateriałów, które mogłyby przyspieszać gojenie. Są to główne powody, dla których są one badane pod kątem wykorzystania w medycynie. Biorąc pod uwagę zastosowanie naturalnych polisacharydów jako opatrunków na rany przewlekłe, należy poznać dokładnie ich właściwości biologiczne.

CEL PRACY

Proces przewlekłego gojenia ran stanowi ogromny problem medyczny. Jest on dla pacjenta bardzo wymagającym etapem powrotu do pełni zdrowia. Wskaźnik częstotliwości występowania ran „niegojących się” stale wzrasta ze względu na starzenie się społeczeństwa oraz choroby, jak m.in. cukrzyca czy miażdżyca. Sprawia to, że podjęcie tego typu tematu wydaje się uzasadnione i niezmiernie istotne.

Celem badawczym niniejszej pracy było określenie właściwości biologicznych kompozytów chitozanowo-celulozowych oraz alginianowych modyfikowanych tlenkami metali jako materiałów potencjalnie przydatnych w procesie gojenia ran.

Założeniem pierwszego etapu była ocena toksyczności badanych materiałów. Określenie hemotoksyczności, cytotoksyczności czy genotoksyczności jest istotnym elementem badań *in vitro*, dających podwaliny późniejszego zastosowania w praktyce.

Analizowano wpływ tych związków na indukcję hemolizy, adsorpcję oraz utlenianie hemoglobiny w krwinkach czerwonych. Określono cytotoksyczność względem komórek skóry człowieka w modelu *in vitro*. Zbadano również mechanizmy toksyczności względem fibroblastów i keratynocytów poprzez oddziaływanie biomateriałów na parametry stresu oksydacyjnego, w tym indukcję reaktywnych form tlenu (ROS) oraz zmiany potencjału mitochondrialnego. Wykonano eksperymenty sprawdzające wpływ biopolimerów na uszkodzenia DNA.

Celem drugiego etapu badań było wyselekcjonowanie biokompozytów mogących wpływać na poszczególne etapy procesu gojenia. Sprawdzone wpływ kompozytów na zewnątrzpochodny i wewnątrzpochodny szlak aktywacji krzepnięcia krwi, które są kluczowe w hemostazie. Dokonano analizy migracji fibroblastów i keratynocytów jako istotnego etapu zarastania rany, a także określono poziom glikozaminoglikanów pełniących głównie rolę odżywczą w skórze.

HIPOTEZA BADAWCZA

Biokompozyty chitozanowo-celulozowe i alginianowe modyfikowane tlenkami metali wspomagają proces gojenia ran.

OMÓWIENIE PRAC WCHODZĄCYCH W ZAKRES ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Na niniejszą rozprawę doktorską składają się cztery publikacje (trzy prace oryginalne oraz jedna praca przeglądowa), które stanowią spójny tematycznie cykl artykułów. Każdy artykuł został opublikowany w indeksowanym czasopiśmie naukowym o międzynarodowym zasięgu, znajdującym się w bazie Journal Citation Reports. Seria prac jest odzwierciedleniem pierwotnego planu badań, który finalnie został w pełni zrealizowany. Publikacje **(II)**, **(III)** i **(IV)** powstały w ramach współpracy z zespołem profesora Abdelkirma El Kadiba z Euromed Research Center, Engineering Division, Euro-Med University of Fes, Maroko (UEMF). Zespół ten zajmował się syntezą wszystkich badanych biomateriałów oraz oceniał ich właściwości fizykochemiczne, które są opisane w pracach **(II)** i **(IV)**. Wyniki przedstawione w części biologicznej wymienionych prac, z wyjątkiem badań mikrobiologicznych, wchodzi w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej i zostaną omówione poniżej.

Ponadto w pracy zawarte są dodatkowe badania poziomu glikozaminoglikanów (GAGs) dla wyselekcjonowanej grupy biomateriałów, które nie są opisane w cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Cykl artykułów otwiera praca przeglądowa pt. „*Zastosowanie biomateriałów na bazie chitozanu w leczeniu trudno gojących się ran*” **(I)**. Artykuł jest przeglądem publikacji dotyczących zastosowania biomateriałów zawierających naturalne polimery takie jak chitozan i alginian jako opatrunki w gojeniu ran przewlekłych. Obejmuje opis i charakterystykę etapów procesu gojenia, budowę strukturalną i właściwości fizykochemiczne polisacharydów a także ich wpływ na poszczególne etapy gojenia ran.

Publikacje oryginalne otwiera praca pt. „*Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics*” **(II)**. Grupę badaną stanowiły filmy chitozanowo-celulozowe zbudowane z celulozy mikrokrokrystalicznej (CS@MCC-f, CS@P-MCC-f, CS@PN-MCC-f), celulozy nanokrokrystalicznej (CS@CNC-f, CS@P-CNC-f, CS@PN-CNC-f) oraz film chitozanowy (CS-f). W części biologicznej pracy, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej, przedstawiono ich wpływ na hemolizę, adsorpcję oraz utlenianie hemoglobiny (Hb).

Poziom hemolizy erytrocytów człowieka oznaczono spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji uwolnionej hemoglobiny po 1, 3 i 24 godz. inkubacji z badanymi filmami. Sprawdzano także czy uwolniona z erytrocytów hemoglobina adsorbuje do

powierzchni badanych materiałów oraz czy ulega utlenianiu do methemoglobiny (Drabkin, 1946).

Wszystkie badane filmy chitozanowo-celulozowe indukowały hemolizę, ale po inkubacji przez 1 i 3 godz. jej wartość nie przekraczała 6–8%. Po 24 godz. stopień hemolizy wzrósł do 10–16%, a najbardziej toksyczny względem erytrocytów okazał się kompozyt zawierający celulozę mikrokrystaliczną bez modyfikacji (CS@MCC-f).

Inkubacja wszystkich materiałów z hemoglobina przez 3 godz. wykazała niewielki stopień adsorpcji hemoglobiny na powierzchni filmów. Wydłużenie czasu inkubacji spowodowało znaczny jej wzrost, nawet do 36%. Warto podkreślić, że przyłączanie hemoglobiny do materiałów celulozowo-chitozanowych po 24 godz. zmniejszało zawartość hemoglobiny w roztworze i można wnioskować, że poziom hemolizy został zaniżony, a zarazem uzyskane wyniki nie odzwierciedlały rzeczywistej hemotoksyczności. Zbadano również wpływ folii kompozytowych na utlenianie hemoglobiny. Zawartość methemoglobiny po 3 godz. inkubacji dla wszystkich kompozytów wynosiła 2-6% natomiast po 24 godzinach wzrosła do poziomu 8-16%.

Podsumowując, rodzaj modyfikacji celulozy wpływa na zdolność badanych materiałów do uszkodzania błony komórkowej krwinek czerwonych oraz utleniania i adsorbowania hemoglobiny.

W trzeciej pracy pt. „*Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films*” (III) analizowano cytotoksyczność oraz genotoksyczność kompozytów chitozanowo-celulozowych, a także ich właściwości antyoksydacyjne i hemostatyczne, oraz ich wpływ na migrację komórek skóry człowieka w kontekście oddziaływania na proces gojenia ran.

Do oceny cytotoksyczności biokompozytów chitozanowo-celulozowych względem dwóch linii komórkowych skóry człowieka (fibroblastów i keratynocytów) wykorzystano kolorymetryczny test żywotności MTT (Mosmann, 1983). Ponadto przeprowadzono analizę zmian poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS) wykorzystując fluorescencyjną sondę H_2DCFDA (Myhre i wsp., 2003) i zmiany błonowego potencjału mitochondrialnego z użyciem znacznika JC-1 (Feldkamp, 2005).

Wszystkie testowane filmy chitozanowo-celulozowe, z wyjątkiem kompozytu z samym chitozanem (CS-f), wykazywały statystycznie istotne zmniejszenie żywotność obu linii komórkowych, jednak żywotność komórek w żadnym przypadku nie była niższa niż 70%. Spadek żywotności zależał od składu kompozytów i rodzaju komórek.

Keratynocyty (KERTr) były bardziej wrażliwe na działanie badanych filmów niż fibroblasty (BJ).

Filmy chitozanowo-celulozowe po 24 godz. inkubacji, nie powodowały w zdecydowanej większości istotnych statystycznie zmian w poziomie reaktywnych form tlenu, zarówno w komórkach BJ, jak i KERTr. Jedynie film CS@P-MCC-f, w przypadku fibroblastów powodował niewielki, ale istotny statystycznie wzrost poziomu ROS o około 6% w porównaniu do kontroli nietraktowanej badanymi kompozytami. Natomiast po inkubacji fibroblastów z filmami CS-f, CS@CNC-f i CS@P-CNC-f obserwowany był nieznaczny lecz istotny statystycznie spadek zawartości ROS o około 10%.

Kolejnym analizowanym parametrem (w kontekście wpływu kompozytów na komórki skóry) były zmiany potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$). Wszystkie modyfikacje filmu chitozanowego wpłynęły w nieznacznym stopniu na obniżenie tego potencjału, co pozwala wnioskować, że badane związki nie wpływają na aktywność proapoptotyczną.

W przypadku testowania materiałów, które mogą mieć potencjalne zastosowanie w medycynie, ważne jest sprawdzenie ich działania w różnych aspektach, zwłaszcza ich genotoksyczności. W tym celu zastosowano test kometowy, który daje odpowiedź, czy kompozyty indukują uszkodzenia DNA (Singh i wsp., 1988; w modyfikacji Blasiak i Kowalik, 2000).

Wszystkie filmy powodowały niewielki lecz istotny statystycznie wzrost poziomu uszkodzeń DNA. Największy procent uszkodzeń stwierdzono dla komórek inkubowanych z CS@P-MCC-f. Kompozyt ten również nieznacznie zwiększył poziom ROS, który mógł wywoływać stres oksydacyjny i doprowadzić do uszkodzeń DNA. Zmiany te nie przekroczyły jednak 10%, co sugeruje, że testowane filmy nie są genotoksyczne.

Ze względu na to, że badane kompozyty nie były toksyczne względem komórek skóry lub ich toksyczność była niewielka oraz nie powodowały znacznych uszkodzeń DNA postanowiono sprawdzić ich potencjalną przydatność w procesie gojenia ran. W tym celu badano ich właściwości hemostatyczne, wpływ na migrację komórek skóry oraz poziom glikozaminoglikanów.

Do oceny właściwości hemostatycznych zastosowano metody koagulometryczne. Wykonano pomiary trzech markerów diagnostycznych oceniających sprawność działania układu hemostazy: czasu protrombinowego (PT), czasu trombinowego (TT) oraz czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT) (Prasa, 1977; w modyfikacji Kołodziejczyk-Czepas i wsp., 2018).

Pierwszym markerem określającym właściwości hemostatyczne badanych materiałów był czas protrombinowy (PT). Służy on do oceniania zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia. Drugim był czas trombinowy (TT) odpowiadający ostatniemu etapowi krzepnięcia krwi, podczas którego fibrynogen jest przekształcany przez trombinę w fibrynę. Uzyskane wyniki wykazały istotne statystycznie zmiany czasów krzepnięcia. Badane materiały skracaly czasy PT i TT w porównaniu do kontroli wykazując działanie prokoagulacyjne. Ostatni badany marker diagnostyczny, jakim był czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT), służy do oceny sprawności wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia. Wszystkie filmy chitozanowo-celulozowe powodowały istotne statystycznie skrócenie czasu aPTT, czyli działały prokoagulacyjnie.

Dokonano również analizy migracji fibroblastów i keratynocytów pod wpływem materiałów chitozanowo-celulozowych odgrywającej istotną rolę w tworzeniu macierzy zewnątrzkomórkowej w etapie zarostania rany. Wykorzystano ilościowy test migracji komórek przy użyciu wkładek do hodowli komórkowych ThinCert™ (Boyden, 1962; Entschladen i wsp., 2005).

W przypadku fibroblastów, wszystkie badane kompozyty stymulowały migrację komórek. Istotny statystycznie wzrost poziomu migracji zależny był od rodzaju modyfikacji kompozytów. Najwyższy jej poziom zaobserwowano dla filmów CS@MCC-f oraz CS@CNC-f gdzie wynosił odpowiednio 151% i 157%. W przypadku keratynocytów znacząca większość materiałów stymulowała migrację, jednak film CS@PN-CNC-f powodował istotny statystycznie spadek jej poziomu do 73%. Można więc wnioskować, że modyfikacja nanocelulozy cyklotrifosfazanem spowodowała inhibicję procesu migracyjnego keratynocytów.

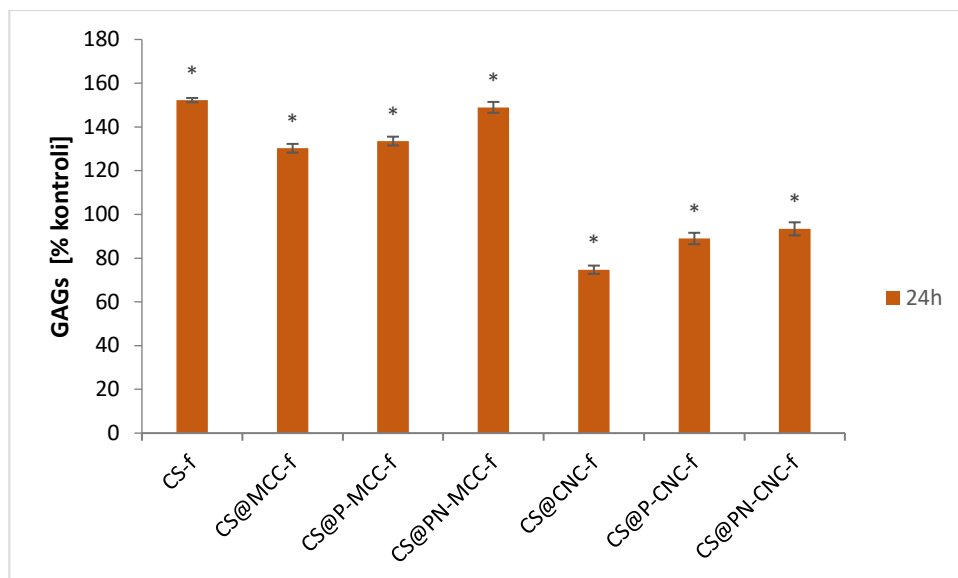
Oznaczanie poziomu glikozaminoglikanów po inkubacji z filmami chitozanowo-celulozowymi

Stymulacyjne działanie badanych filmów na migrację fibroblastów skóry człowieka oraz fakt, że fibroblasty są głównym miejscem wytwarzania i uwalniania glikozaminoglikanów wiążących się z kolagenem, były inspiracją do oceny wpływu kompozytów chitozanowo-celulozowych na poziom glikozaminoglikanów (GAGs) w fibroblastach. Wyniki tego eksperymentu nie zostały zawarte w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Funkcje GAGs i proteoglikanów, czyli postaci w której najczęściej występują w warunkach fizjologicznych, są związane z ich wielkością oraz strukturą i bezpośrednio lub pośrednio zależą od polianionowego charakteru tych cząsteczek. Obecność polianionowych proteoglikanów na powierzchni błon komórkowych leży u podstaw interakcji typu komórka-komórka oraz komórka-substrat, warunkując zbadany wcześniej proces migracji komórek. Niegdyś fibroblasty traktowane były jako bierny uczestnik procesów fizjologicznych z funkcją ograniczoną jedynie do wytwarzania macierzy pozakomórkowej i kolagenu. Obecnie wiadomo, że uczestniczą także w złożonym procesie reakcji immunologicznych będąc źródłem czynników wzrostu, cytokin zapalnych i cząstek chemotaktycznych, co odgrywa ogromną rolę w procesie gojenia ran (Daroszewski i wsp. 2006). Jednym z najlepiej poznanych związków należących do glikozaminoglikanów jest kwas hialuronowy. Stymuluje on procesy komórkowej migracji, proliferacji i dojrzewania, wykazując również działanie proangiogenne (Weindl i wsp., 2004).

Eksperyment przeprowadzono z zastosowaniem komercyjnego testu ELISA Human GAGs, KIT from Wuhan Fine Biotech Co.,Ltd. (Perea i wsp., 2021). Badanie wykonano zgodnie z instrukcją załączoną do zestawu ELISA dla wyselekcjonowanej grupy materiałów chitozanowo-celulozowych inkubowanych z fibroblastami.

Materiały zawierające w swej budowie mikrokrystaliczną celulozę powodowały istotny statystycznie, znaczny wzrost poziomu GAGs względem kontroli (ryc. 1) czyli fibroblastów (BJ) nietraktowanych badanym materiałem. Poziom glikozaminoglikanów wzrósł nawet o 52%. Przeciwnie rezultaty uzyskano dla kompozytów chitozanowych z nanokrystaliczną celulozą. Kompozyty CS@CNC-f, CS@P-CNC-f i CS@PN-CNC-f działały hamująco na syntezę i wydzielanie GAGs w fibroblastach a ich poziom spadł maksymalnie o 20% względem kontroli. Dane literaturowe donoszą, że chitozan może służyć jako analog GAGs, ponieważ zawiera grupy N-acetylo-glukozaminy w cząsteczce wpływając na stymulowanie proliferacji fibroblastów (Tangsadthakun i wsp., 2007). Prawdopodobnie celuloza, podobnie jak kwas hialuronowy, wykazuje zdolność do wiązania wody w swojej polisacharydowej sieci i zapewnia utrzymanie prawidłowego nawodnienia (wilgotności) w obrębie macierzy rany. Dzięki wielowarstwowej, siateczkowej strukturze celulozy, materiał ten nie hamuje procesów wymiany gazowej, w tym dostępu tlenu do tkanki (Dydać i wsp., 2017).



Rycina 1. Poziom glikozaminoglikanów (GAGs) w fibroblastach skóry człowieka (BJ) po 24 godzinnej inkubacji z biomateriałami chitozanowo-celulozowymi, n=4, *p<0.05.

Uzyskane wyniki *in vitro* dostarczyły bogatych informacji na temat właściwości biologicznych badanych biomateriałów chitozanowo-celulozowych. Nieznaczna cytotoksyczność oraz genotoksyczność pozwoliły na dokonanie analizy eksperymentalnej w kontekście potencjalnego zastosowania filmów jako opatrunków medycznych. Wpływ kompozytów na zewnątrzpochodny i wewnątrzpochodny szlak aktywacji krzepnięcia potwierdził ich przydatne właściwości hemostatyczne. Ponadto wpływ na wzrost poziomu generowania i uwalniania glikozaminoglikanów w fibroblastach i działanie stymulacyjne na migrację fibroblastów i keratynocytów, pozwalają wnioskować, że biomateriały chitozanowe modyfikowane celulożą mogą być potencjalnymi opatrunkami przyspieszającymi proces gojenia ran.

Ostatni artykuł z cyklu pt. „*Glassy-like Metal Oxide Particles Embedded on Micrometer Thicker Alginate Films as Promising Wound Healing Nanomaterials.*” (IV) dotyczy drugiej grupy badanych materiałów, jakimi były biokompozyty alginianowe modyfikowane tlenkami metali: Alg, Alg@(V-O-V)_n, Alg@GeO₂, Alg@(Fe-O-Fe)_n, Alg@ZnO 20:1, Alg@ZnO 10:1, Alg@ZnO 5:1, Alg@ZnO (Cl) 20:1, Alg@ZnO (Cl) 10:1, Alg@ZnO (Cl) 5:1, Alg@(Ti-O-Ti)_n.

W części publikacji, stanowiącej wkład do rozprawy doktorskiej, zostały opisane właściwości biologiczne badanych filmów alginianowych. Analizowano ich wpływ na

erytrocyty i hemoglobinę człowieka. Sprawdzone zostały właściwości cytotoksyczne i genotoksyczne względem komórek skóry, a także wpływ na układ hemostazy i migrację komórek skóry człowieka.

Hemolizę badano po dwóch czasach inkubacji erytrocytów z biomateriałami: po 1 i 3 godz., ponieważ wydłużenie czasu inkubacji powodowało rozpuszczenie kompozytów i zakłócenie odczytu. Wszystkie materiały alginianowe modyfikowane tlenkami metali indukowały hemolizę. Po 3 godz. inkubacji najbardziej toksyczny względem erytrocytów człowieka okazał się film modyfikowany tlenkiem wanadu Alg@(V-O-V)n, dla którego hemoliza wynosiła 10%. Bezpośredni wpływ badanych materiałów alginianowych na hemoglobinę wykazał, że wszystkie alginiany adsorbują hemoglobinę na swojej powierzchni. Hemoglobina najbardziej adsorbowana była do powierzchni filmu Alg@(V-O-V)n. Uzyskane wyniki sugerują, że Hb uwalniana z erytrocytów podczas hemolizy może być adsorbowana na materiałach alginianowych, co skutkuje zmniejszeniem zawartości hemoglobiny w roztworze. Oznacza to, że hemotoksyczność badanych kompozytów była wyższa niż przedstawiają to uzyskane wyniki hemolizy erytrocytów.

Ponadto sprawdzono działanie modyfikowanych filmów alginianowych na proces utleniania hemoglobiny (Drabkin, 1946). Po 3 godz. inkubacji wszystkie badane materiały powodowały znaczący wzrost utleniania białka i wysoki poziom methemoglobiny. Najwyższy poziom utlenionej hemoglobiny wynosił blisko 40%, dla próby inkubowanej z Alg@(V-O-V)n.

Cytotoksyczność względem komórek skóry oceniona została na podstawie wyników testu MTT (Mosmann, 1983). Badane kompozyty były toksyczne zarówno względem fibroblastów jak i keratynocytów. Po 3 godzinach inkubacji poziom żywotności populacji komórek skóry spadał nawet do 30%. Żywotność komórek była różna w zależności od rodzaju modyfikacji kompozytów alginianowych. Najbardziej toksyczne względem fibroblastów (BJ) były kompozyty modyfikowane tlenkiem wanadu (Alg@(V-O-V)n), żelaza (Alg@(Fe-O-Fe)n) i tlenkiem cynku (Alg@ZnO 20:1, Alg@ZnO 10:1, Alg@ZnO 5:1). Względem drugiej linii komórkowej keratynocytów (KERTr) wysoką cytotoksyczność odnotowano dla filmów Alg@(V-O-V)n, Alg@(Fe-O-Fe)n, Alg@ZnO 20:1, Alg@ZnO 10:1, Alg@ZnO 5:1, Alg@ZnO (Cl) 20:1, Alg@ZnO (Cl) 10:1 oraz Alg@ZnO (Cl) 5:1.

W publikacji wykazano, że materiały alginianowe w zależności od modyfikacji powodowały niewielki wzrost poziomu ROS w fibroblastach oraz znaczny wzrost ROS

w keratynocytach (Myhre i wsp., 2003). Najwięcej ROS w keratynocytach wykryto w próbach, które charakteryzowały się największą toksycznością a więc: Alg@(V-O-V)_n, Alg@(Fe-O-Fe)_n, Alg@ZnO 20:1, Alg@ZnO 10:1, Alg@ZnO 5:1, Alg@ZnO (Cl) 20:1, Alg@ZnO (Cl) 10:1 oraz Alg@ZnO (Cl) 5:1. Drugą metodą określającą mechanizm cytotoksyczności była analiza zmian potencjału mitochondrialnego (Salvioli i wsp., 1997). Wykazano, że badane biomateriały powodowały obniżenie potencjału błonowego maksymalnie o 30%.

Sprawdzono również wpływ materiałów na poziom uszkodzeń DNA za pomocą testu kometowego (Singh i wsp., 1988; w modyfikacji Blasiak i Kowalik, 2000). Wszystkie badane materiały wykazywały właściwości genotoksyczne na dość niskim poziomie zarówno względem BJ jak i KERTr.

Kolejnym ważnym etapem badań było sprawdzenie właściwości hemostatycznych i sprawności działania układu hemostazy (Prasa, 1977; w modyfikacji Kołodziejczyk-Czepas i wsp., 2018; Versteeg i wsp., 2013). Wykonano pomiary dwóch markerów diagnostycznych: czasu protrombinowego (PT) oraz trombinowego (TT). Ze względu na interferencję biokompozytów z układem doświadczalnym niemożliwe było zmierzenie czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT). Badane materiały zgodnie z wynikami czasu PT (skrócenie czasu) stymulowały aktywację i propagację kaskady krzepnięcia, jednak na poziomie aktywnego enzymu (trombiny) związki te wykazywały działanie antykoagulacyjne. Ponieważ kompozyty alginianowe działały różnie na poszczególnych etapach kaskady krzepnięcia wykonano dodatkowy eksperyment oceniający ich wpływ na aktywność trombiny. W tym celu zastosowano metodę amidolityczną z wykorzystaniem syntetycznego substratu. Wykazano, że modyfikowane tlenkami metali kompozyty alginianowe hamowały aktywność trombiny, dlatego wydłużały czas trombinowy.

Ostatnim oznaczeniem było sprawdzenie wpływu wyselekcjonowanej grupy najmniej toksycznych materiałów alginianowych na migrację komórek skóry (Boyden, 1962; Entschladen i wsp., 2005). Kompozyty: Alg, Alg@GeO₂ i Alg@(Ti-O-Ti)_n powodowały istotny statystycznie wzrost migracji fibroblastów o maksymalnie 40%. Względem keratynocytów najbardziej obiecujące właściwości stymulujące migrację wywołały filmy: Alg, Alg@ZnO (Cl) 20:1 i Alg@(Ti-O-Ti)_n. Najwyższa migracja keratynocytów była w próbie z Alg@(Ti-O-Ti)_n a jej poziom wynosił 160%.

Kompozyty alginianowe ze względu na różnorodność tlenków metali wykorzystanych do modyfikacji wykazywały zróżnicowane właściwości biologiczne.

Najbardziej przydatnymi w procesie gojenia ran mogą być filmy z samym alginianem Alg oraz modyfikowany tlenkiem tytanu $\text{Alg} @ (\text{Ti-O-Ti})_n$.

PODSUMOWANIE

Wykazano, że rodzaj modyfikacji biokompozytów wpływa na ich właściwości biologiczne. Biokompozyty chitozanowo-celulozowe wykazywały niewielką toksyczność zarówno względem erytrocytów jak i komórek skóry oraz nie powodowały znacznych uszkodzeń DNA. Wszystkie kompozyty celulozowe wykazywały działanie prokoagulacyjne wpływając zarówno na wewnątrzpochodny i zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia krwi, co stanowi ważny element etapu hemostazy gojenia ran. Kompozyty celulozowe wpływały na migrację zarówno fibroblastów BJ i keratynocytów KERTr, co może mieć wpływ na przyspieszenie zarastania rany. Ponadto, kompozyty: CS@f, CS@MCC-f, CS@P-MCC-f oraz CS@PN-MCC-f powodowały wzrost poziomu glikozaminoglikanów w komórkach, które są odpowiedzialne za utrzymywanie odpowiedniego stopnia nawilżenia skóry, utrzymywanie odpowiedniej struktury skóry oraz spajanie naskórka ze skórą właściwą.

W drugiej grupie badanych materiałów tj. biokompozytów alginianowych modyfikowanych tlenkami metali zauważono znaczącą toksyczność względem erytrocytów oraz w większości były one cytotoksyczne względem komórek skóry. Spośród biomateriałów alginianowych wpływ na migrację komórkową oraz właściwości hemostatyczne wykazywały filmy alginianowe: Alg oraz Alg@(Ti-O-Ti)_n.

WNIOSEK

- Biokompozyty chitozanowo-celulozowe oraz alginianowe Alg, Alg@(Ti-O-Ti)_n wykazują właściwości wspomagające proces gojenia ran i można rozważyć ich zastosowanie w produkcji opatrunków na rany.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Agrawal, P.; Soni, S.; Mittal, G.; Bhatnagar, A. *Role of polymeric biomaterials as wound healing agents*. Int J Low Extrem Wounds. **2014**, 13(3): 180-90.

Ammann, K.R.; DeCook, K.J.; Li, M.; Slepian, M.J. *Migration versus proliferation as contributor to in vitro wound healing of vascular endothelial and smooth muscle cells*. Exp Cell Res. **2019**, 1,376(1): 58-66.

Azuma, K.; Izumi, R.; Osaki, T.; Ifuku, S.; Morimoto, M.; Saimoto, H.; Minami, S.; Okamoto, Y. *Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials*. J Funct Biomater. **2015**, 13, 6(1): 104-42.

Blasiak, J.; Kowalik, J. *A comparison of the in vitro genotoxicity of tri-and hexavalent chromium*. Mutat Res. **2000**, 469: 135–145.

Boyden, S. *The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes*. J Exp Med. **1962**, 115: 453–466.

Cheng, Y.; Chang, Y.; Feng, Y.; Jian, H.; Wu, X.; Zheng, R.; Wang, L.; Ma, X.; Xu, K.; Song, P. et al. *Hierarchical Acceleration of Wound Healing through Intelligent Nanosystem to Promote Multiple Stages*. ACS Appl Mater Interfaces. **2019**, 18, 11(37): 33725-33733.

Daroszewski. J.; Rybka, J.; Gamian, A. *Glikozaminoglikany w patogenezie i diagnostyce oftalmopatii Gravesa*. Postepy Hig Med Dosw (Online). **2006**, 60: 370-378.

Drabkin, D. L. *Spectrophotometric studies XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species*. J Biol Chem. **1946**, 164: 703-723.

Du, H.; Zhou, Y.; Suo, Y.; Liang, X.; Chai, B.; Duan, R.; Huang, X.; Li, Q. *CCN1 accelerates re-epithelialization by promoting keratinocyte migration and proliferation during cutaneous wound healing*. Biochem Biophys Res Commun. **2018**, 10, 505(4): 966-972.

Dydak, K.; Junka, A.,F.; Bartoszewicz, M. *Zastosowanie bionanocelulozy do celów medycznych*. LECZENIE RAN. **2017**, 14(1): 13–16.

Ellis, S.; Lin, E.J.; Tartar, D. *Immunology of Wound Healing*. Curr Derm Rep. **2018**, 7: 350–358.

Entschladen, F.; Drell, T.L.; Lang, K.; Masur, K.; Palm, D.; Bastian, P.; Niggemann, B.; Zaenker, K.S. *Analysis methods of human cell migration*. Exp. Cell Res. **2005**, 307: 418–426.

Feldkamp, T.; Kribben, A.; Weinberg, J.M. *Assessment of mitochondrial membrane potential in proximal tubules after hypoxia reoxygenation*. Am J Physiol Ren Physiol. **2005**, 288: 1092–1102.

Han, G.; Ceilley, R. *Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments*. Advances in Therapy. **2017**, 34(3): 599–610.

Kanikireddy, V.; Varaprasad, K.; Jayaramudu, T.; Karthikeyan, C.; Sadiku, R. *Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review*. Int J Biol Macromol. **2020**, 1,164: 963-975.

Karahan, A.; AAbbasoğlu, A.; Işık, S.A.; Çevik, B.; Saltan, Ç.; Elbaş, N.Ö.; Yalılı, A. *Factors Affecting Wound Healing in Individuals With Pressure Ulcers: A Retrospective Study*. Ostomy Wound Manage. **2018**, 64(2): 32-39.

Kolodziejczyk-Czepas, J.; Sieradzka, M.; Moniuszko-Szajwaj, B.; Nowak, P.; Oleszek, W.; Stochmal, A. *Phenolic fractions from nine Trifolium species modulate the coagulant properties of blood plasma in vitro without cytotoxicity towards blood cells*. J Pharm Pharmacol. **2018**, 70: 413–425.

Kumar, S.S.D.; Rajendran, N.K.; Houreld, N.N.; Abrahamse, H. *Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications*. Int J Biol Macromol. **2018**, 115: 165-175.

Lih, E.; Lee, J.S.; Park, K.M.; Park, K.D. *Rapidly curable chitosan-PEG hydrogels as tissue adhesives for hemostasis and wound healing*. Acta Biomater. **2012**, 8(9): 3261-9.

Mosmann, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods. **1983**, 65: 55–63.

Murray, R.Z.; West, Z.E.; Cowin, A.J.; Farrugia, B.L. *Development and use of biomaterials as wound healing therapies*. Burns Trauma. **2019**, 25,7: 2.

Myhre, O.; Andersen, J.M.; Aarnes, H.; Fonnum, F. *Evaluation of the probes 2',7' - dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation*. *Biochem Pharmacol.* **2003**, 65: 1575–1582.

Perea, L.; Cantó, E.; Suarez-Cuartin, G.; Aliberti.; Chalmers, J.D.; Sibila, O.; Vidal, S. *A Cluster Analysis of Bronchiectasis Patients Based on the Airway Immune Profile*. *Chest.* **2021**, 159(5): 1758-1767.

Prasa, D. *The ability of thrombin inhibitors to reduce the thrombin activity generated in plasma on extrinsic and intrinsic activation*. *Thromb Haemost.* **1997**, 77: 498–503.

Ratner, B.D. *Biomaterials: Been There, Done That, and Evolving into the Future*. *Annual Review of Biomedical Engineering.* **2019**, 21(1): 171–191.

Rodrigues, M.; Kosaric, N.; Bonham, C.A.; Gurtner, G. C. *Wound Healing: A Cellular Perspective*. *Physiological Reviews.* **2019**, 99(1), 665706.

Rodríguez-Acosta, H.; Tapia-Rivera, J.M.; Guerrero-Guzmán, A.; Hernández-Elizarraráz, E.; Hernández-Díaz, J.A.; Garza-García, J.J.O.; Pérez-Ramírez, P.E.; Velasco-Ramírez, S.F.; Ramírez-Anguiano, A.C.; Velázquez-Juárez, G.; et al. *Chronic wound healing by controlled release of chitosan hydrogels loaded with silver nanoparticles and calendula extract*. *J Tissue Viability.* **2022**, 31(1): 173-179.

Salvioli, S.; Ardizzoni, A.; Franceschi, C.; Cossarizza, A. *JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis*. *FEBS Lett.* **1997**, 411: 77–82.

Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. *Exp Cell Res.* **1988**, 175: 184–191.

Smigiel, K.S.; Parks, W.C. *Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights*. *Curr Rheumatol Rep.* **2018**, 17, 20(4): 17.

Sun, J.; Tan, H. *Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications*. *Materials (Basel).* **2013**, 26, 6(4): 1285-1309.

Tangsadthakun, C.; Kanokpanont, S.; Sanchavanakit, N.; Pichyangkura, R.; Banaprasert, T.; Tabata, Y.; Damrongsakkul, S. *The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds*. *J Biomat Scien Poly E.* **2007**, 18(2): 147–163.

Torres, P.; Castro, M.; Reyes, M.; Torres, V.A. Histatins, wound healing, and cell migration. *Oral Diseases*. **2018**, 24(7): 1150-1160.

Velier, M.; Magalon, J.; Daumas, A.; Cassar, M.; Francois, P.; Ghazouane, A.; Sabatier, F. *Production of platelet-rich plasma gel from elderly patients under antithrombotic drugs: Perspectives in chronic wounds care*. *Platelets*. **2018**, 29(5): 496-503.

Versteeg, H.H.; Heemskerk, J.W.; Levi, M.; Reitsma, P.H. *New fundamentals in hemostasis*. *Physiol. Rev.* **2013**, 93: 327–358.

Weindl, G.; Schaller, M.; Schäfer-Korting, M.; Kortingm H.C. *Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular, biological, pharmaceutical and clinical aspects*. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2004**, 17: 207–213.

III. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Właściwości biologiczne biomateriałów decydują o możliwości ich zastosowania w medycynie. Dlatego też, ocena właściwości biologicznych biokompozytów powinna stanowić pierwszy bardzo ważny etap ich weryfikacji.

W przedstawionej pracy doktorskiej pt. „Ocena właściwości biologicznych modyfikowanych kompozytów alginianowych oraz chitozanowo-celulozowych jako potencjalnych czynników przyspieszających proces gojenia ran” poddano biologicznej analizie dwie grupy modyfikowanych biokompozytów: chitozanowo-celulozowych i alginianowych.

Badano właściwości biologiczne biomateriałów:

- chitozanowo-celulozowych (CS-f, CS@MCC-f, CS@P-MCC-f, CS@PN-MCC-f, CS@CNC-f, CS@P-CNC-f, CS@PN-CNC-f)
- alginianowych modyfikowanych tlenkami metali (Alg, Alg@(V-O-V)_n, Alg@GeO₂, Alg@(Fe-O-Fe)_n, Alg@ZnO 20:1, Alg@ZnO 10:1, Alg@ZnO 5:1, Alg@ZnO (Cl) 20:1, Alg@ZnO (Cl) 10:1, Alg@ZnO (Cl) 5:1, Alg@(Ti-O-Ti)_n).

Celem pracy była ocena właściwości hemotoksycznych, cytotoksycznych oraz genotoksycznych badanych biokompozytów chitozanowo-celulozowych i alginianowych modyfikowanych tlenkami metali wobec wybranych linii ludzkich komórek skóry i erytrocytów. Ponadto analizowano właściwości biologiczne kompozytów w kontekście działania na poszczególne etapy procesu gojenia ran (wpływ materiałów na zewnętrzny i wewnętrzny szlak aktywacji krzepnięcia krwi, migrację komórek skóry i poziom glikozaminoglikanów).

Badania wykonano na ludzkich erytrocytach i osoczu oraz dwóch adherentnych liniach komórek skóry: ludzkich fibroblastach skóry (BJ) i ludzkich keratynocytach skóry (KERTr).

Wykazano, że rodzaj modyfikacji biokompozytów wpływa na właściwości biologiczne. Biokompozyty chitozanowo-celulozowe wykazywały niewielką toksyczność zarówno względem erytrocytów, jak i komórek skóry oraz nie powodowały znacznych uszkodzeń DNA. Wszystkie kompozyty celulozowe wykazywały działanie prokoagulacyjne wpływając zarówno na wewnętrzny i zewnętrzny szlak krzepnięcia krwi, stanowiący ważny element etapu hemostazy gojenia ran. Kompozyty celulozowe wpływały na migrację zarówno fibroblastów BJ i keratynocytów KERTr, co

może mieć wpływ na przyspieszenie zarastania rany. Ponadto kompozyty: CS@f, CS@MCC-f, CS@P-MCC-f oraz CS@PN-MCC-f powodowały wzrost poziomu glikozaminoglikanów w komórkach, odpowiedzialnych za utrzymywanie odpowiedniego stopnia nawilżenia skóry, utrzymywanie odpowiedniej struktury skóry oraz spajanie naskórka ze skórą właściwą.

W drugiej grupie badanych materiałów tj. biokompozytów alginianowych modyfikowanych tlenkami metali zauważono znaczącą toksyczność względem erytrocytów oraz w większości były one cytotoksyczne względem komórek skóry. Spośród biomateriałów alginianowych wpływ na migrację komórkową oraz właściwości hemostatyczne wykazywały filmy: alginianowy bez modyfikacji (Alg) oraz modyfikowany tlenkiem tytanu (Alg@(Ti-O-Ti)_n).

Przeprowadzone badania *in vitro* dostarczyły istotnych informacji na temat właściwości biologicznych badanych biomateriałów chitozanowo-celulozowych i alginianowych modyfikowanych tlenkami metali. Analiza właściwości hemotoksycznych, hemostatycznych, cytotoxycznych i genotoksycznych oraz wpływ na poziom generowania i uwalniania glikozaminoglikanów i działania na migrację komórek skóry, pozwalają wyselekcjonować najbardziej obiecujące biomateriały do zastosowania w charakterze materiałów medycznych. Wszystkie materiały chitozanowe z modyfikowaną celulozą oraz film alginianowy bez modyfikacji (Alg) i modyfikowany tlenkiem tytanu (Alg@(Ti-O-Ti)_n) mogą być rozważane jako potencjalne opatrunki przyspieszające proces gojenia ran.

Uzyskane wyniki stanowią bazę informacji, która uzupełnia i poszerza dotychczasowy stan wiedzy na temat właściwości materiałów zawierających naturalne polisacharydy.

IV. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

The biological properties of biomaterials determine the possibility of their application in medicine. Therefore, the assessment of the biological properties of biocomposites should be the first, very important stage of their verification. In the presented doctoral thesis entitled „Assessment of biological properties of modified alginate and chitosan-cellulose composites as potential factors accelerating the wound healing proces” two groups of modified biocomposites chitosan-cellulose and alginate were subjected to biological analysis.

The biological properties of the following biomaterials were investigated:

- chitosan-cellulose (CS-f, CS@MCC-f, CS@P-MCC-f, CS@PN-MCC-f, CS@CNC-f, CS@P-CNC-f, CS@PN-CNC-f)
- alginate modified with metal oxides (Alg, Alg@(V-O-V)_n, Alg@GeO₂, Alg@(Fe-O-Fe)_n, Alg@ZnO 20:1, Alg@ZnO 10:1, Alg@ZnO 5:1, Alg@ZnO (Cl) 20:1, Alg@ZnO (Cl) 10:1, Alg@ZnO (Cl) 5:1, Alg@(Ti-O-Ti)_n).

The aim of the study was to evaluate the hemotoxic, cytotoxic and genotoxic properties of the tested chitosan-cellulose and alginate biocomposites modified with metal oxides against selected human cultured skin cells and erythrocytes. In addition, the biological properties of the composites were analyzed in the context of their action on individual stages of the wound healing process (the influence of materials on the extrinsic and intrinsic pathway of blood clotting activation, skin cell migration and the level of glycosaminoglycans).

The studies were performed on human erythrocytes and plasma, and on two adherent skin cell lines: human skin fibroblasts (BJ) and human skin keratinocytes (KERTr).

It has been shown that the type of biocomposites modification affects their biological properties. Chiotosan-cellulose biocomposites showed low toxicity to erythrocytes and skin cells and did not cause significant DNA damage. All cellulose composites showed a procoagulant effect, influencing both the intrinsic and extrinsic pathways of blood coagulation, which is an important element of the hemostasis stage of wound healing. Cellulose composites influenced the migration of both BJ fibroblasts and KERTr keratinocytes, which may have an impact on the acceleration of wound overgrowth. In addition, the composites: CS@f, CS@MCC-f, CS@P-MCC-f and CS@PN-MCC-f increased the level of glycosaminoglycans in cells, which are responsible for maintaining

an appropriate level of skin hydration, an appropriate skin structure and bonding the epidermis with the dermis.

In the second group of tested materials, i.e. alginate biocomposites modified with metal oxides, significant toxicity to erythrocytes causing hemolysis was noticed, and most of them were cytotoxic. Among alginate biomaterials, the alginate film without modification - Alg and Alg@(Ti-O-Ti)_n had an influence on cell migration and hemostatic properties.

The *in vitro* tests performed provided a wide range of information on the biological properties of the studied chitosan-cellulose and alginate biomaterials modified with metal oxides. The analysis of hemotoxic, hemostatic, cytotoxic and genotoxic properties of these materials as well as their influence on the generation and release of glycosaminoglycans and the effect on skin cell migration allow to select the most promising biomaterials for use as a medical material. All chitosan materials with modified cellulose and alginate film without modification - Alg and modified with titanium oxide Alg@(Ti-O-Ti)_n can be considered as potential dressings accelerating the wound healing proces.

The obtained results supplement and extend the current knowledge on the properties of materials containing natural polysaccharides.

V. DOROBEK NAUKOWY

PUBLIKACJE

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. **Kędzierska Marta**, Miłowska Katarzyna* (2019) Zastosowanie biomateriałów na bazie chitozanu w leczeniu trudno gojących się ran. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 73: 768-781.
Praca pogładowa
Punkty MNiSzW₂₀₁₉: **40**
Impact Factor: **0,878**
2. Blilid Sara, **Kędzierska Marta**, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365.
Praca oryginalna
Punkty MNiSzW₂₀₁₉: **140**
Impact Factor: **8, 198**
3. **Marta Kędzierska***, Sara Blilid, Katarzyna Miłowska, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Mohammed Lahcini, Abdelkrim El Kadib, Maria Bryszewska (2021) Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films. *International Journal of Molecular Sciences*, 22,11386
Praca oryginalna
Punkty MEiN₂₀₂₁: **140**
Impact Factor: **5,924**
4. **Marta Kędzierska***, Nisrine Hammi, Joanna Kolodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Maria Bryszewska, Katarzyna Miłowska, Abdelkrim El Kadib* (2022) Glassy-like Metal Oxide Particles Embedded on Micrometer Thicker Alginate Films as Promising Wound Healing Nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5585.
Praca oryginalna
Punkty MEiN₂₀₂₂: **140**
Impact Factor: **5,924**

Pozostałe publikacje:

5. Wojcieszak Jakub, Andrzejczak Dariusz, **Kedzierska Marta**, Miłowska Katarzyna, Zawilska Jolanta (2018) Cytotoxicity of α -Pyrrolidinophenones: an Impact of α -Aliphatic Side chain Length and Changes in the Plasma Membrane Fluidity. *Neurotoxicity Research*, 34:613-626.

Praca oryginalna

Punkty MNiSzW₂₀₁₆: **25**

Impact Factor: **3,311**

6. Wrońska Natalia, Anouar Aicha, El Achab Mounir, Zawadzka Katarzyna, **Kędzierska Marta**, Miłowska Katarzyna, Katir Nadia, Draoui Khalid, Różalska Sylwia, Piwoński Ireneusz, Bryszewska Maria, El Kadib Abdelkrim, Lisowska Katarzyna (2020) Chitosan-Functionalized Graphene Nanocomposite Films: Interfacial Interplay and Biological Activity. *Materials*, 13:998.

Praca oryginalna

Punkty MNiSzW₂₀₁₉: **140**

Impact Factor: **3,623**

7. Wrońska Natalia, Katir Nadia, Miłowska Katarzyna, Hammi Nisrine, Nowak Marta, **Kędzierska Marta**, Anouar Aicha, Zawadzka Katarzyna, Bryszewska Maria, El Kadib Abdelkrim, Lisowska Katarzyna (2021) Antimicrobial Effect of Chitosan Films on Food Spoilage Bacteria. *International Journal of Molecular Science*, 22:5839.

Praca oryginalna

Punkty MNiSzW₂₀₁₉: **140**

Impact Factor: **5,542**

8. Naziris Nikolaos, Pippa Natassa, Sereti Evangelia, Chrysostomou Varvara, **Kędzierska Marta**, Kajdanek Jakub, Ionov Maksim, Miłowska Katarzyna, Balcerzak Łucja, Garofalo Stefano, Limatola Cristina, Pispas Stergios, Dimas Konstantinos, Bryszewska Maria, Demetzos Costas (2021) Chimeric Stimuli-Responsive Liposomes as Nanocarriers for the Delivery of the Anti-Glioma Agent TRAM-34. 2021. *International Journal of Molecular Science*, 22: 6271.

Praca oryginalna

Punkty MEiN₂₀₂₁: **140**

Impact Factor: **5,542**

- 9. Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna (2021) Silver nanoparticles- possible applications and threats. *Acta Universitatis Lodzensis, Folia Biologica et Oecologica*, 17:14-31.**

Praca pogładowa

Punkty MEiN₂₀₂₁: **20**

Impact Factor: -,

Sumaryczny IF: 38,942 (925 pkt MEiN)

DONIESIENIA ZJAZDOWE

Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna. *Zastosowanie nanocząstek srebra w procesie gojenia ran*. VI Konferencja Biologii Molekularnej, 6-8.04. 2017, Łódź.

Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna. *Wpływ nanocząstek srebra na komórki modelowe B14*. X Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL, 17-18.03.2018, Lublin.

Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna, El Kadib Abdelkrim, Bryszewska Maria. *Biofilmy polisacharydowe- ocena właściwości hemolitycznych*. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Innowacyjne Polimery w Medycynie”, 18.05.2018, Łódź.

Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna, Bryszewska Maria. *Biokompozyty chitozanowe i alginianowe-wpływ na erytrocyty człowieka*. IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, 24-25.05.2018, Łódź.

Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna. *Ocena cytotoksyczności srebra koloidalnego modyfikowanego dendronami karbokrzemowymi*. II Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat, 21-22.06.2018, Łódź.

Kędzierska Marta, Figat Katarzyna, Miłowska Katarzyna. *Wpływ rotenonu na erytrocyty człowieka – ochronna rola dendrymerów*. II Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat, 21-22.06.2018, Łódź.

Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna. *Biokompozyty chitozanowe modyfikowane tlenkiem grafenu jako potencjalny materiał opatrunkowy- ocena właściwości hemolitycznych*. XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL, 23-24.03.2019, Lublin.

Kędzierska Marta, Kołodziejczyk-Czepas Joanna, Miłowska Katarzyna. *Ocena właściwości hemolitycznych i hemostatycznych biomateriałów chitozanowych modyfikowanych grafenem i celulozą jako czynników przyspieszających proces gojenia ran*. V Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, 30-31.05.2019, Łódź.

Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna. *Wpływ budowy wybranych nanocząsteczek na oddziaływanie z α -synukleina*. III Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat, 13-14.06.2019, Łódź.

Kędzierska Marta, Kołodziejczyk-Czepas Joanna, Miłowska Katarzyna. *Ocena właściwości hemolitycznych i hemostatycznych nanokompozytów chitozanowych modyfikowanych celulozą jako potencjalnych czynników przyspieszających proces gojenia ran*. III Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat, 13-14.06.2019, Łódź.

Kędzierska Marta, El Kadib Abdelkrim, Miłowska Katarzyna. *Biological properties of chitosan-graphene nanocomposites*. XVII Conference of the Polish Biophysical Society 24-27.06.2019, Olsztyn.

Kędzierska Marta, Kołodziejczyk-Czepas Joanna, Miłowska Katarzyna. *Biokompozyty chitozanowe modyfikowane tlenkiem grafenu - ocena właściwości hemolitycznych, hemostatycznych oraz cytotoksyczności*. Sympozjum Biomedyczne ESKULAP, 30.11.2019, Lublin.

Kędzierska Marta, Kołodziejczyk-Czepas Joanna, Miłowska Katarzyna. *Właściwości biofizyczno-biochemiczne kompozytów chitozanowo-grafenowych modyfikowanych srebrem*. XII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL2020, Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju, 24-27.09.2020, Lublin.

Kędzierska Marta, El Kadib Abdelkrim, Miłowska Katarzyna. *Effect of silver-doped chitosan- Graphene composites on human blood and skin cells*. International Young Scientists Conference on Molecular and Cell Biology, 25-26.02.2021, Warszawa.

Kędzierska Marta, El Kadib Abdelkrim, Miłowska Katarzyna. *Ocena cytotoksyczności i genotoksyczności biomateriałów chitozanowo-celulozowych jako potencjalnych czynników przyspieszających proces gojenia ran*. XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL2021 Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju, 25-28.03.2021, Lublin.
Wygłoszenie referatu w formie ustnej.

Kędzierska Marta, Katarzyna Miłowska. *Określenie cytotoksyczności nanosrebra opłaszczanego dendronami karbokrzemowymi względem komórek linii B14*. VI Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, 15-16.04.2021, Łódź.

Kędzierska Marta, Okła Elżbieta, Miłowska Katarzyna, Ramirez Ramirez Gomes, de la Mata Francisco Javier, Bryszewska Maria. *Dendrymery jako nośniki siRNA - tworzenie dendrypleksów*. IX Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna EUREKA, 10.06.2021, Grodziszcz. **Wygłoszenie referatu w formie ustnej.**

Kędzierska Marta, El Kadib Abdelkrim, Miłowska Katarzyna. *Wpływ biokompozytów alginianowo- chitozanowych modyfikowanych tlenkami metali na żywotność ludzkich komórek skóry*. I Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów

Uniwersytetu Szczecińskiego MKDUS 2.0, 23-25.06.2021, Szczecin. **Wygłoszenie referatu w formie ustnej.**

DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA

PROJEKTY BADAWCZE

- Stypendystka w projekcie międzynarodowym finansowanym przez NCN w ramach konkursu M-ERA NET 2 pt.: „Transfer nanocząsteczek przez barierę śródbłonkową” o akronimie NanoTENDO (UMO-2018/30/Z/NZ1/00911); grudzień 2020 r. -listopad 2021r. Zatrudnienie w ramach rozstrzygnięcia konkursu.

STAŻE NAUKOWE

- Staż naukowy w Universidad de Alcalá (Alcalá de Henares, Hiszpania) w ramach międzynarodowego projektu finansowanego przez NAWA pt.: „Działania wzmacniające i upowszechniające międzynarodowe partnerstwo Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska na rzecz interdyscyplinarnych badań i innowacji Uniwersytetu Łódzkiego” o akronimie EUROPARTNER (PPI/APM/2018/1/00007/U/001); 29 czerwca-14 lipca 2019r.
- Staż naukowy w Fundación para la Investigación Biomedica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (Madryt, Hiszpania) w ramach międzynarodowego projektu finansowanego przez NAWA pt.: „Działania wzmacniające i upowszechniające międzynarodowe partnerstwo Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska na rzecz interdyscyplinarnych badań i innowacji Uniwersytetu Łódzkiego” o akronimie EUROPARTNER (PPI/APM/2018/1/00007/U/001); 15 lipca- 28 lipca 2019r.

INNE OSIĄGNIĘCIA

- Dyplom za najlepszy poster w kategorii nauk medycznych i nauk o zdrowiu podczas X Interdyscyplinarnej Konferencji Naukowej TYGIEL „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, 17-18.03.2018, Lublin.
- Laureat konkursu dla doktorantów i studentów na dofinansowanie udziału w IV Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen 2018, zorganizowanego przez Polskie Towarzystwo Biofizyczne.

DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA I PROMOCYJNA

- Pełnienie funkcji przedstawiciela doktorantów w Wydziałowej Komisji ds. Jakości Studiów Doktoranckich (2019 – 2021)
- Przygotowanie warsztatów w ramach Nocy biologów w latach 2018- 2020
- Festiwal Nauki Techniki i Sztuki w latach 2017, 2019
- Współorganizacja i współprowadzenie warsztatów dla uczniów Szkół Podstawowych i Ponadpodstawowych (2019)
- Współorganizacja i współprowadzenie warsztatów w ramach Instytutu Kreatywnej Biologii (2019)
- Współorganizacja i współprowadzenie V i VI Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen w latach 2019, 2021
- Promocja studiów doktoranckich w ramach II Dnia Doktoranta Uniwersytetu Łódzkiego (2018) i I Dniu Nauki (2019)
- Członek Polskiego Towarzystwa Biofizycznego w latach 2018 - 2022

**VI. KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Received: 20.05.2019
Accepted: 23.10.2019
Published: 30.12.2019

Zastosowanie biomateriałów na bazie chitozanu w leczeniu trudno gojących się ran

The use of chitosan-based biomaterials for the treatment of hard-healing wounds

Marta Kędzierska, Katarzyna Miłowska

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej, Łódź

Streszczenie

Gojenie się ran to złożony proces, w którym uczestniczą komórki skóry, krew, układ odpornościowy oraz wiele krążących w organizmie substancji. Infekcja, zanieczyszczenie rany czy rozległy obszar uszkodzenia komplikują i opóźniają naturalny proces regeneracji skóry. Trudno gojące się rany to coraz powszechniejszy problem, gdyż mogą znacznie upośledzać jakość życia pacjenta. Z tego względu niezwykle istotne jest poszukiwanie nowych czynników (leków, opatrunków czy innych substancji aktywnych), które mogłyby przyspieszyć i złagodzić proces gojenia się ran. Spośród wielu związków, będących w kręgu zainteresowania inżynierii medycznej, uwagę należy zwrócić na naturalne polisacharydy np. chitozan i alginan. Artykuł poświęcony jest biomateriałom, które odgrywają istotną rolę w leczeniu ran przewlekłych. Należą do nich: hydrogele, włókniny, błony i gąbki chitozanowe oraz kompozyty chitozanowo-alginianowe, czy kompozyty chitozanowe połączone z tlenkiem cynku i nanosrebrem. Materiał zawierający chitozan jako bazę, działa na wszystkich etapach procesu gojenia. Przeprowadzono wiele badań zarówno *in vitro*, *in vivo* oraz badań klinicznych dających podstawy do stosowania materiałów chitozanowych jako substytutu konwencjonalnych bandażu i opatrunków. Materiały te w stadium hemostazy przyspieszają agregację płytek i tworzenie skrzepu fibrynowego. W stadium zapalnym powodują proliferację neutrofili i makrofagów, które oczyszczają ranę, uwalniając cytokiny w miejscu zranienia. W końcowym etapie mechanizmu gojenia chitozan naśladuje natywną macierz zewnątrzkomórkową, zapewniając optymalne środowisko rany.

Słowa kluczowe:

gojenie ran • rany przewlekłe • biomateriały • biokompozyty chitozanowe • biokompozyty chitozanowo-alginianowe

Summary

Wound healing is a complex process that engages skin cells, the blood, the immune system and a number of circulating substances in the body. Infections, contamination of the wound or a vast area of damage complicate and delay the natural process of skin regeneration. The incidence of hard-to-heal wounds is an increasingly common problem, because they can significantly impair the quality of life of the patient. For this reason, it is extremely important to look for factors (drugs, dressings or other substances) that could accelerate and relieve wound healing. Among many compounds in the area of medical engineering interest, attention should be paid to natural polysaccharides, e.g. chitosan and alginate. This article is devoted to biomaterials that play an important role in the treatment of chronic wounds. These include the following: hydrogels, non-wovens, membranes and chitosan sponges as well as chitosan-alginate composites or chitosan composites combined with zinc oxide and nanosilver. The

	material, which has chitosan as a base, works on all stages of the healing process. Many <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> and clinical studies that provide the basis for using chitosan materials as a substitute for conventional bandages and dressings have been carried out. At the stage of hemostasis, it accelerates platelet aggregation and the formation of a fibrin clot. In the inflamed stage, they cause the proliferation of neutrophils and macrophages that cleanse the wound, releasing cytokines at the wound site. Studies have shown that chitosan mimics the native extracellular matrix, providing the optimal microenvironment for the wound.
Keywords:	wound healing • chronic wound • biomaterials • chitosan biocomposites • chitosan-alginate biocomposites
GICID	01.3001.0013.6823
DOI:	10.5604/01.3001.0013.6823
Word count:	7720
Tables:	1
Figures:	4
References:	113

Adres autorki: dr hab. Katarzyna Miłowska, Katedra Biofizyki Ogólnej Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236, Łódź; e-mail: katarzyna.milowska@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **ACF-HS** – hydrożele na bazie alginianu, chitozanu oraz fukoidyny (polisacharyd siarczanowy występujący głównie u wodorostów) (alginate, chitin/chitosan and fucoidan – hydrocolloidsheet), **CCA** – kompleks chitozan-kolagen-alginian (chitosane-collagen-alginate complex), **CD31** – kłaster (białko) różnicowania 31 (cluster of differentiation 31), **CECS/PVA** – karboksymetylochitozan/alcohol poliwinylowy (carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)), **ECM** – macierz pozakomórkowa (extracellular matrix), **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor), **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor), **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i małe makrofagów (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), **HB-EGF** – wiążący heparynę czynnik EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor), **IL-1, IL-6, IL-12** – interleukina-1, -6, -12 (interleukin-1, -6, 12), **KGF** – czynnik wzrostu keratynocytów 6 (keratinocyte growth factor), **L929** – linia komórkowa mysich fibroblastów (mouse fibroblast cell line), **MTT** – bromek 3-(4,5-dimetylotriazo-2-yl)-2,5-difenylotetrazolu (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide), **NCz Ag** – nanoczątki srebra (silver nanoparticles), **NCz** – nanocząstki (nanoparticles), **NR** – test żywotności z czerwienią obojętną (neutral red), **PDGF** – czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (platelet derived growth factor), **PEC** – kompleks polielektrolitu chitozan-alginian (chitosan-alginate polyelectrolyte complex), **PEGDA** – diakryl anglikolu polietylenowego (polyethylene glycol diacrylate), **PVA** – alcohol poliwinylowy (polyvinyl alcohol), **SDF-1** – zrębowy czynnik wzrostu (stromal cell-derived factor 1), **SEM** – skaningowy mikroskop elektronowy (scanning electron microscope), **TGF-α** – czynnik wzrostu fibroblastów-α (transforming growth factor-α), **TGF-β** – czynnik wzrostu fibroblastów-β (transforming growth factor β), **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor-α), **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej (vascular endothelial growth factor), **ZnO** – tlenek cynku (zinc oxide).

WSTĘP

Inżynieria biomedyczna jest zaliczana do głównych czynników decydujących o postępie i rozwoju współczesnej medycyny i nauki. Dlatego coraz więcej naukowców na całym świecie interesuje się tematyką związaną z poszczególnymi jej dziedzinami. Wiele możliwości biomedycznych pozwala na rozwiązanie problemów medycznych, z którymi borykano się od lat. Rozwój i unowocześnianie wszelkich badań, aparatury i materiałów, a także opracowanie praktycznego ich wykorzystania, pozwalają codziennie ratować życie wielu osobom. Jednym z interdyscyplinarnych problemów

współczesnej medycyny jest proces gojenia ran przewlekłych. Rany przewlekłe dotyczą najczęściej osób w podeszłym wieku. Wskaźnik częstotliwości ich występowania stale wzrasta ze względu na starzenie się społeczeństwa, a zwiększa się wraz z wiekiem pacjentów [26, 28]. „Niegojące” rany dotyczą pacjentów chorujących na miażdżycę naczyń obwodowych, diabetyków ze stopą cukrzycową i osób unieruchomionych z odleżynami [79]. Inżynieria biomateriałów dotyczy wytwarzania i badania materiałów biozgodnych. Zajmuje się wytwarzaniem nowych materiałów oraz klasyfikacją istniejących, które mogą m.in. mieć zastosowanie jako opatrunki w procesie gojenia ran [57].

RANY PRZEWLEKŁE

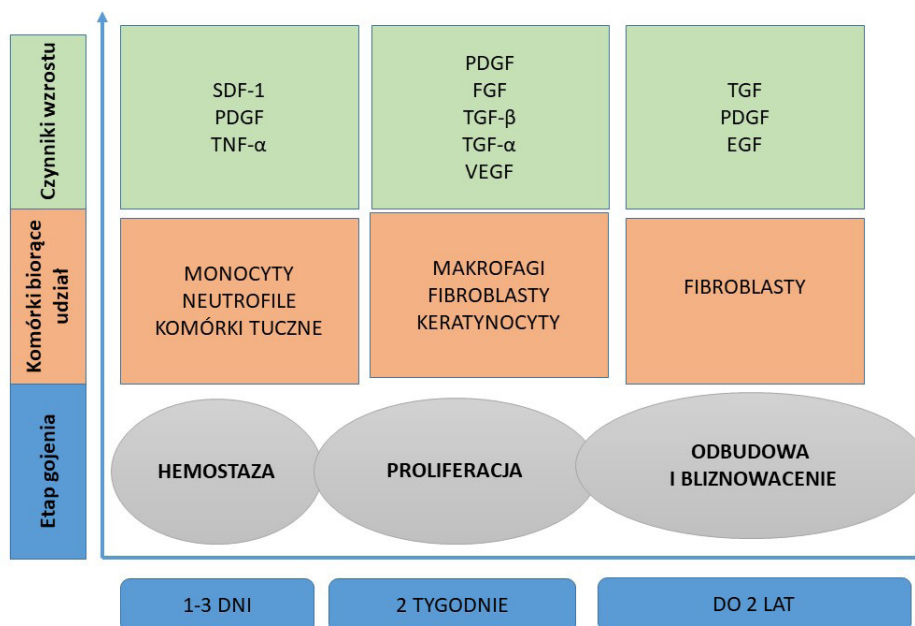
Pojęcie rany oznacza naruszenie ciągłości morfologicznej tkanki prawidłowej. Najczęściej jest związane z przerwaniem zewnętrznej powłoki ciała i krwawieniem. Raną przewlekłą nazywa się ranę utrzymującą się dłużej niż 1,5 miesiąca. Powstawanie trudno gojącego schorzenia może być skutkiem chorób i zaburzeń związanych z częściowym ograniczeniem prawidłowego przepływu krwi w naczyniach krwionośnych [46, 85]. Powikłaniem niedostatecznego zaopatrzenia tkanek w składniki odżywcze i tlen są zmiany troficzne skóry, powodujące naruszenie metabolizmu komórkowego i martwicę. Powstałe w ten sposób owrzodzenie, nieleczone bądź leczone w niewłaściwy sposób może proliferować w głąb tkanek, prowadząc do zakażenia [44].

GOJENIE RAN

W procesie gojenia ran można wyróżnić dwa systemy naprawy. Pierwszy to gojenie, w wyniku którego następuje odbudowa zranionej tkanki i powstanie blizny. Tkanka po gojeniu nie może już spełniać wszystkich funkcji jakie pełniła tkanka prawidłowa i charakteryzuje się zmienioną budową histologiczną. Taki proces gojenia zachodzi u większości ssaków, w tym człowieka. Drugim występującym tylko u nielicznych gatunków ssaków jest proces regeneracji, który – w przeciwieństwie do gojenia – pozwala odtworzyć tkankę o pełnej funkcjonalności bez wytworzenia blizny. Regeneracja jest charakterystyczna dla bezkręgowców [6, 12]. Cały proces gojenia rany jest niezwykle złożonym łańcuchem reakcji biochemicznych zachodzących w określonych warunkach. Jego prawidłowy przebieg jest możliwy dzięki obecności wielu

typów komórek, odpowiednich elementów morfotycznych, czynników molekularnych i cytokin (Ryc. 1) [16, 71]. Naruszenie ciągłości tkanek jest idealnym miejscem do wniknięcia drobnoustrojów w związku z czym proces ten powinien zachodzić szybko i dokładnie.

Mechanizm gojenia można podzielić na trzy główne fazy: oczyszczanie (hemostaza), proliferacja (migracja) komórek oraz odbudowa czyli generowanie białek i obkurczanie rany wraz z wytwarzaniem blizny [56]. Z uszkodzeniem powłoki ciała wiąże się przerwanie naczyń krwionośnych i krwawienie, będące nierozłącznym elementem zranienia. Dochodzi do hemostazy i stanu zapalnego. Hemostaza, której głównym celem jest wytworzenie czopu płytkowego, zabezpieczającego ranę przed czynnikami zewnętrznymi oraz zahamowującego krwawienie, rozpoczyna się natychmiast po zranieniu. Podczas tworzenia skrzepu generowane są następujące czynniki: SDF-1, PDGF oraz TNF- α . W tym samym czasie do miejsca tworzenia czopu dyfundują monocyty, neutrofile i mastocyty. Skrzep jest jedynie chwilową strukturą, umożliwiającą migrację biomolekuł oraz bazą składowych czynników gojenia rany [61]. Główna rola w mechanizmie gojenia przypada czynnikowi PDGF, generowanemu przez trombocyty. Istotą jego obecności jest aktywacja fibroblastów i makrofagów, wywołujących dalszy etap procesu naprawy tkanki tworząc macierz zewnątrzkomórkową (ECM) [4, 8]. Następny etap to proliferacja komórkowa i odbudowa tkanki łącznej zawierającej włókna kolagenowe. Komórkami warunkującymi przejście z fazy oczyszczania do fazy namnażania komórek są makrofagi. Szczególną rolę w stymulacji powstania tkanki włóknistej odgrywają cytokiny oraz następujące czynniki wzrostu: PDGF, HGF,



Ryc. 1. Fazy gojenia rany

FGF, TGF- β , TGF- α i VEGF. Etap proliferacji polega na tworzeniu podkładu zwanego ziarniną, na którym zostanie zrekonstruowany właściwy naskórek. W ciągu 2 tygodni od zranienia dochodzi do aktywności komórek tłuszczowych, które stymulują gwałtowne namnażanie się keratynocytów i fibroblastów. Wpływ na odtworzenie naskórka mają cytokiny i białka: IL-1, IL-6, FGF, HGF, KGF, GM-CSF. Podłoże tworzące bazę do odbudowy naskórka składa się z nieściślej sieci włókien kolagenowych, glikoproteiny zawartej w macierzy pozakomórkowej (fibronektyny) oraz kwasu hialuronowego. Integralnym procesem fazy proliferacji jest angiogeneza [47, 48, 77]. W końcowej fazie mechanizmu gojenia rany następuje restrukturalizacja macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wytwarzanie kolagenu typu I. Dochodzi do całkowitego zamknięcia rany z udziałem kurczliwych miofibroblastów [47].

CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK I CZYNNIKÓW WZROSTU

Proces zamykania rany jest łańcuchem następujących po sobie reakcji zależnych od swoistych komórek i czynników wzrostu. Istotnymi w omawianym procesie są komórki macierzyste naskórka, szpiku, tkanki tłuszczowej oraz komórki progenitorowe melanocytów, komórki śródbłonna czy też fibroblasty [78]. Aktywnych jest też wiele czynników wzrostu należących do odpowiednich rodzin. Pierwszą rodziną są czynniki PDGF (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-DD), mające największy wpływ na zamykanie rany [47]. Drugą rodziną są białka EGF, pełniące funkcję regulatorową w namnażaniu keratynocytów. Do najważniejszych należą: EGF, TGF- α , HB-EGF [108], następnie liczna rodzina FGF. Tworzą ją polipeptydy (od FGF-1 do FGF-22), odpowiedzialne za stymulację proliferacji keratynocytów i fibroblastów. Ostatnią rodzinę tworzą peptydy VEGF. Poznano cztery formy: VEGF (A, B, C, D), których główną funkcją jest indukcja angiogenezy i waskulogenezy. Wiadomo już, że czynniki VEGF przyczyniają się do regulacji włókien kolagenowych, a tym samym są istotne w powstawaniu blizny [47]. Ważnymi stymulatorami proliferacji fibroblastów są cytokiny prozapalne IL-6. Badania dowodzą, że IL-6 uczestniczy również w procesie bliznowacenia [96].

TWORZENIE BLIZNY

Blizną nazywa się tkankę zastępczą zabudowującą powłokę ciała po urazie. Rozpoczęcie tworzenia blizny jest możliwe wtedy, gdy podczas angiogenezy oraz odtworzenia zewnątrzkomórkowej macierzy dochodzi do zamknięcia rany. Wówczas rozpoczyna się etap utworzenia i remodelingu tkanki zastępczej związany z syntezą i migracją włókien kolagenowych. Należy wspomnieć, że szczególną funkcję w skórze odgrywa kolagen. Jest to jedno z najważniejszych białek tkanki łącznej, które nadaje skórze elastyczność i wytrzymałość. Za wytwarzanie kolagenu są odpowiedzialne fibroblasty, jednak w regulacji syntezy udział biorą TGF, PDGF oraz EGF. Białko to stanowi prawie 50% budowy blizny. Białka kolagenowe są zbudowane z trzech łańcuchów polipeptydowych przybierających konformację superhe-

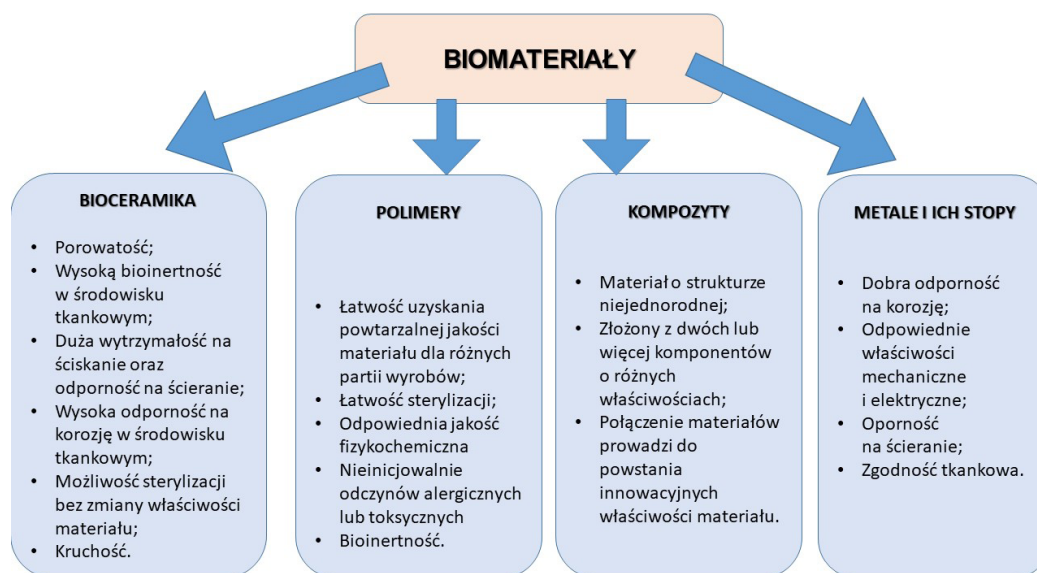
lis. Swoiste dla ich budowy aminokwasowej jest podobny skład aminokwasów zasadowych i kwaśnych [91]. Wyróżnia się wiele odmian kolagenu, klasyfikowanych na podstawie długości, kształtu i wymiaru domeny heliakalnej. W bliznowaceniu szczególną rolę odgrywa kolagen fibrylarny typu I [33]. Miejszem rozpoczęcia biosyntezy jest retikulum endoplazmatyczne, gdzie powstają łańcuchy α prokolagenu. Następnie jest on transportowany do siateczki śródplazmatycznej, gdzie ulega modyfikacjom potranslacyjnym. Następuje eksport cząsteczek prokolagenu po transformacji w kolagen zamknięty w pęcherzykach z aparatu Golgiego do przestrzeni pozakomórkowej. Dochodzi do łączenia się białek i tworzenia coraz bardziej złożonych struktur włókien kolagenowych [39, 80]. Wspomniane włókna są ściśle upakowywane w obrębie naprawianego miejsca i z czasem ulegają degradacji pod wpływem metaloproteinaz macierzy. Przebudowa blizny to etap trwający nawet do 2 lat, a ostatecznym wynikiem jest odbudowa zranionego miejsca z maksymalnie 70% wytrzymałością w stosunku do skóry prawidłowej [25].

ZAKAŻENIA

Trudnym problemem prawidłowego gojenia zaburzeń ciągłości powłoki ciała jest możliwość ich zainfekowania. Ekspozycja rany na otoczenie naraża na wniknięcie drobnoustrojów zaburzających prawidłową odbudowę tkanki, jak również patologiczne zmiany w jej obrębie. Niejałowe środowisko zaburzenia jest źródłem zakażeń drobnoustrojami, jednak główną przyczyną powikłań jest flora bakteryjna pacjenta. Do bakterii najczęściej przyczyniających się do patofizjologii urazu zalicza się gronkowca złocistego, gronkowce koagulazoujemne, enterokoki i inne bakterie. Mikroorganizmami wywołującymi zakażenia są również grzyby oportunistyczne. Ze względu na coraz większą oporność drobnoustrojów na antybiotyki, stosowanie niektórych metod leczenia nie jest wystarczające. Ryzyko wystąpienia infekcji i rozwoju jej negatywnych następstw skłania do badań nad udoskonalaniem i tworzeniem nowych metod terapeutycznych - w tym wykorzystujących nanotechnologię [22].

GOJENIE RAN PRZEWLEKŁYCH

Rany przewlekłe z owrzodzeniami są bardzo trudne w leczeniu, podstawą jest diagnostyka i rozpoczęcie właściwego leczenia przyczynowego, które jest wieloetapowe. Opatrunek powinien charakteryzować się różnymi właściwościami w poszczególnych etapach gojenia. W fazie oczyszczania powinien wchłaniać wydzielinę z rany oraz zabezpieczać przed wniknięciem drobnoustrojów wywołujących zakażenia. Na etapie ziarninowania odpowiada za tworzenie sprzyjającego, wilgotnego środowiska namnażania komórek, generowania białek i obkurczania rany. W ostatniej fazie bliznowacenia powinien utrzymywać optymalną wilgotność i ochraniać nowo powstały naskórek. Tak szerokie zapotrzebowanie na różne właściwości opatrunków wymagałoby stosowania innych materiałów w poszczególnych fazach gojenia. Inżynieria biomedyczna podjęła działania mające na



Ryc. 2. Podział biomateriałów z uwzględnieniem ich właściwości

celu stworzenie materiału idealnego, mającego wszystkie wymagane właściwości opatrunku, które będą zapewniały ochronę i skuteczniejsze leczenie ran w różnych stopniach ich zaawansowania, a jednocześnie spełnią rolę nośnika substancji leczniczej [86, 93, 97].

BIOBATERIAŁY

Biomateriałem nazywa się naturalny materiał biogodny, czyli mogący podlegać długotrwałemu kontaktowi z żywymi tkankami oraz płynami ustrojowymi bez szkodenia organizmowi. Funkcją biomateriału jest częściowe lub całkowite zastępowanie tkanki lub organu i pełnienie ich funkcji w organizmie [27]. Biomateriały są specyficzną grupą materiałów o różnym składzie, budowie i właściwościach. Biomateriał to substancja inna niż lek, która może być użyta na stałe bądź czasowo jako część lub całość systemu.

Biomateriały znalazły zastosowanie w medycynie m.in. jako: implanty kostne, implanty w dentystyce (implanty zębów, mostki, korony) i jako podstawowy dodatek do modyfikacji i ulepszenia istniejących materiałów dentystycznych, stabilizatory złamań kości, kręgosłupa i sztuczne protezy moczopłciowe, stawów i naczyń krwionośnych, soczewki kontaktowe, materiały wykorzystywane w laryngologii oraz materiały w chirurgii twarzowo-szczękowej [1, 10, 32, 60, 82]. Ze względu na szerokie zastosowania materiałów naukowcy ciągle pracują nad ich unowocześnieniem i opracowaniem nowych biomateriałów. Na Ryc. 2 przedstawiono podział istniejących dotychczas biomateriałów [59, 72].

Ważną grupą biomateriałów są także te, które wspomagają proces gojenia ran. Opatrunki z biomateriałów powinny być wykonane ze specjalnych biodegradowalnych polimerów, będących dobrymi promotorami wchłaniania substan-

cji czynnej (Ryc. 3) [17, 76, 99]. Różnorodność rodzajów ran spowodowała opracowanie wielu opatrunków z nowymi produktami, często wprowadzanymi w celu ukierunkowania procesu gojenia. Idealny opatrunek powinien doprowadzić do szybkiego gojenia przy możliwie niskich kosztach i najmniejszych niedogodnościach dla pacjenta. W artykule przedstawiono przegląd powszechnych materiałów stosowanych do ran oraz nowych technologii w celu przyspieszenia procesu gojenia [14, 50, 55, 76].

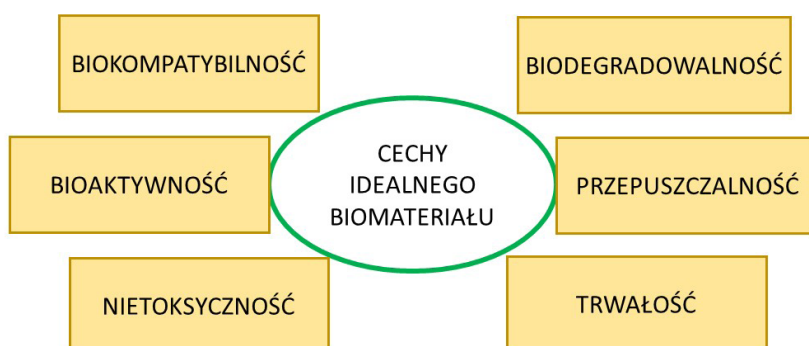
BIOBATERIAŁY CHITOZANOWE

Chityna i chitozan są najczęściej występującymi naturalnymi polimerami, zajmującymi drugie miejsce po celulozie. Chityna jest zwykle pozyskiwana ze źródeł naturalnych, takich jak: zewnętrzne pancerze skorupiaków morskich, zewnętrzne szkielety insektów czy ściany komórkowe grzybów. Chitozan to polisacharyd zbudowany z części deacetylowanej (β -[1,4]-d-glukozamina) i części acetylowanej (N-acetylo-d-glukozamina), uzyskiwany w wyniku częściowej deacetylacji chityny (Ryc. 4) [88, 105].

Związek jest nietoksyczny, biokompatybilny oraz biodegradowalny. Stosunkowo łatwo poddaje się obróbce z możliwością tworzenia różnych form, a także jest modyfikowalny chemicznie i enzymatycznie. Te podstawowe właściwości sprawiają, że chitozan znajduje zastosowanie w medycynie oraz różnych gałęziach przemysłu. Jednym z kierunków badań jest wykorzystanie tego wielocukru jako składowej materiałów opatrunkowych.

WŁÓKNINY CHITOZANOWE

Ze względu na łatwość, szybkość i wydajność produkcji nanowłókien w wyniku elektroprzędzenia wodnego, polegającego na przykładaniu wysokiego napięcia do elektrycznie naładowanej cieczy wyprodukowano bio-



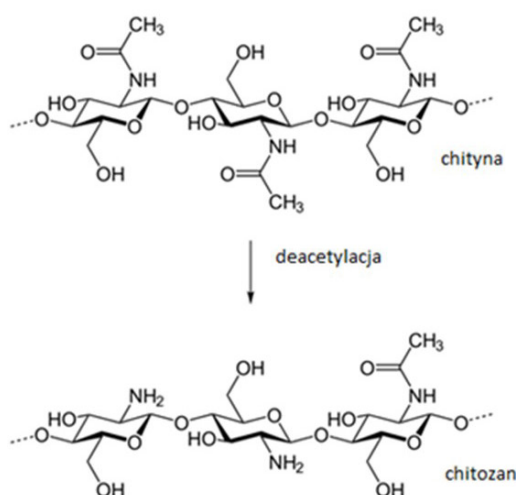
Ryc. 3. Właściwości idealnego biomateriału

kompatybilne włókna karboksymetylochitozan/(alkohol poliwinylowy) CECS/PVA. Powstałe włókniste maty potencjalnie mają być zastosowane jako rusztowanie w procesie regeneracji skóry. Przeprowadzono badania *in vitro* na fibroblastach mysich, linia komórkowa L929, w celu oceny cytotoksyczności [112]. Dane literaturowe wskazują, że badane włókna nie powodowały zmian w żywotności fibroblastów, stając się innowacyjnym materiałem opatrunkowym. Wykazano również, że pochodne chitozanu z czterema grupami amonowymi mają dużą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą, działając docelowo na błonę cytoplazmatyczną komórek bakteryjnych [96]. Działanie bakteriobójcze stwierdzono przeciw bakteriom Gram-dodatnim *Staphylococcus aureus* oraz Gram-ujemnym *Escherichia coli* [34].

Ponadto tą samą metodą wyprodukowano nanowłókna chitozanowo-alginianowe. Stwierdzono, że postać kompozytowa włókien zwiększa podatność na lizozym, co

również jest ważne w procesie gojenia. Enzymatyczny rozkład przez lizozym i N-acetyloglukozaminidazę kompozytów alginianowo-wapniowych z włóknami chitozanowymi powoduje uwalnianie N-acetylo-glukozaminy i glukozaminy. Powstałe produkty degradacji, będące chito oligomerami, mogą stymulować makrofagi i korzystnie działają na odkładanie kolagenu, przyspieszając tym samym proces gojenia ran [80].

Chen i wsp. opracowali nanokompozytową (chitozanowo-kolagenową) membranę włóknistą. Wykazano, że włóknina wspomaga gojenie ran, wywołując migrację i proliferację komórek. Z badań na zwierzętach wynika, że membrany nanowłókniste są skuteczniejsze niż powszechnie stosowane gazy i gąbki kolagenowe [19]. Kossovich i wsp. skupili się nad nanowłóknami chitozanowymi, które mają mieć zastosowanie jako opatrunki na rozległe rany oparzeniowe. Opatrunki z nanowłókien chitozanu zostały stworzone i przetestowane jako opa-



Ryc. 4. Schemat deacetylacji chityny do chitozanu

trunki na rany oparzeń trzeciego stopnia. Wyniki wskazały, że opatrunki te zapewniają skuteczną absorpcję wysięku, wentylację rany, ochronę przed zakażeniem i stymulację procesu regeneracji skóry. Natomiast usuwanie włóknistych opatrunków z rany nie powoduje dodatkowych uszkodzeń rany [43].

HYDROŻELE CHITOZANOWE

Hydrożele to trójwymiarowe (3D) sieci polimerowe utworzone przez sieciowanie hydrofilowych homopolimerów (lub kopolimerów), które mogą absorbować duże ilości wody i/lub płynów biologicznych [66]. Wiele materiałów, zarówno naturalnych, jak i syntetycznych lub ich mieszanina, odpowiada definicji hydrożeli. Hydrożele są jednymi z najbardziej obiecujących materiałów na opatrunki z powodu ich podobieństwa i fizycznych właściwości chemicznych do macierzy pozakomórkowej, co umożliwia dyfuzję i proliferację komórek [76]. Procesem gojenia i odbudową skóry, jako ważnymi i trudnymi problemami, zajmuje się inżynieria tkankowa, zwłaszcza w przypadku rozległych oparzeń trzeciego stopnia. W związku z tym opracowano dwuwarstwowe hydrożele, które składają się z chitozanu i wody, poddano je obróbce i zastosowano do urazów oparzeniowych o różnej grubości [15, 54]. Pierwsza warstwa składała się ze sztywnego żelu ochronnego, który nadaje odpowiednie właściwości mechaniczne i umożliwia przepływ powietrza do rany. Druga warstwa jest miękka i elastyczna zapewniając idealne przyleganie do miejsca zranienia. Badania hydrożelu na modelu zwierzęcym wykazały, że materiały chitozanu były dobrze tolerowane i sprzyjały szybszej regeneracji skóry. Wywoływały migrację komórek zapalnych i aktywność angiogenetyczną, sprzyjając dobremu unaczynieniu nowych tkanek [1]. Już w 22. dniu stosowania hydrożelu chitozanowego pod tkanką ziarninową obserwowano syntezę kolagenu typu I i IV, tworząc połączenia skórno-naskórkowe. W innym badaniu oceniano cytotoksyczność hydrożelu na fibroblastach wyizolowanych ze skóry szczura. Wykazano, że hydrożel chitozanu promował adhezję i proliferację komórek. Dodatni ładunek polisacharydu pozwala na interakcje elektrostatyczne z glikozaminoglikanami, które przyciągają czynniki wzrostu, przyspieszając proliferację komórek [49]. Badania żywotności komórek potwierdziły hipotezę, że hydrożel i produkty uboczne jego degradacji nie są cytotoksyczne. Analiza histologiczna wykazała brak reakcji zapalnej w zmianach skórnych z zastosowanym chitozanem [1, 84]. Ponadto przeprowadzono doświadczenie, w którym sprawdzono zastosowanie napromieniowania światłem ultrafioletowym wodnego roztworu chitozanu zdolnego do sieciowania [36, 37]. W celu oceny jego przyspieszającego wpływu na gojenie ran, wykonano nacięcia skóry na całej grubości skóry na grzbietach myszy, a następnie do rany dodano wodny roztwór chitozanu zdolnego do sieciowania i poddano działaniu UV w czasie 90 sekund. Zastosowanie hydrożelu chitozanowego znacząco indukowało obkurczanie rany, powodując jej zamknięcie oraz przyspieszało gojenie w porównaniu z nietraktowanymi kontrolami. Wyniki badań histolo-

gicznych wykazały, zaawansowany stopień obkurczania w pierwszych 2 dniach i wysoki stopień wypełnienia tkanki w 2-4 dniach od czasu dodania hydrożelu. Ponadto w badaniach *in vitro* stwierdzono, że pożywka hodowlana z hydrożelu chitozanowego suplementowana 5% płodową surowicą bydlęcą jest przyciągaczem chemicznym dla ludzkich fibroblastów skóry, przyspieszając migrację komórek. Ze względu na zdolność do przyspieszania kurczenia się i gojenia rany, hydrożel chitozanowy może się stać analogiem opatrunku okluzyjnego do leczenia ran.

Innym rodzajem były hydrożele na bazie PVA (alkoholu poliwinylowego) i chitozanu rozpuszczonego w wodzie i glicerolu. Wytworzono je przez napromienianie małymi dawkami promieniowania gamma, prowadzącymi do usieciowania PVA, a następnie przygotowane materiały zamrażano w temperaturze -20°C przez 2 godziny i rozmrażano w temperaturze 4°C przez godzinę. Cykl zamrażania i rozmrażania powtarzano wiele razy, aby otrzymać hydrożele o różnych właściwościach mechanicznych. Sprawdzono ich cytotoksyczność na mysich fibroblastach L929. Wyniki testu MTT sugerują, że ekstrakt hydrożelu był nietoksyczny w porównaniu z jałową gazą. Hydrożel PVA/chitozan/glicerol może przyspieszać proces gojenia ran o pełnej grubości w modelu szczurzym. Już w 11. dniu po operacji stosowanie hydrożelu przyniosło oczekiwane skutki gojenia, zaobserwowano powstanie dojrzałej warstwy naskórka [110].

Zespół Sunga opracował opatrunek z minocykliną o wzmocnionym działaniu leczniczym. Usieciowane folie hydrożelowe przygotowano z PVA i chitozanu metodą liofilizacji. Następnie oceniono ich właściwości żelowe, adsorpcję *in vitro* oraz histologię. Chitozan zmniejszał frakcję żelu, wytrzymałość i stabilność termiczną hydrożelu PVA, jednocześnie zwiększając zdolność pęcznienia, szybkość przepuszczania pary wodnej, elastyczność i porowatość. Włączenie minocykliny nie wpłynęło na właściwości żelu. W teście gojenia ran hydrożel PVA/chitozan z minocykliną przyspieszał gojenie się rany na grzbiecie szczura w porównaniu z produktem konwencjonalnym lub kontrolnym (sterylna gazą). Szybsze gojenie zapewniła antygrzybicza aktywność chitozanu oraz potencjalne działanie lecznicze minocykliny – aktywność antybakteryjna [93].

Udowodniono także, że hydrożele oparte na nanocząstkach chitozanu i Ag regenerują odkładanie się nabłonka i kolagenu, skutecznie przyspieszając gojenie się ran. W tym przypadku nanocząstki Ag działały jako oba wypełniacze w celu poprawy właściwości mechanicznych hydrożelu i środka przeciwdrobnoustrojowego. Mechanizm działania bakteriobójczego polegał na połączeniu rozerwania błony komórkowej i wiązania DNA, zapobiegając replikacji bakterii [67]. Podsumowując, w kilku pracach wykazano, że hydrożele oparte na chitozanie modyfikowane lub niemodyfikowane (środki bakteriobójcze, czynniki wzrostu itp.) odegrały ważną rolę w ranie przez bezpośrednie działanie w różnych fazach procesu gojenia [42, 76].

BŁONY CHITOZANOWE

Wielu naukowców opracowuje innowacyjne opatrunki na bazie chitozanu. Dotychczasowe badania pozwalają stwierdzić, że błony chitozanowe hydrolizowane do chitoooligomerów stymulują prawidłowe odkładanie, składanie i orientację włókien kolagenowych, co odgrywa ważną rolę w bliznowaceniu [43]. Ponadto wyniki histologiczne wskazują, że membrany chitozanowe stymulują migrację komórek zapalnych i decydują o organizacji komórkowej podczas gojenia [11, 65]. Biomateriały chitozanowe mają postać cienkich, przezroczystych i bezbarwnych błon [20]. Dane kliniczne dowodzą, że błony chitozanowe przylegają jednolicie do świeżo zranionej powierzchni skóry. Jest to podstawowa właściwość, którą powinien spełniać materiał opatrunkowy. W przypadku niecałkowitego przylegania powstają wolne przestrzenie wypełnione powietrzem, w których gromadzi się płyn wysiękowy i mogą się namnażać bakterie, powodując infekcję. Muzzarelli odkrył również, że biomacierze chitozanowe wykazują aktywność hemostatyczną, wpływając na kaskadowe reakcje krzepnięcia. W badaniach skrzep krwi powstał między błoną chitozanową a regenerującą się tkanką nabłonkową [68, 84]. Zmniejszają towarzyszące ranom świąd i ból oraz przyspieszają bliznowacenie. Po 10 dniach usuwano membrany z chitozanem, a miejsce zranienia było zagojone, obszar czysty i zdrowy w porównaniu do powszechnie stosowanego impregnowanego bandażu tiulowego Bactigras [7, 31]. Badanie histologiczne, potwierdziło, że epitelizacja została przyspieszona, a odkładanie kolagenu w skórze właściwej pokryło obszar rany [64].

KOMPOZYTY CHITOZANOWE I CHITOZANOWO-ALGINIANOWE

Innym zastosowaniem chitozanu są innowacyjne opatrunki na rany, będące kompozytem błony chitozanowej i chlorowodoru minocydynowego przygotowanego z użyciem komercyjnych folii poliuretanowych (Tegaderm) [5]. Badania prowadzono na ciężkich ranach oparzeniowych szczurów. Sprawdzano wpływ kompozytów na stan i zmianę powierzchni rany. Po dobraniu odpowiednich ilości chlorowodoru miocykliny (2 mg) i stopnia deacetylacji (optymalny 83%) potwierdzono bardzo dobry wpływ kompozytów na proces gojenia, głównie w fazie migracji komórek (fibroblastów i keratynocytów) [18]. Ponadto oceniano wpływ kompozytów chitozanowych z diakrylanem glikolu polietylenowego (PEGDA) na cytotoksyczność fibroblastów mysich. Wykazano, że materiał nie wykazywał cytotoksyczności w kierunku wzrostu linii L929 w warunkach *in vitro*. Przeprowadzono również obserwację skaningową mikroskopią elektronową SEM i potwierdzono, że mikroporowata struktura powierzchni kompozytów chitozan/PEGDA nie powodowała zmian w morfologii, proliferacji i różnicowaniu mysich fibroblastów linii L929. Kompozyty te mogą mieć zastosowanie jako substytut materiału opatrunkowego [111].

Opatrunki na ranę zawierające alginian są dobrze znane, także jako produkty komercyjne [75]. Większość opatrunków na bazie alginianu, zawiera alginian wapnia. Związek ten jest naturalnym hemostatem, który jest przede wszystkim wykorzystywany w krwawiących ranach. Właściwości alginianu do tworzenia żelu wspomagają usuwanie z łatwością opatrunku, nie powodując dodatkowych urazów i niwelują ból pacjenta przy ich zmianie [13]. Alginian zapewnia wilgotność środowiska gojenia, przyspieszając granulację i reepitalizację. Badania kliniczne pacjentów wykazały, że opatrunki z alginianem wapnia przyspieszały gojenie już w ciągu 10 dni w porównaniu do pacjentów z opatrunkiem z gazy parafinowej [30]. Ponadto inne badania z udziałem pacjentów oparzeniowych wykazują, że opatrunki z alginianem wapnia zmniejszały nasilenie bólu oraz były chętniej stosowane przez personel medyczny ze względu na łatwość opieki. Zastosowanie opatrunków okluzyjnych z alginianem wapnia w leczeniu miejsc dawcy przeszczepu skóry eliminowało ból, problem powstawania i wyciekania płynu surowiczego w porównaniu do zwykłego opatrunku okluzyjnego [24].

Ważne było skupienie się wokół hydrożeli chitozanowo-alginianowych stosowanych m.in. w leczeniu oparzeń lub odleżyn. Szczególną ich cechą jest duża zdolność sorpcyjna. Ponadto wykazują odpowiednią elastyczność i wytrzymałość na rozciąganie. Istotne jest również to, że wykazują właściwości bakteriostatyczne przeciw *Escherichia coli*, gdy w kompozycji znajduje się siarczan cynku [38, 104]. Badania przeprowadzone przez japońskich naukowców wykazują skuteczność kompozytu chitozanowo-alginianowego w przyspieszaniu procesu gojenia [107]. Wilgotne środowisko w obrębie rany zostało zapewnione przez hydrokoloidową warstwę opatrunku, utworzoną na bazie alginianu, chitozanu oraz fukoidyny (polisacharydu siarczanowego występującego głównie w wodorostach – ACF-HS). Grupą badaną były myszy z wywołaną cukrzycą, u których na tylnej powierzchni grzbietu utworzono pełnościenne uszkodzenie skóry o średnicy 12 mm. Z rany, na którą nałożono ACF-HS, co kilka dni pobierano materiał do analiz histologicznych. Wyniki badania mikroskopowego pokazały znacznie zaawansowany proces granulacji w ranie i wzmożenie tworzenia kapilar naczyńowych w 4, 9 oraz 14 dniu od nałożenia opatrunku ACF-HS, w porównaniu z ranami zwierząt leczonych opatrunkami hydrokoloidowymi. Wyniki tego eksperymentu wykazują, że opatrunek ACF-HS działał skutecznie w leczeniu ran [81].

W badaniach zespołu Wanga sprawdzano nowe membrany kompleksu polielektrolitu chitozan-alginian (PEC). Testy MTT i NR sugerowały, że błony PEC chitozan-alginian były nietoksyczne na mysich i ludzkich fibroblastach. W porównaniu do konwencjonalnego opatrunku z gazy membrany PEC spowodowały przyspieszenie gojenia ran ciętych szczura, a badania histologiczne wykazały prawidłową i pełną odbudowę naskórka o zrogowaciałej powierzchni, bez stanu zapalnego w skórze właściwej. Na podstawie biokompatybilności i skuteczności gojenia ran, membrany PEC z chitozanem i alginianem można polecić jako substytut stosowany w leczeniu ran [101].

Opatrunek z optymalną kombinacją alginianu i glikolu polietylenowego zawierający synergistyczną kombinację antybiotyku i środka przeciwbólowego badano u ludzi z przewlekłymi niegojącymi się owrzodzeniami. Zaobserwowano, że materiał ten spowodował, że wrzód został oczyszczony i korzystnie wpływał na zmniejszenie zakażenia. Stwierdzono również, że chitozan stopniowo ulega depolimeryzacji uwalniając N-acetylo-D-glukozaminę, która powoduje proliferację fibroblastów, pomaga w uporządkowanym odkładaniu kolagenu i stymuluje podwyższanie poziomu naturalnej syntezy kwasu hialuronowego w miejscu rany. Pomaga w szybszym gojeniu ran i zapobiega bliznom. Jednym z najnowszych materiałów badanych jako potencjalny opatrunek na rany przewlekłe był opatrunek kompozytowy CCA, złożony z chitozanu, alginianu i kolagenu. Badania wykazały, że opatrunek CCA miał dużą porowatość i doskonałą zdolność pęcznienia, co umożliwia wchłanianie wysięku z rany przy jednoczesnym utrzymaniu wilgotnego środowiska gojenia. Sugeruje to, że opatrunek kompozytowy powinien ułatwić agregację płytek i tworzenie skrzepu fibrynowego, a także migrację fibroblastów czy komórek śródbłonna. Wilgotne mikrośrodowisko umożliwia łatwą i bezbolesną zmianę opatrunku bez uszkodzenia nowo powstałej tkanki oraz chroni ranę przed bakteriami [91]. Biomateriał wzmacniał ekspresję EGF, bFGF, TGF- β i CD31 we wczesnym stadium gojenia się ran [106].

FOLIE CHITOZANOWE Z NANOCZĄSTKAMI SREBRA I TLENKIEM CYNKU (ZNO) JAKO OPATRUNKI O WŁAŚCIWOŚCIACH PRZECIWBAKTERYJNYCH

Antybiotykooporność drobnoustrojów jest jednym z głównych problemów w leczeniu ran i postępowaniu z nimi, co prowadzi do powikłań i opóźnionego gojenia. Z tego względu wiele badań koncentruje się na modyfikacji różnych materiałów i surowców nanocząstkami srebra (NCz Ag) [81]. Polegać to może na osadzaniu NCz Ag w nośnikach lub opłaszczaniu nimi innych powierzchni. Dzięki takim modyfikacjom nowo powstałe materiały nabiorą właściwości przeciwwgrzybiczych, przeciwbakteryjnych, wirusobójczych oraz antystatycznych i impregnujących [109]. W budowie nanocząstki srebra obserwuje się 20–15 000 atomów pierwiastka. Działanie biobójcze możliwe jest dzięki wpływowi srebra na uszkodzenie błon komórkowych, denaturację białek, generowanie reaktywnych form tlenu, hamowanie replikacji DNA i zakłócenie syntezy niektórych białek [94, 107]. Działanie bakteriobójcze NCz Ag zależne jest od składu ściany komórkowej bakterii. Obecność w ścianie komórkowej peptydoglikanu zmniejsza wrażliwość bakterii na działanie srebra, tak więc bakterie Gram-ujemne są bardziej podatne na toksyczne działanie NCz Ag niż Gram-dodatnie [41, 69]. Ponadto prowadzono badania, które wykazały, że tworzenie połączeń NCz Ag z lekami przeciwbakteryjnymi, takimi jak amoksycylina, penicylina G czy kindamycyna wzmacniają ich działanie [90].

W ostatnich latach, w celu ulepszenia działań przeciwdrobnoustrojowych, naukowcy skupili się na osadzaniu nanocząstek srebra w warstwie chitozanu, przez syntezę *in situ* nanocząstek z prekursora lub przez bezpośrednie dodanie nanocząstek i homogenizację [3, 58]. Asymetryczne membrany chitozanowe o przedłużonej zdolności przeciwdrobnoustrojowej z nanosrebrem zaprojektowano tak, aby spełniały wymagania dobrego opatrunku, tj. przepuszczalność tlenu, kontrolowane odparowywanie pary wodnej i drenaż wysięków rany. Zbadano, że asymetryczna błona chitozanowa działa jako opatrunek kontrolujący stan rany i uwalniający jony srebra w przedłużony sposób [64]. Chociaż opatrunki chitozanowe zostały opracowane w celu rozwiązania problemu gojenia ran przewlekłych, nie zawsze są skuteczne w kontrolowaniu krwawienia i działania bakteriobójczego. Ong i wsp. przeprowadzili badania, które miały na celu udoskonalenie opatrunku chitozanowego przez suplementację prokoagulantem. Syntetyzowano chitozan zawierający różne typy i ilości polifosforanów, a ich właściwości hemostaticzne oceniono *in vitro*. Optymalny preparat polifosforanu chitozanu ze srebrem przyspieszał krzepnięcie krwi, zwiększał adhezję płytek i bardziej działał prokoagulacyjny w porównaniu do samego chitozanu [69, 74].

Na podstawie danych literaturowych wiadomo, że tlenek cynku ZnO budzi ogromne zainteresowanie ze względu na dużą aktywność fotokatalityczną, stabilność oraz właściwości antybakteryjne i znikomą toksyczność [21, 103]. W związku z tymi cechami naukowcy opracowali folie chitozanowe z nanosrebrem i tlenkiem cynku metodą transformacji zlewowej. Badania wykazały, że produkt miał bardzo dobrą aktywność przeciwbakteryjną przeciwko szczepom: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz aktywność przeciwwgrzybiczą działającą na: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* i drożdże [52]. Badania Vicentiego i wsp. również potwierdziły, że folie chitozanowe z ZnO wykazują lepszą aktywność antybakteryjną, a to pozwala stwierdzać, że materiały te mogą być stosowane jako opatrunki hydrofilowe i oparzeniowe [70].

GĄBKICHITOZANOWE

Gąbki są miękkimi i elastycznymi materiałami o dobrze połączonej strukturze mikroporów. Ze względu na unikalne cechy strukturalne, bardzo dobrze wchłaniają płyny oraz oddziałują z komórkami dzięki hydrofilowości. Jednak takie materiały są niewystarczająco trwałe mechanicznie w ciągu trwania całego procesu gojenia [89]. Z powodu tych właściwości gąbki mogą być skutecznie stosowane jako materiał leczniczy do ran oparzeniowych. W oparzeniach III stopnia zniszczeniu ulega cała grubość struktury skóry. Jednym ze sposobów leczniczych jest zabieg przeszczepienia cienkiej warstwy zdrowej skóry z własnego ciała pacjenta w miejscu rany. Aby chronić ubytek skóry przed infekcjami i odwodnieniem w okresie między hospitalizacją a przeszczepieniem, rana musi być odseparowana od środowiska zewnętrznego [62]. Inwazja bakteryjna może sprawić, że rana nie będzie się nadawać do przeszczepu ze względu na rozwój zakażenia.

Opatrunek na ranę, który ma w jednej z warstw strukturę podobną do gąbki, może spełniać takie warunki jak: wymiana gazowa, ochrona rany przed infekcją i odwodnieniem [29]. Zalety stosowania gąbek to utrzymywanie wilgotnego środowiska rany oraz duża zdolność pęcznienia. Materiał w postaci gąbki można wzbogacić o środki przeciwdrobnoustrojowe. Zastosowanie sulfodiazyny srebra zapobiegało infekcjom bakteryjnym w ranie. Badania histologiczne potwierdziły wpływ materiałów na proliferację fibroblastów i wyraźną redukcję komórek zakaźnych [49]. Denkabs i wsp. opracowali gąbki chitozanowe z zamkniętym w środku modelowym antybiotykiem (norfloksacyną). Przygotowane gąbki miały strukturę włóknistą. Sprawdzano ich zdolność pęcznienia, właściwości uwalniania antybiotyku w warunkach *in vivo* oraz aktywność przeciwbakteryjną. Zaobserwowano, że współczynnik pęcznienia zmniejszał się wraz ze wzrostem gęstości sieciowania. Stwierdzono, że uwalnianie norfloksacyny jest zapoczątkowane przez pęcznienie, a uwalnianie leku zachodzi na zasadzie kontrolowanej dyfuzji. Ponadto udowodniono, że aktywność przeciwbakteryjna była wprost proporcjonalna do szybkości uwalniania leku. Powyższe badania pozwalają twierdzić, że opatrunki w postaci gąbek można stosować jako materiał opatrunkowy [23].

OPATRUNKI NA BAZIE CHITYNY I CHITOZANU STOSOWANE W GOJENIU RAN

Pierwszym komercyjnym opatrunkiem na bazie chityny był Beschitin®, który wprowadzono w 1982 r. na rynek japoński. Miał postać włókniny pobudzającej proces ziarninowania. Mimo udowodnionego działania na przyspieszanie procesu gojenia, chityny i jej pochodnych, wysoki koszt związany z certyfikacją wyrobów opartych na ich bazie i realna możliwość niepowodzenia mogą decydować o małej popularności tego typu wyrobów w Europie [35].

Stosunkowo dużo badań naukowych dotyczących chityny przeprowadzanych jest w Polsce. Obecnie prowadzi się liczne badania naukowe, projekty badawczo-rozwojowe, czego dowodem są zarówno liczne polskie zgłoszenia patentowe, publikacje naukowe, jak i pierwsze wyroby oparte na chitynie i jej pochodnych wprowadzone na rynek. Pierwszym opatrunkiem na bazie chitozanu w Polsce był opracowany przez łódzką firmę Tricomed S.A. Tromboguard®. Został nagrodzony złotym medalem na Międzynarodowych Targach Poznańskich w 2011 r. Tromboguard® to opatrunek hemostatyczny służący do udzielania pierwszej pomocy i opatrywania ran urazowych. Wyrób składa się z trzech warstw: kontaktowej – stanowiącej unikalną kombinację składników aktywnych, które znacznie skracają czas krwawienia. Warstwa ta zawiera chitozan i alginiany. Chitozan przez reakcję na powierzchni rany z erytro- i trombocytami znacznie zmniejsza czas krwawienia. Alginian wapnia przyspiesza naturalny proces tworzenia skrzepu, a alginian sodu – chłonec wydzielinę z rany – tworzy na powierzchni opatrunku warstwę żelu, który zapobiega jego przywieraniu do rany. Druga warstwa, tzw. chłonna jest wykonana z wysokochłonnej pianki poliuretanowej, która trwale pochłania i magazynuje w swoich strukturach krew, nawet w warunkach ucisku oraz z warstwy zabezpieczającej – wykonanej z wodoodpornej membrany poliuretanowej, która zabezpiecza zewnętrzną stronę opatrunku przed czynnikami zewnętrznymi, a jednocześnie chroni personel medyczny przed kontaktem [45]. W Tabeli 1 przedstawiono stosowane w ostatnich latach opatrunki komercyjne na bazie chityny i chitozanu.

PODSUMOWANIE

Gojenie ran skórnych jest skomplikowanym procesem, który obejmuje kilka etapów: hemostazy, proliferacji i przebudowy. Artykuł poświęcony jest biomateriałom chitozanowym, które odgrywają istotną rolę w lecze-

Tabela 1. Zestawienie wybranych opatrunków komercyjnych na bazie chityny i chitozanu [35, 45, 53, 63, 70, 73, 102]

Nazwa opatrunku	Twórca i kraj pochodzenia	Skład	Charakterystyka
Beschitin®	Unitika, Japonia	Chityna	Stosowany w leczeniu ran urazowych; pobudza do ziarninowania i zapobiega tworzeniu blizny. Używany jest na rynku japońskim od ponad 20 lat
CELOX RAPID®	Opatrunki 112, Polska	Zgranulowany chitozan	Gaza w postaci opatrunku składanego powleczonego preparatem hemostatycznym CELOX z aktywnymi granulkami chitozanowymi Chito-R. Chito-R tworzy przylepny żel, który uszczelnia ranę i w ten sposób hamuje krwawienie, jednocześnie skracając czas ucisku
ChitiPack S®	Eisai Co, Japonia	Chityna	Stosowany w ranach pourazowych z dużymi ubytkami tkanek, ma postać gąbki, pobudzającej proces ziarninowania
Chitodine®	IMS, Polska	Sproszkowany chitozan z dodatkiem jodyny	Opatrunek wtórny – działanie dezynfekujące i oczyszczające

Nazwa opatrunku	Twórca i kraj pochodzenia	Skład	Charakterystyka
ChitoSeal™	Luna Innovations Inc., Stany Zjednoczone	Chitozan	Postać żelu, składająca się z dodatnio naładowanych cząsteczek chitozanu, który przyciąga ujemnie naładowane krwinki, przyspieszając tworzenie skrzepu
Excel Arrest®	Hemostasis LLC Co, Stany Zjednoczone	Modyfikowany chitozan	Opatrunki KytoCel są bardzo chłonne, dopasowujące się i hemostatyczne; składają się z naturalnych, biodegradowalnych włókien chitozanu
HemCon Dental Dressing PRO®	Hemcon, Stany Zjednoczone	Octan chitozanu	Naładowany elektrostatycznie dodatnio, przyciąga komórki krwi szybko tamując krwotok, zapewnia skuteczną hemostazę i fizyczną antybakteryjną barierę, redukuje ryzyko infekcji
KytoCel®	Aspen Medical, Polska	Acylowana forma chitozanu	KytoCel może być stosowany w leczeniu odleżyn (etap II-IV), wrzodów żylnych, owrzodzeń cukrzycowych
Syvek-Patch®	Marine Polymer Technologies, Stany Zjednoczone	Chityna	Wykorzystuje włókna poli-N-acetyloglukozaminy w unikalnej liofilizowanej trójwymiarowej strukturze tamując krwawienie
Tegasorb®	Hainan Xinlong Non-Wovens Industry, Chiny	Chityna	Materiał zastępczy skóry, materiał opatrunkowy w leczeniu ran urazowych, odleżyn i przewlekłych owrzodzeń
Traumastat®	Ore-Medix, Stany Zjednoczone	Włókna krzemionkowe pokryte chitozanem	Tamuje krwawienia dzięki bardzo dobrym właściwościom sorpcyjnym
Tromboguard®	Tricomed S.A, Polska	Opatrunek hemostatyczny zawierający chitozan i alginany	Stosowany w pierwszej pomocy do opatrywania ran urazowych, skraca czas krwawienia
Vulnosorb®	Tesla-Pharma, Holandia	Kompozycja kolagenu i chitozanu	W postaci chłonnej gąbki zapewnia wilgotne środowisko w ranie

niu ran przewlekłych. Materiały mające jako bazę chitozan działają na wszystkich etapach procesu gojenia. W stadium hemostazy przyspieszają agregację płytek i tworzenie skrzepu fibrynowego. W stadium zapalnym, powodują proliferację neutrofili i makrofagów, które oczyszczają ranę uwalniając cytokiny w miejscu zranienia. W badaniach wykazano, że chitozan naśladuje natywną macierz zewnątrzkomórkową, zapewnia-

jąc optymalne mikrośrodowisko rany. Wyniki wskazują, że stosowanie biomateriałów z chitozanem wpływa na wzrost fibroblastów i tworzenie tkanki ziarninowej, ułatwiając proces ponownej epitelizacji, naprawy naskórka i skóry właściwej. Opatrunek medyczny z chitozanem odgrywałby ważną rolę w procesie przyspieszania gojenia, a także zmniejszałby towarzyszący temu procesowi ból, poprawiając skuteczność leczenia pacjenta.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ahsan S.M., Thomas M., Reddy K.K., Sooraparaju S.G., Asthana A., Bhatnagar I.: Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018; 110: 97–109
- [2] Amin M.A., Abdel-Raheem I.T.: Accelerated wound healing and anti-inflammatory effects of physically cross linked polyvinyl alcohol-chitosan hydrogel containing honey bee venom in diabetic rats. *Arch. Pharm. Res.*, 2014; 37: 1016–1031
- [3] An J., Yuan X., Luo Q., Wang D.: Preparation of chitosan-graft-(methyl methacrylate)/Ag nanocomposite with antimicrobial activity. *Polym. Int.*, 2010; 59: 62–70

- [4] Andrea J., Gallini R., Betsholtz C.: Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.*, 2008; 22: 1276–1312
- [5] Aoyagi S., Onishi H., Machida Y.: Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. *Int. J. Pharm.*, 2007; 330: 138–145
- [6] Atala A., Lanza R., Thomson J.A., Nerem R.: *Principles of Regenerative Medicine*. 2nd Edition. Elsevier, New York 2011
- [7] Azad A.K., Sermsintham N., Chandkrachang S., Stevens W.F.: Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2004; 69: 216–222

- [8] Balakrishnan B., Mohanty M., Umashankar P.R., Jayakrishnan A.: Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*, 2005; 26: 6335–6342
- [9] Balassa L.L., Prudden J.F.: Applications of chitin and chitosan in wound healing acceleration. W: *Chitin, chitosan and related enzymes*. Red.: J.P. Zikakis, Academic Press, California 1984: 296–305
- [10] Baranwal A., Kumar A., Priyadharshini A., Oggu G.S., Bhatnagar I., Srivastava A., Chandra P.: Chitosan: An undisputed bio-fabrication material for tissue engineering and bio-sensing applications. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018; 110, 110–123
- [11] Biagini G., Muzzarelli R.A., Giardiono R., Castaldini C.: Biological material for wound healing. W: *Advances in chitin and chitosan*. Red.: C.J. Brine, P.A. Sanford, J.P. Zikakis, Elsevier Science Publishers, London 1992: 16–23
- [12] Bielefeld K.A., Amini-Nik S., Alman B.A.: Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2013; 70: 2059–2081
- [13] Blaker J.J., Nazhat S.N., Boccaccini A.R.: Development and characterization of silver-doped bioactive glass-coated sutures for tissue engineering and wound healing applications. *Biomaterials*, 2004; 25:1319–1329
- [14] Boateng J.S., Matthews K.H., Stevens H.N., Eccleston G.M.: Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J. Pharm. Sci.*, 2008; 97: 2892–2923
- [15] Boucard N., Viton C., Agay D., Mari E., Roger T., Chancerelle Y.: The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, 2007; 28: 3478–3488
- [16] Broughton G.2nd, Janis J.E., Attinger C.E.: Wound healing: an overview. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2006; 117: 1e-S–32e-S
- [17] Brown B.N., Ratner B.D., Goodman S.B., Amar S., Badylak S.F.: Macrophage polarization: An opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterials*, 2012; 33: 3792–3802
- [18] Chen R.N., Wang G.M., Chen C.H., Ho H.O., Sheu M.T.: Development of N,O-(carboxymethyl) chitosan/collagen matrixes as a wound dressing. *Biomacromolecules*, 2006; 7: 1058–1064
- [19] Chen Z., Mo X., He C., Wang H.: Intermolecular interactions in electrospun collagen chitosan complex nanofibers. *Carbohydr. Polym.*, 2008; 72: 410–418
- [20] Chung L.Y., Schmidt R.J., Hamlyn P.F., Sagar B.F., Andrews A.M., Turner T.D.: Biocompatibility of potential wound management products: Fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblasts in culture. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1994; 28: 463–469
- [21] Cohen M.L.: The theory of real materials. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 2000; 30: 1–26
- [22] Dąbrowiecki S.: Fizjologia i patofizjologia procesu gojenia ran. *Pol. Med. Paliatywna*, 2003; 4: 283–297
- [23] Denkbaş E.B., Öztürk E., Özdemir N., Keçeci K., Agalar C.: Norfloxacin-loaded chitosan sponges as wound dressing material. *J. Biomater. Appl.*, 2004; 18: 291–303
- [24] Disa J.J., Alizadeh K., Smith J.W., Hu Q., Cordeiro P.G.: Evaluation of a combined calcium sodium alginate and bio-occlusive membrane dressing in the management of split-thickness skin graft donor sites. *Ann. Plast. Surg.*, 2001; 46: 405–408
- [25] Fornalski J.: Gojenie się ran z bliznowaceniem – metody terapeutyczne. *Borgis-Nowa Med.*, 2006; 4: 66–70
- [26] Forrest R.D.: Early history of wound treatment. *J. R. Soc. Med.*, 1982; 75: 198–205
- [27] Furth M.E., Atala A., Van Dyke M.E.: Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*, 2007; 28: 5068–5073
- [28] Harris T.R., Bransford J.D., Brophy S.P.: Roles for learning sciences and learning technologies in biomedical engineering education: A review of recent advances. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2002; 4: 29–48
- [29] Hinrichs W.L., Lommen E.J., Wildevuur C.R., Feijen J.: Fibrillation and characterization of an asymmetric polyurethane membrane for use as a wound dressing. *J. Appl. Biomater.*, 1992; 3: 287–303
- [30] Hombrey E., Pandya A., Giele H.: Adhesive retention dressings are more comfortable than alginate dressings on split-skin-graft donor sites. *Br. J. Plast. Surg.*, 2003; 56: 498–503
- [31] Howling G.I., Dettmar P.W., Goddard P.A., Hampson F.C., Dornish M., Wood E.J.: The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, 2001; 22: 2959–2966
- [32] Husain S., Al-Samadani K.H., Najeeb S., Zafar M.S., Khurshid Z., Zohaib S., Qasim S.B.: Chitosan biomaterials for current and potential dental applications. *Materials*, 2017; 10: E602
- [33] Huxley-Jones J., Robertson D.L., Boot-Handford R.P.: On the origins of the extracellular matrix in vertebrates. *Matrix Biol.*, 2007; 26: 2–11
- [34] Ignatova M., Starbova K., Markova N., Manolova N., Rashkov I.: Electrospun nano-fibre mats with antibacterial properties from quaternized chitosan and poly(vinyl alcohol). *Carbohydr. Res.*, 2006; 341: 2098–2107
- [35] Inamdar N.N., Mourya V.: Chitosan and low molecular weight chitosan: Biological and biomedical applications. W: *Advanced Biomaterials and Biodevices*, red.: A. Tiwari, A.N. Nordin. Scrivener Publishing, 2014, 183–242
- [36] Ishihara M., Nakanishi K., Ono K., Sato M., Kikuchi M., Saito Y.: Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials*, 2002; 23: 833–840
- [37] Ishihara M., Ono K., Sato M., Nakanishi K., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Fujita M., Kikuchi M., Kurita A.: Acceleration of wound contraction and healing with a photocrosslinkable chitosan hydrogel. *Wound Repair Regen.*, 2001; 9: 513–521
- [38] Jaikumar D., Sajesh K.M., Soumya S., Nimal T.R., Chennazhi K.P., Nair S.V., Jayakumar R.: Injectable alginate-O-carboxymethylchitosan/nano fibrin composite hydrogels for adipose tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015; 74: 318–326
- [39] Kagan H.M., Li W.: Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J. Cell. Biochem.*, 2003; 88: 660–672
- [40] Kifune K.: Clinical application of chitin artificial skin. W: *Advances in chitin and chitosan*. Red.: C.J. Brine, P.A. Sanford, J.P. Zikakis, Elsevier Science Publishers, London 1992: 9–15
- [41] Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y., Kim Y.K., Lee Y.S., Jeong D.H., Cho M.H.: Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 2007; 3: 95–101
- [42] Koehler J., Brandl F.P., Goepferich A.M.: Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *Eur. Pol. J.*, 2018; 100: 1–11
- [43] Kossovich L.Y., Salkovskiy Y., Kirillova I.V.: Electrospun chitosan nanofiber materials as burn dressing. W: *6th World Congress of Biomechanics (WCB 2010)*. August 1–6, 2010 Singapore. IFMBE Proceedings. Red.: C.T. Lim, J.C.H. Goh, Springer, Berlin, Heidelberg, 2010, 1212–1214
- [44] Krasowski G., Kruk M.: Leczenie odleżyn i ran przewlekłych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008: 81–89
- [45] Kucharska M., Struszczyk M.H., Niekraszewicz A., Ciechańska D., Witczak E., Tarkowska S., Fortuniak K., Gulbas-Diaz A., Rogaczewska A., Płoszaj I., Pluta A., Gąsiorowski T.: Tromboguard® – first aid wound dressing. *Prog. Chem. Appl. Chitin Its Deriv.*, 2011; 16: 121–130

- [46] Labler L., Mica L., Härter L., Trentz O., Keel M.: Influence of V.A.C.-therapy on cytokines and growth factors in traumatic wounds. *Zentralbl. Chir.*, 2006; 131: S62-S67
- [47] Lanza R., Langer R., Vacanti J.: *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier Academic Press, Burlington 2007
- [48] Lau K., Paus R., Tiede S., Day P., Bayat A.: Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp. Dermatol.*, 2009; 18: 921-933
- [49] Lee D.W., Lim H., Chong H.N., Shim W.S.: Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: A review. *Open Biomater. J.*, 2009; 1: 10-20
- [50] Lee H.B., Khang G., Lee J.H.: *Polymeric biomaterials*. W: *Biomedical Engineering Fundamentals*, red.: J.D. Bronzino, D.R. Peterson. CRC Press, Boca Raton 2006, 40
- [51] Lee Y.M., Kim S.S., Park M.H., Song K.W., Sung Y.K., Kang I.K.: β -Chitin-based wound dressing containing silver sulfadiazine. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2000; 11: 817-823
- [52] Li L.H., Deng J.C., Deng H.R., Liu Z.L., Li X.L.: Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films. *Chem. Eng. J.*, 2010; 160: 378-382
- [53] Liang S., Sun Y., Dai X.: A review of the preparation, analysis and biological functions of chitooligosaccharide. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018; 19: E2197
- [54] Liu R., Xu X., Zhuang X., Cheng B.: Solution blowing of chitosan/PVA hydrogel nanofiber mats. *Carbohydr. Polym.*, 2014; 101: 1116-1121
- [55] Lloyd A.W.: Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. *Med. Device Technol.*, 2002; 13: 18-21
- [56] Loeb L.: A comparative study of the mechanism of wound healing. *J. Med. Res.*, 1920; 41: 247-281
- [57] Lorenz H.P., Longaker M.T.: *Wounds: Biology, Pathology and Management*. W: *Essential Practice of Surgery: Basic Science and Clinical Evidence*, red.: M. Li, J.A. Norton, R.R. Bollinger, A.E. Chang, S.F. Lowry. Springer, New York 2003, 77-88
- [58] Luo C., Zhang Y., Zeng X., Zeng Y., Wang Y.: The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.*, 2005; 288: 444-448
- [59] Marciniak J.: *Biomechaniczne, metaboliczne, bioelektroniczne i kliniczne aspekty złamań*. Praca badawcza Inst. Metaloznawstwa Pol. Śl., Gliwice 1986-1990
- [60] Marciniak J.: *Biomateriały*. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002
- [61] Martin P.: Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 1997; 276: 75-81
- [62] Matsuda K., Suzuki S., Isshiki N., Yoshioka K., Wada R., Hyon S.H., Ikada Y.: Evaluation of bilayer artificial skin capable of sustained release of an antibiotic. *Biomaterials*, 1992; 13: 119-122
- [63] Mazurek P., Kuliński S., Gosk J.: Możliwości wykorzystania chityny i chitozanu w leczeniu ran. *Polim. Med.*, 2013; 43: 297-302
- [64] Mi F.L., Wu Y.B., Shyu S.S., Chao A.C., Lai J.Y., Su C.C.: Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *J. Membr. Sci.*, 2003; 212: 237-254
- [65] Minami S.: Effects of chitosan on wound healing. W: *Carbohydrates and carbohydrate polymers: analysis, biotechnology, modification, antiviral, biomedical and other applications*, red.: M. Yalpani. Atl Pr Scientific Pub, 1993, 141-152
- [66] Mohammadzadeh Pakdel P., Peighambaroust S.J.: A review on acrylic based hydrogels and their applications in waste water treatment. *J. Environ. Manage.*, 2018; 217: 123-143
- [67] Mukherjee D., Azamthulla M., Santhosh S., Dath G., Ghosh A., Natholia R., Anbu J., Teja B.V., Muzammil K.M.: Development and characterization of chitosan-based hydrogels as wound dressing materials. *J. Drug Del. Sci. Technol.*, 2018; 46: 498-510
- [68] Muzzarelli R.: In vivo biochemical significance of chitin based medical items. W: *Polymeric biomaterials*, red.: S. Dumitriu. Marcel Dekker, Inc., New York 1994: 179-197
- [69] Muzzarelli R.A.: Chitins and chitosan for the repair of wound skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr. Polym.*, 2009; 76: 167-182
- [70] Muzzarelli R.A., El Mehtedi M., Mattioli-Belmonte M.: Emerging biomedical applications of nano-chitins and nano-chitosans obtained via advanced eco-friendly technologies from marine resources. *Mar. Drugs*, 2014; 12: 5468-5502
- [71] Natarajan S., Williamson D., Stiltz A.J., Harding K.: Advances in wound care and healing technology. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2000; 1: 269-275
- [72] National Research Council: *Materials Science and Engineering for the 1990s: Maintaining Competitiveness in the Age of Materials*. The National Academies Press, Washington, DC 1989
- [73] Niekraszewicz A.: Chitosan Medical Dressings. *Fibres Text. East. Eur.*, 2005; 13: 16-18
- [74] Ong S.Y., Wu J., Mochhala S.M., Tan M.H., Lu J.: Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*, 2008; 29: 4323-4332
- [75] Paul W., Sharma C.P.: *Polysaccharides: Biomedical Applications*. W: *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, red.: P. Somasundaran. CRC Press, Boca Raton 2004, 507-518
- [76] Pellá M.C., Lima-Tenório M.K., Tenório-Neto E.T., Guilherme M.R., Muniz E.C., Rubira A.F.: Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydr. Polym.*, 2018; 196: 233-245
- [77] Peplow P.V., Chatterjee M.P.: A review of the influence of growth factors and cytokines in *in vitro* human keratinocyte migration. *Cytokine*, 2013; 62: 1-21
- [78] Piśula M., Langa P., Kosikowska P., Trzonkowski P.: Komórki macierzyste i czynniki wzrostu w gojeniu ran. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 874-885
- [79] Pittman J.: Effect of aging on wound healing: Current concepts. *J. Wound Ostomy Continence Nurs.*, 2007; 34: 412-417
- [80] Porter S., Clark I.M., Kevorkian L., Edwards D.R.: The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.*, 2005; 386: 15-27
- [81] Potempa M., Jonczyk P., Kandefer B., Szczerba K., Janerka M., Kucharzewski M.: Wpływ chitozanu na gojenie ran u chorych z cukrzycą. *Eduk. Biol. Śr.*, 2017; 4: 32-40
- [82] Qasim S.B., Zafar M.S., Najeeb S., Khurshid Z., Shah A.H., Husain S., Rehman I.U.: Electrospinning of chitosan-based solutions for tissue engineering and regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018; 19: E407
- [83] Rai M., Yadav A., Gade A.: Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.*, 2009; 27: 76-83
- [84] Rao S.B., Sharma C.P.: Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997; 34: 21-28
- [85] Ribeiro M.P., Espiga A., Silva D., Baptista P., Henriques J., Ferreira C., Silva J.C., Borges J.P., Pires E., Chaves P., Correia I.J.: Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen.*, 2009; 17: 817-824
- [86] Rivera A.E., Spencer J.M.: Clinical aspects of full thickness wound healing. *Clin. Dermatol.*, 2007; 25: 39-48
- [87] Robson M.C., Steed D.L., Franz M.G.: Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr. Probl. Surg.*, 2001; 38: 72-140

- [88] Rochima E., Azhary S.Y., Pratama R.I., Panatarani C., Joni I.M.: Preparation and characterization of nano chitosan from crab shell waste by beads-milling method. IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng., 2017; 193: 012043
- [89] Sachlos E., Czernuska J.T.: Making tissue engineering scaffolds work. Review: The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. Eur. Cell. Mater., 2003; 5: 29–40
- [90] Shahverdi A.R., Fakhimi A., Shahverdi H.R., Minaian S.: Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Nanomedicine, 2007; 3: 168–171
- [91] Shi X., Fang Q., Ding M., Wu J., Ye F., Lv Z., Jin J.: Microspheres of carboxymethyl chitosan, sodium alginate and collagen for a novel hemostatic in vitro study. J. Biomater. Appl., 2016; 30: 1092–1102
- [92] Silver F.H., Christiansen D.L.: Biomaterials Science and Biocompatibility, Springer, New York 1999, 9–26, 62–68
- [93] Sung J.H., Hwang M.R., Kim J.O., Lee J.H., Kim Y.I., Kim J.H., Chang S.W., Jin S.G., Kim J.A., Lyoo W.S., Han S.S., Ku S.K., Yong C.S., Choi H.G.: Gel characterization and *in vivo* evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. Int. J. Pharm., 2010; 392: 232–240
- [94] Szycher M., Lee S.J.: Modern wound dressings: a systematic approach to wound healing. J. Biomater. Appl., 1992; 7: 142–213
- [95] Szymański P., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E.: Zastosowanie nanotechnologii w medycynie i farmacji. LAB, 2012; 17: 51–56
- [96] Tashiro T.: Antibacterial and bacterium adsorbing macromolecules. Macromol. Mater. Eng., 2001; 286: 63–87
- [97] Tian J., Wong K.K., Ho C.M., Lok C.N., Yu W.Y., Che C.M., Chiu J.F., Tam P.K.: Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. ChemMedChem., 2007; 2: 129–136
- [98] Vanwijck R.: Surgical biology of wound healing. Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg., 2001; 156: 175–184
- [99] Vicentini D.S., Smania A.Jr., Laranjeira M.C.: Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers. Mater. Sci. Eng. C, 2010; 30: 503–508
- [100] von Recum A.F., LaBerge M.: Educational goals for biomaterials science and engineering: perspective view. J. Appl. Biomater., 1995; 6: 137–144
- [101] Wang L., Khor E., Wee A., Lim L.Y.: Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. J. Biomed. Mater. Res., 2002; 63: 610–618
- [102] Wang Y., Zhang L.: Blends and composites based on cellulose and natural polymers. W: Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources, red.: L. Yu. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2008; 129–161
- [103] Wang Z.L.: Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. J. Phys. Condens. Matter., 2004; 16: R829–R858
- [104] Wiśniewska-Wrona M., Kucharska M., Niekraszewicz A., Kardas I., Ciechańska D., Bodek K.H.: Biokompozyty chitozanowo-alginianowe w postaci filmów do leczenia odleżyn. Polimery Med., 2010; 40: 57–64
- [105] Wu T., Zivanovic S., Draughon F.A., Conway W.S., Sams C.E.: Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. J. Agric. Food Chem., 2005; 53: 3888–3894
- [106] Xie H., Chen X., Shen X., He Y., Chen W., Luo Q., Ge W., Yuan W., Tang X., Hou D., Jiang D., Wang Q., Liu Y., Liu Q., Li K.: Preparation of chitosan-collagen-alginate composite dressing and its promoting effects on wound healing. Int. J. Biol. Macromol., 2018; 107: 93–104
- [107] Xu J., Han X., Liu H., Hu Y.: Synthesis and optical properties of silver nanoparticles stabilized by gemini surfactant. Colloids Surf., A, 2006; 273: 179–183
- [108] Yamanaka M., Hara K., Kudo J.: Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. Appl. Environ. Microbiol., 2005; 71: 7589–7593
- [109] Yanagibayashi S., Kishimoto S., Ishihara M., Murakami K., Aoki H., Takikawa M., Fujita M., Sekido M., Kiyosawa T.: Novel hydrocolloid-sheet as wound dressing to stimulate healing-impaired wound healing in diabetic db/db mice. Biomed. Mater. Eng., 2012; 22: 301–310
- [110] Yang X., Yang K., Wu S., Chen X., Yu F., Li J., Ma M., Zhu Z.: Cytotoxicity and wound healing properties of PVA/ws-chitosan/glycerol hydrogels made by irradiation followed by freeze-thawing. Radiat. Phys. Chem., 2010; 79: 606–611
- [111] Yarden Y.: The EGRF family and its ligands in human cancer: Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. Eur. J. Cancer, 2001; 37: S3–S8
- [112] Zhang X., Yang D., Nie J.: Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material. Int. J. Biol. Macromol., 2008; 43: 456–462
- [113] Zhou Y., Yang D., Chen X., Xu Q., Lu F., Nie J.: Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration. Biomacromolecules, 2008; 9: 349–354

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics

Sara Blid, Marta Kędzierska, Katarzyna Miłowska, Natalia Wrońska, Mounir El Achaby, Nadia Katir, Emmanuel Belamie, Bruno Alonso, Katarzyna Lisowska, Mohammed Lahcini, Maria Bryszewska,* and Abdelkrim El Kadib*



Cite This: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2020, 8, 18354–18365



Read Online

ACCESS |



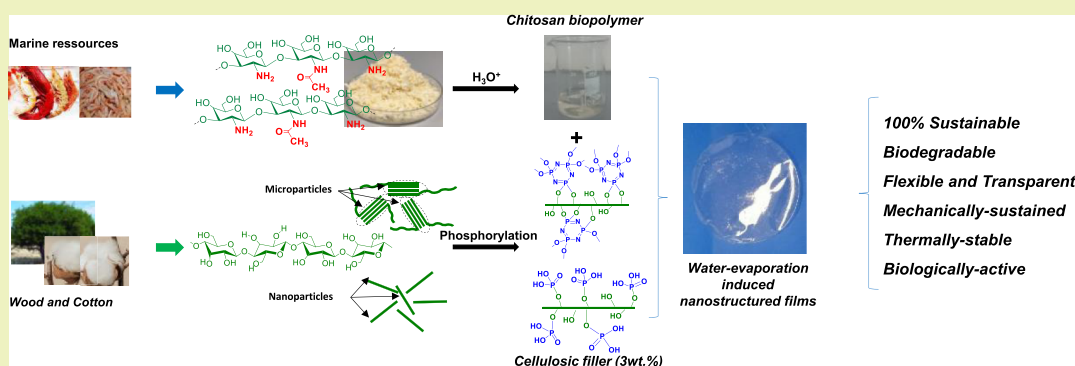
Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information



ABSTRACT: Controlled cellulose fragmentation and its downsizing to micro- and nanocrystals have recently captured tremendous attention to access sustainable nanomaterials. Hitherto, few functionalized cellulose derivatives have been used as fillers, and additional knowledge is needed to establish an accurate structure–performance relationship in the realm of sustainable nanocomposites. Herein, a range of phosphorylated microcellulose (MCC) and nanosized cellulose (CNC) have been prepared and used as reinforcing fillers to build transparent and flexible cellulose-filled chitosan nanostructured films. Regardless of their functionalization, all nanocellulose fillers reach good dispersion in the matrix, while those that are microcellulose aggregate slightly inside of the films. Distinctively, improved thermal stability was seen for chitosan films reinforced with cyclotriphosphazene grafted on cellulose nanocrystals (PN-CNC), where only half weight of the bioplastic was decomposed at 700 °C. Moreover, better mechanical properties were obtained using nanocellulose instead of microcellulose as fillers, with PN-CNC-filled chitosan reaching the highest value of 1.649 MPa in tensile modulus compared to 1.195 MPa for neat chitosan films. Phosphorylated cellulose fillers (P-CNC and P-MCC) also bring interesting antibacterial and intercellular catalase activities, compared to neat chitosan and unmodified cellulose-filled chitosan. In total, this study sheds light on the pivotal role of cellulose phosphorylation in improving the thermal, mechanical, and biological properties of the next generation of rationally designed bioplastics.

KEYWORDS: phosphorylated cellulose, chitosan, biobased nanocomposites, sustainable bioplastics, antibacterial films

INTRODUCTION

The first report claiming that a tiny amount of exfoliated montmorillonite sheets improves the mechanical properties of manufactured nylon-clay nanocomposites¹ has initiated an avalanche of investigations to deliver innovative, competitive, and cost-effective filled polymer nanocomposites.^{2–5} This then triggered a massive production of fully stable petroleum-based plastics for which their controversial end-of-life has raised many environmental issues. Presently, <10% of plastics are recycled, with the same amount being incinerated, while the vast majority accumulates in landfills or aquatic environments.^{6,7} Alarming, a large amount of plastics (>10 tons) are discarded into the ocean every minute^{8–10} and are expected to outweigh fish by 2050.¹¹ The increased awareness for this

dreadful issue of conventional plastics shifted the interest to biobased polymers, bringing into existence a new field referred as bio-(nano)composites.^{12–15} The search for more sustainability in polymer-manufacturing industry has moreover invoked the necessity for green fillers, as the extraction, synthesis, and surface modification of conventional nanosized reinforcements involve a considerable amount of corrosive and

Received: June 16, 2020

Revised: October 12, 2020

Published: December 4, 2020



waste products.¹⁶ A fashionable trend has therefore been to design fully sustainable bioplastics using polymers and nanofillers simultaneously derived from natural, abundant, and easily accessed biorenewables, through benign synthetic procedures that produce a minimal amount of waste.^{17–19} These eco-designed nanocomposites are more suitable for applications where biocompatibility and nontoxicity are mandatory, for example, nanofertilizers for agriculture, film packaging for food preservation, and biodegradable antimicrobial agents for advanced medicine.²⁰

Among the available biomass precursors, polysaccharides stand out as the most promising and have already dominated research revolving around the design of new biobased nanocomposites.^{21–23} Among those of interest, chitosan-based marine fishery waste stands as the sole cationic polysaccharides,²⁴ its amino groups being the basis of its catalytic activity, metal-chelating ability, and biological efficiency.^{25–29} Moreover, chitosan is biocompatible, fully degradable, and readily soluble in acidic aqueous media and can be used in several forms, including a colloidal state, in coagulated forms as hydrogels or microspheres. It is also moldable and can be caste on demand at a desirable thickness as nanostructured films.^{30–32} The excellent film-forming ability of chitosan has opened great opportunities for biobased packaging materials.^{33–35} Coupled to the possibility of conjugating chemicals through its primary amine, a subtly controlled release of active ingredients from chitosan films has also been recently demonstrated.^{36–38} The poor mechanical strength of chitosan has also been overcome by addition of a small amount of nanosized fillers, for example, Montmorillonite,³⁹ graphene oxide,^{40–42} hydroxyapatite,⁴³ carbon nanotubes,^{44,45} and metal oxide nanoparticles,⁴⁶ among others.^{39–42,46} Recently, nanofibrils, nanocrystals, and nanowhiskers of cellulose, chitin, lignin, and other biomass-sourced building blocks have also been used for sustaining chitosan films.^{47–52}

We recently reported on a straightforward and highly versatile preparation of phosphorylated cellulose by surface functionalization of micro-sized and nano-sized cellulose (MCC and CNC, respectively), under urea-free, corrosive-free, and gentle experimental conditions.^{53,54} Despite extensive research revolving around cellulose-surface functionalization, most of these reports explored grafting through silylation and organic modification.^{55–57} Comparatively, few deep investigations have been focused on surface phosphorylation,⁵⁸ with the aim of establishing an accurate reactivity–stability relationship.^{59–61} This fact is quite surprising taking into account the virtues of phosphorylated solid nanomaterials (functionalized by phosphonic acid, phosphonate, phosphates, linear and cyclo-triphosphazene, *etc.*) as flame-retardant additives for manufactured polymers, anchoring hosts for nanoparticles and enzymes, and bioactive surface to grow living cells and/or to inactivate pathogens and bacteria. With our phosphorylated cellulose in hand, we envisioned that their microsize *versus* nanoscale dimension associated to the flame-retardant ability of phosphorus species^{62–65} and their biological activity^{66,67} could be suitable for the design of mechanically sustained and biologically relevant bioplastics. Herein, we discuss the synthesis and characterization of chitosan films reinforced with six differently functionalized cellulose-based micro- and nanoparticles. Their thermal, mechanical, and biological activity (mainly their antibacterial and hemolytic activity)

have been evaluated and discussed based on the size (micro *vs* nano) of the cellulose filler and its surface functionalization.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Tools. Commercially available reagents and solvents phosphoryl chloride, hexachlorotriphosphazene, ethanol (99.8%), tetrahydrofuran (97%), and acetic acid (98%) were purchased from Across and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chitosan of medium molecular weight (190,000–310,000 Da) and 85% deacetylation degree was purchased from Sigma-Aldrich (Hamburg, Germany). Phosphate-buffered saline (PBS) was purchased from BioShop (Burlington, ON, Canada). Glutaraldehyde 25% and osmium tetroxide 4% solution were purchased from Agar Scientific (Stansted, UK). Absolute ethanol was purchased from EMSURE (Darmstadt, Germany). Microcrystalline cellulose (MCC, CAS 9004-34-6) synthesized from cotton linters was purchased from Sigma-Aldrich. Cotton wool used for the synthesis of nanocellulose was purchased from Fisher Scientific. Ultrasonication involved a VWR ultrasonic cleaner (USC-THD: Power 9. VWR International GmbH, Vienna, Austria).

Characterization. Fourier transform infrared (FTIR) spectra were obtained with a Perkin-Elmer Spectrum 100FT-IR spectrometer (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA) equipped with an ATR accessory. The FTIR spectra were recorded in the 4000–600 cm^{−1} range with a resolution of 4 cm^{−1} and an accumulation of 32 scans. Diffuse reflectance UV–visible spectroscopy (DRUV) was measured in the 200–800 nm wavelength range on a Perkin-Elmer Lambda 1050 spectrometer equipped with an integrating sphere (Perkin-Elmer, Labsphere, North Sutton, NH, USA). Contact angle measurements were recorded using a dynamic contact angle meter (KRÜSS GmbH Easy Drop, Krüss GmbH, Hamburg, Germany) equipped with a charge-coupled device camera and using an image capture program employing scat software (VCA Optima, AST Products, Billerica, MA, USA). The cut film (3 × 3 cm) was fixed on top of a dynamic support. A droplet (3 μL) was placed on the film surface and the change in contact angles was treated using the software (VCA Optima, AST Products, Billerica, MA, USA) of the apparatus. Each measurement was repeated four times, and the readings were averaged. Thermogravimetric analysis (TGA) involved a Discovery TGA analyzer (TA Instruments, New Castle, DE, USA) using a heating rate of 10 °C/min from room temperature to 700 °C under nitrogen. Differential scanning calorimetry (DSC) analyses were carried out on a Discovery DSC apparatus (TA Instruments, New Castle, DE, USA) using a heating rate of 10 °C/min from −50 to 400 °C under nitrogen. Scanning electron microscopy (SEM) images were acquired using a Zeiss EVO 10 SEM Carl Zeiss Microscopy, GmbH, Jena, Germany), operating at 15 kV. Tensile tests were performed at room temperature using a universal testing machine (LUDWIG mpk). The specimens were cut in rectangular shapes with 80 mm in length and 10 mm in width. The gauge length was fixed at 30 mm, and the crosshead speed was 5 mm/min. All tests were carried out on a minimum of 5 samples, and the reported results are means ± standard deviation. One-way ANOVA was applied for data analysis, where a value of *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Preparation of CNC and Phosphorylated Cellulose. Cellulose nanocrystals (CNCs) were prepared by H₂SO₄ hydrolysis of cotton wool. Acid hydrolysis was carried out at 45 °C with 65 wt % H₂SO₄ for 60 min with mechanical stirring. The resulting suspension was washed with water through successive centrifugations at 10,000 rpm for 20 min each time. CNC powder was obtained by a freeze-drying process.⁶⁸

Phosphoric Acid-Grafted Cellulose. In a typical procedure using POCl₃ as the phosphorylating agent, 1 mL (1.06 mmol) of POCl₃ was dropped into 5 mL of THF solution containing 200 mg of MCC or CNC (stirred for 10 min), and the resulting solution was stirred at room temperature for 24 h. Then, 10 mL of deionized water was added to the mixture and stirred for 1 h. Finally, the obtained products, P-MCC and P-CNC, were washed and collected by centrifugation and dried at 60 °C for 24 h.⁵³

Cyclotriphosphazene-Grafted Cellulose. In a typical procedure using hexachlorocyclotriphosphazene ($N_3P_3Cl_6$) as the phosphorylating agent, 100 mg (0.29 mmol) of $N_3P_3Cl_6$ was added into 5 mL of THF solution containing 100 mg of MCC or CNC (stirred for 10 min); the resulting mixture was stirred at room temperature for 24 h. Then, 10 mL of deionized water was added to the mixture and stirred for 1 h. Finally, the obtained products, PN-MCC and PN-CNC, were washed and collected by centrifugation and dried at 60 °C for 24 h.⁵³

Preparation of Chitosan-Reinforced Cellulose Films. Chitosan (CS)-based nanocomposite films containing 3 wt % MCC, CNC, P-MCC, P-CNC, PN-MCC, and PN-CNC were successfully prepared using the same approach as for the elaboration of clay and graphene oxide-filled chitosan nanocomposites.^{39–42,46} Briefly, 50 mg of CS powder was dissolved completely in 4 mL of 1% (v/v) aqueous acetic acid solution, and the mixture was vigorously stirred for 120 min. A total of 1.5 mg of unmodified and modified cellulose filler (3 wt % with respect to chitosan) was dispersed in 2 mL of 1% (v/v) aqueous acetic acid solution and sonicated for 15 min. The filler dispersion was gradually added to the CS solution and the resulting mixture was stirred for further 90 min. The resulting solution was cast into plastic Petri dishes, allowing solvent removal and film formation after complete drying. The films were coded as CS@MCC-f, CS@CNC-f, CS@P-MCC-f, CS@P-CNC, CS@PN-MCC-f, and CS@PN-CNC-f.

Determination of Antimicrobial Activity. The antimicrobial activity of CS nanocomposite films against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) was evaluated using Japanese Industrial Standards JIS Z 2801:2000 (https://infostore.saiglobal.com/en-us/Standards/JIS-Z-2801-2000634364_SAIG_JSA_JSA_1462706/) with two modifications: first, the size of the tested samples was 2 × 2 cm, whereas the size of samples according to the standards is 5 × 5 cm. Second, the samples were sterilized by the UV method, whereas in the standard, the samples are sterilized with 70% ethanol. The methodology was described in our previous work.⁴² Gram-positive bacteria of *S. aureus* or Gram-negative *E. coli* were cultured on Luria Bertani (LB) medium at 37 °C on a rotary shaker. After the incubation, the test inoculum of *S. aureus* or *E. coli* containing 1×10^5 colony-forming units (CFU per mL) in 500-fold-diluted LB medium was prepared. The bacterial suspension was then transferred to films (2 × 2 cm). A neat CS film was examined as the control sample. After dripping suspensions of *S. aureus* or *E. coli* on the films, each sample was covered with a sterile film (1.7 × 1.7 cm). The samples were incubated in a moist chamber in the dark for 24 h at 37 °C. They were put in aseptic Falcon tubes containing phosphate buffer, vortexed, and removed from the tubes; then, they were serial-diluted with the remaining solution in phosphate buffer. Out of each dilution, 100 μ L of bacterial suspension was seeded on an agar plate and incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, viable cells of bacteria were counted. Each film was examined in triplicate and analyzed individually in four independent experiments. The antimicrobial activity of the films was calculated as a percentage of bacterial growth inhibition ($\pm$ SD) toward control cellulose-free films.

Hemolysis Assay. Blood from healthy donors was obtained from the Regional Blood Donation and Blood Treatment Center in Lodz, Poland. Erythrocytes were isolated from blood by centrifugation (3000 rpm, 10 min) at 4 °C, washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), and used immediately after separation. To study the impact of chitosan-cellulose nanocomposite on red blood cells (RBCs), washed erythrocytes (hematocrit, HTC 2%) were treated with films in the form of squares (0.5 × 0.5 cm). RBCs suspended in PBS (without chitosan-cellulose films) were used as a control. The samples were incubated at 37 °C for 1, 3, and 24 h. The samples were then centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the absorbance of the supernatant was measured spectrophotometrically at 540 nm (Jasco V-650, Jasco International Co., Osaka, Japan).⁶⁹ The percentage of hemolysis was determined based on the hemoglobin (Hb) amount released into the supernatants and calculated using the following formula (eq 1)

$$\% \text{ hemolysis} = A_s/A_c \times 100\% \quad (1)$$

where A_s is the absorbance of the sample and A_c is the absorbance of the samples containing erythrocytes in water (100% hemolysis).

Adsorption of Hemoglobin (Hb). The adsorption of hemoglobin onto the chitosan-cellulose nanocomposite was also investigated. Chitosan film squares (0.5 × 0.5 cm) were added to hemoglobin solutions (0.1% v/v) and incubated at 37 °C for 3 or 24 h. Absorbance of the hemoglobin solution was next measured at 540 nm. The percentage of hemoglobin adsorption was calculated from the formula (eq 2)

$$\text{adsorption of Hb } [\%] = 100\% - (A_s/A_c \times 100\%) \quad (2)$$

where A_s is the absorbance of the sample containing the chitosan-cellulose films and A_c is the absorbance of the control without chitosan-cellulose films.⁴²

Methemoglobin (Met-Hb). Methemoglobin was determined spectrophotometrically based on the absorption spectrum in the range from 440 to 700 nm (Jasco V-650).⁶⁹ The percentage of met-Hb in the sample was calculated from the absorbance at 630 and 700 nm (eq 3). Hemoglobin treated with potassium ferricyanide (100% met-Hb) was used as a positive control.

$$\% \text{ of met-Hb} = (A_{630} - A_{700})/(A_{630}^* - A_{700}^*)100\% \quad (3)$$

where A_{630} = the absorbance of a sample with/without chitosan-cellulose nanocomposites at 630 nm, A_{700} = the absorbance of a sample with/without chitosan-cellulose nanocomposites at 700 nm, A_{630}^* = the absorbance of a sample with/without chitosan-cellulose nanocomposites treated with potassium ferricyanide (100% met-Hb) at 630 nm, and A_{700}^* = the absorbance of a sample with/without chitosan-cellulose nanocomposites treated with potassium ferricyanide (100% met-Hb) at 700 nm.

Catalase Activity. Catalase (CAT) activity in erythrocytes was determined by the method of Aebi.⁷⁰ Erythrocytes were incubated for 3 or 24 h at 37 °C with/without chitosan-cellulose nanocomposite squares (0.5 cm × 0.5 cm). Enzyme activity was determined in hemolysates in the presence of 0.06% H_2O_2 diluted in 50 mM phosphate buffer (pH 7). The reaction was carried out for 1 min, measuring absorbance at $\lambda = 240$ nm with a Jasco V-650 spectrophotometer. One unit of catalase activity was defined as the activity required to degrade 1 μ mol hydrogen peroxide in 60 s. Catalase activity was calculated in relation to mg of hemoglobin in hemolysates. The calculation was based on the following formula (eq 4)

$$\text{activity (U/mL)} = (\Delta A \times R)/0.0145 \quad (4)$$

where ΔA = the decrease in absorbance tested at $\lambda = 240$ nm, R = the sample dilution, and 0.0145 = the micromolar absorption coefficient for hydrogen peroxide. The concentration of hemoglobin in the hemolysates was measured by the method of Drabkin.⁶⁹ The results are presented as a percentage of the control.

Statistical Analysis. Data are presented as mean $\pm$ SD from six sets of measurements for hemolysis, Hb adsorption, methemoglobin, and catalase activity and from three replications for antimicrobial activity. The statistical differences between the control and treatment groups and differences between films were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's analysis. $P < 0.05$ was accepted as statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation and Chemical Characterization of Phosphorylated Cellulose-Reinforced Chitosan Films. In the realm of reinforced polymer–filler nanocomposites, the accepted wisdom dictates two prerequisites: the nanosized dimension of the filler and the presence of functional groups having affinities with the matrix.^{71,72} These two characteristics account for good interfacial interactions between the polymer and the filler, which result in excellent dispersion and a dramatic improvement in the properties of the resulting nanocomposites. Based on these criteria, we have engineered

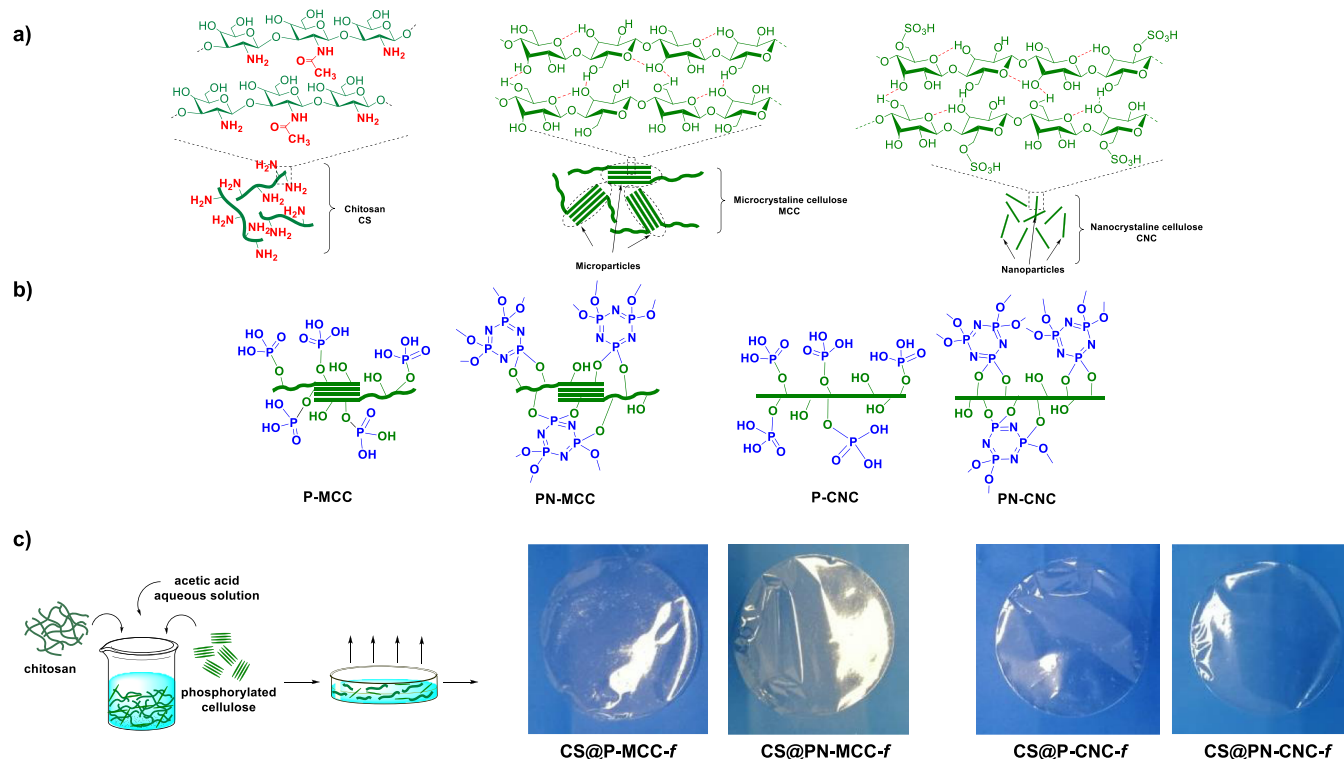


Figure 1. Preparation of phosphorylated cellulose-filled chitosan films. (a) Chemical structure of chitosan and cellulose, illustrating the difference between amorphous MCC and crystalline CNC. (b) Chemical structure of phosphorylated cellulose. (c) Multistep preparation procedure and digital photographs of the corresponding phosphorylated cellulose-entangled chitosan films.

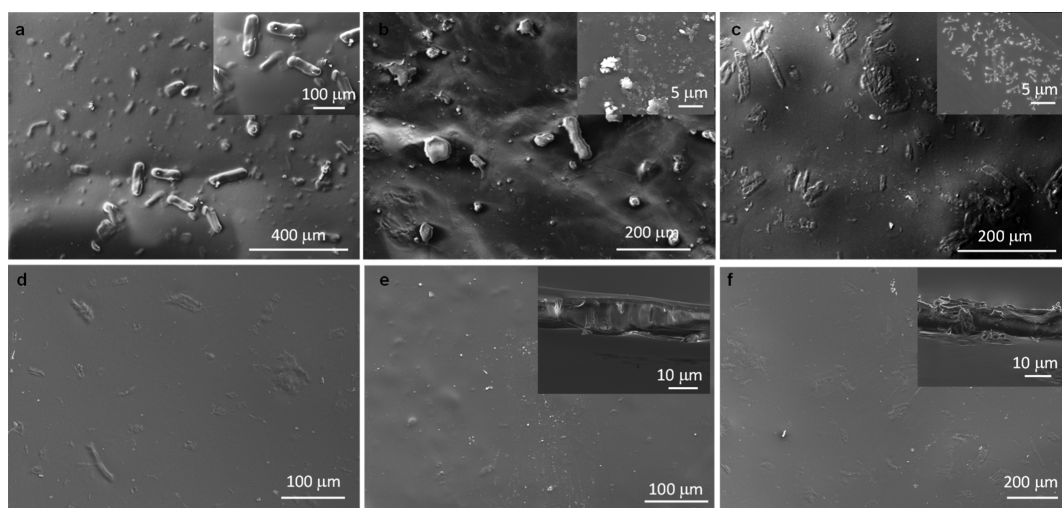


Figure 2. SEM of cellulose-filled chitosan films reinforced with microcrystalline cellulose in the top [(a) CS@MCC-f. (b) CS@P-MCC-f. (c) CS@PN-MCC-f] and on the bottom [(d) CS@CNC-f. (e) CS@P-CNC-f. (f) CS@PN-CNC-f]. Onset [(a–c), aggregated particles. (e,f) Visualization of the cross section of the film].

different fillers for an accurate comparative study. We used two different cellulosic fillers with microscale and nanoscale dimension to show the advantage of the so-called nanosize effect. Microcrystalline cellulose (MCC) is commercially available, whereas the nanosized cellulose (CNC) was prepared according to a well-established procedure.⁶⁸ The two fillers were also independently functionalized to simultaneously elucidate the influence of the size and surface chemistry of the filler on the final properties of the nanocomposites.⁵³ By installing phosphate groups in cellulose, we envisioned a good interfacial compatibility with chitosan, as

phosphates can interact with the positively charged amine groups of chitosan. Two phosphorylated reagents were used (POCl_3 and $\text{P}_3\text{N}_3\text{Cl}_6$), allowing surface functionalization with either $\text{P-O-P}(\text{O})(\text{OH})_2$ or with an inorganic $-\text{O}-\text{P}_3\text{N}_3-(\text{OH})_x$ ring.⁵³ The chemical structure of the cellulosic fillers is shown in Figure 1.

Irrespective to the cellulose filler, a homogeneous cellulose-chitosan aqueous solution was obtained after adding 3 wt % cellulose to the mixture. Evaporative-induced assembly of the resulting solutions provides high-quality crack-free cellulose-filled CS films.

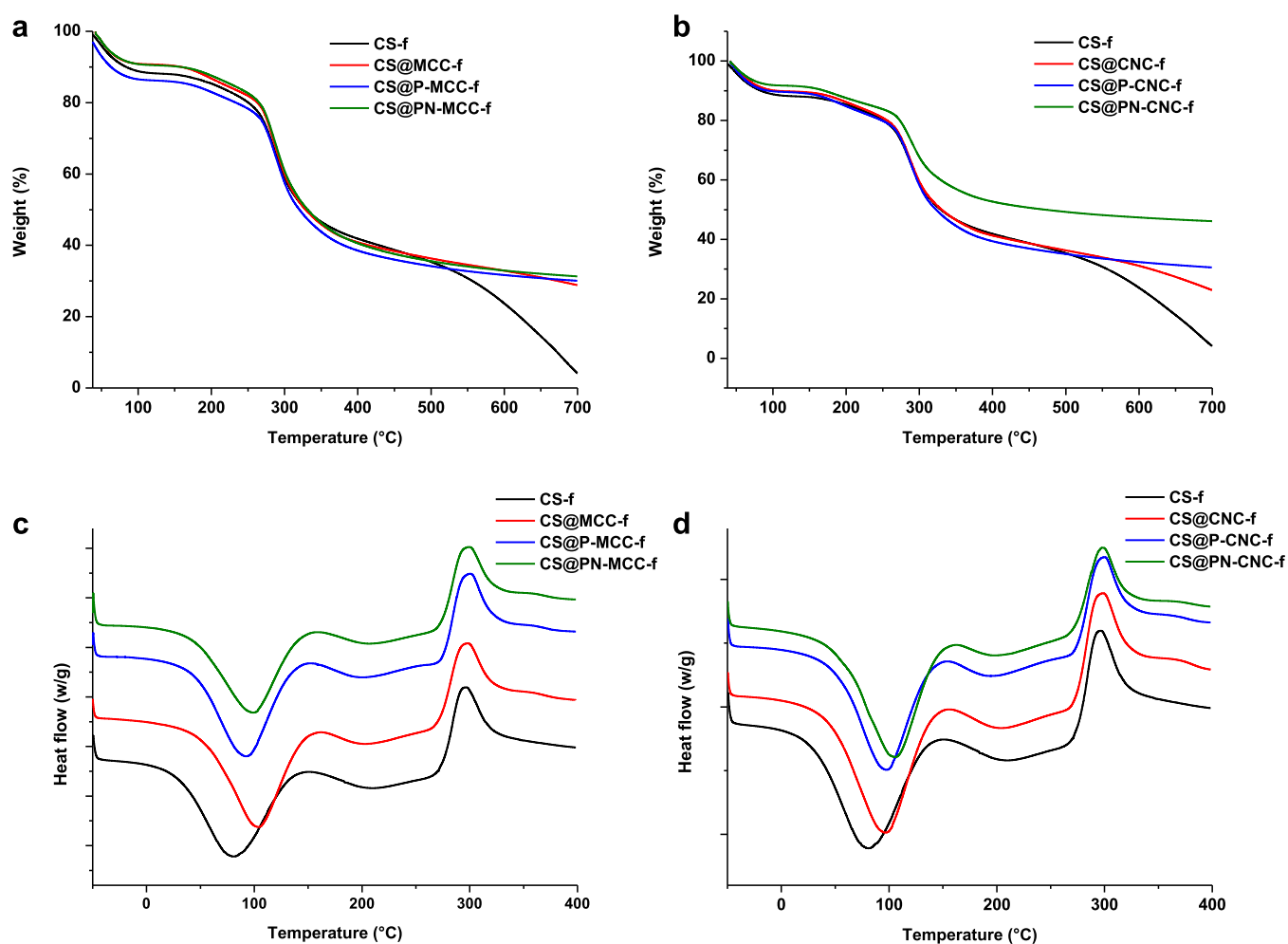


Figure 3. Thermal properties of cellulose-filled chitosan films (TGA and DSC). (a) TGA of the films reinforced with MCC series. (b) TGA of the films reinforced with CNC series. (c) DSC curves for the films reinforced with MCC series. (d) DSC curves of the films reinforced with CNC series.

In DRIFT, neat CS-f film gives typical signals of chitosan where vibration at 1022, 1330, 1551, 1641, and 3362 cm^{-1} is attributed to C–O–C, C–N, N–H, NHCO, and –OH, respectively^{39–42,46} (Figure S1). Without distinction, all the reinforced nanocomposites have the typical signature of chitosan, with a slight shift of some interacting groups including N–H and NHCO, suspected of interfacial interplay with the filler. In particular, we noticed a slight modification in the hydrogen-bonding pattern at 3282 and 3352 cm^{-1} for all reinforced chitosan films that afford one broad and fused vibration. This indicates to the occurrence of hydrogen-bonding interactions, involving both hydroxyl and amine groups. These assumptions can be consolidated by the similarities and highest affinities of the two sugar-based building blocks that have good interfacial properties through extended hydrogen bonding without the need for compatibilizers or plastisizers (e.g., glycerol, sorbitol) that are commonly used to reduce the hydrophilic–hydrophobic discrepancy at the interface in the special case of petroleum-based polymer-filled nanocomposites.⁷³ By contrast, precedents in the literature have established the occurrence of an intimate interplay of cellulose and chitosan through hydrogen bonding.⁷⁴ This entanglement is further facilitated by the surface similarities of the two carbohydrates, mainly through hydrogen bonding but also favorable chemical interaction

between phosphate and amine groups belonging, respectively, to cellulose fillers and the chitosan polymer.

Because the amount of the phosphorylated cellulosic fillers did not exceed 3 wt % in each case, it was difficult to recognize their typical signals.⁵³ This result is consistent with those previously reported for chitosan-graphene oxide^{40–42} and chitosan-clay nanocomposite films³⁹ with the same filler loading. At this stage, one can at least confirm that the microscale *versus* nanoscale size of the cellulose filler does not influence the macroscopic aspect of the resulting films nor their transparency.

Morphological, Thermal, and Mechanical Properties of Phosphorylated Cellulose-Reinforced Chitosan Films. The morphology of the resulting films was investigated using scanning electron microscopy (SEM) images (Figure 2). It has been previously shown that slow solvent evaporation of aqueous chitosan solution provides films that have a dense network and a smooth surface without open pores or surface roughness. Chitosan chains are actually drawn together through strong hydrogen bonding during solvent evaporation. In the case of chitosan-based nanocomposites, the difficulties for filler dispersion or the poor polymer–filler interfacial interactions are often confirmed by scanning microscopy, as the presence of aggregated particles or a rough surface leads to a discontinuous and heterogeneous network. If the two

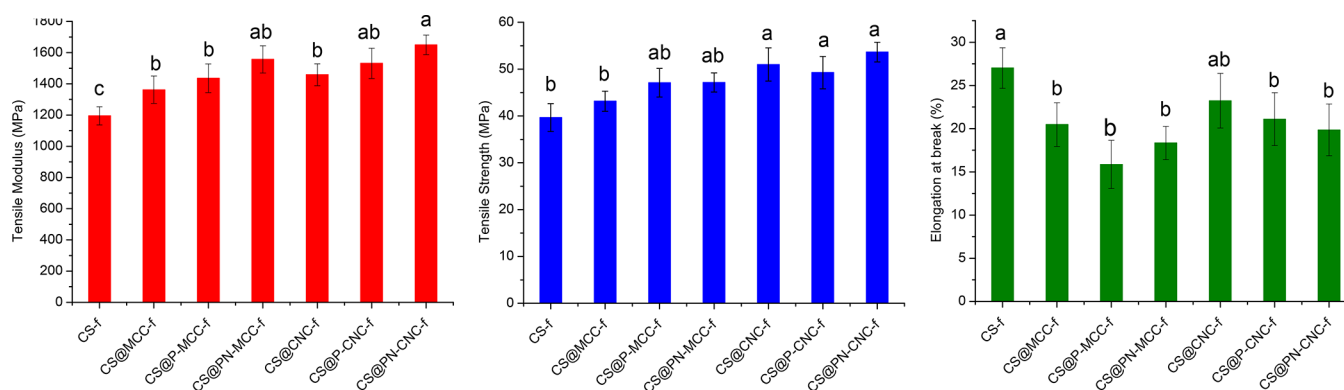


Figure 4. Mechanical properties of phosphorylated cellulose-filled chitosan films. From left to right. Tensile modulus, tensile strength, and elongation at break. Values are averaged based on five repeated tests. Means with the same letters are not significantly different at $P < 0.05$; data are means $\pm$ SD.

components are incompatible, phase segregation and separation occurs to reduce the surface energy of each phase, and consequently, agglomerated microparticulates, voids, and porous network could also appear. In our case, the comparison at a first glance of the network built from chitosan reinforced with microcrystalline cellulose and nanosized cellulose reveals a marked difference in terms of the network homogeneity and filler percolation. SEM of CS@MCC-f reveals the presence of rod-like objects of 120–155 μm in length and 40–50 μm in width, which is typical of poor dispersion of the filler. In the case of CS@P-MCC-f, although some aggregated particles are still present, they do not have the same regular shape as those observed in the case of CS@MCC-f, thereby attributing this divergence to the presence of phosphoric acid fragments in the surface of the used P-MCC cellulose fillers. In the case of CS@PN-MCC-f, few aggregated particles are still visible in the network. These particles emanate from the filler–filler interaction and display a uniform dendritic pattern rather than tubular shape. This interplay suggests that PN-MCC is probably connected to each other through the cyclophosphazene ring acting as a cross-linker. Distinctively, CS@CNC-f, CS@P-CNC-f, and CS@PN-CNC-f have a homogeneous network, consistent with the conventional wisdom that a nanosized filler can be easily dispersed in the matrix compared to the micro-sized ones (Figure 2).

The contact angle was also measured to see how the presence of the filler and the nature of the phosphoryl reagent affect the wettability of the surface and the hydrophilic–hydrophobic balance (Figure S2 and Table S1). Enhanced hydrophilicity was noticed for CS@P-CNC-f and CS@P-MCC-f, reaching 52 and 38°, respectively, compared to 83° obtained for neat chitosan CS-f. This result can be attributed to the polar acidic groups $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ generated during surface functionalization and the possible growth of the polyphosphate layer on top of the biocomposite surface. In contrast, a diverging pattern was observed for CNC and MCC, for which the latter enhances the hydrophilicity of the surface owing to the presence of amorphous regions with agglomerated microparticles, compared to CNC that is stiffer and has fewer hydroxyl groups. The introduction of hydrophobic and planar phosphazene ring counterbalances the two effects and gives surface properties similar to those of native chitosan, as gathered in Table S1. The nature of the filler affects the thickness of the nanocomposite films as native CS-f has a thickness of 15 μm . Incorporation of CNC and MCC increases

the thickness to 20 μm , and phosphorylated cellulose further increases the thickness to 30 μm (Table S1). As anticipated, these films generally display more pronounced hydrophilicity compared to hydrophobic chitosan-graphene oxide films reinforced with a similar loading of “3 wt %” of the corresponding particles.^{39–42,46}

TGA of the reinforced materials was also performed and plotted against the native chitosan film (Figure 3a,b). No significant variation was noticed at low temperature (degradation at 48 and 286 °C) as accurately confirmed through DTG analysis (Figure S3). At high temperature, however, the presence of cellulose, irrespective of its nature, allows for harvesting char residue superior to 24%, whereas a negligible char weight of 4 wt % was obtained for thermal degradation of chitosan alone at 700 °C. CS@PN-CNC-f is outstandingly stable, with a residue of 46 wt % at 700 °C, meaning that only half the weight of the bioplastic is decomposed. This result can be rooted in the excellent features of PN-CNC that combines the advantages of small-sized nanocrystals and the robust character of the grafted inorganic $(\text{P}=\text{N})_3$ tricyclophosphazene core. A similar improvement in thermal properties has already been reported using cyclotriphosphazene-based dendrimers and hybrid materials.^{75,76} DSC was also simultaneously investigated for the same goal (Figure 3c,d). All the materials exhibit a similar pattern of two characteristic bonds. Chitosan gives the first peak at 80 °C attributed to the removal of physisorbed water and the second at 296 °C because of its chemical degradation.⁷⁷ A common trend was observed for all reinforced nanocomposites that consist in shifting the two values to high temperature. However, the shift seems to be more substantial for the first variation compared to the one of chemical degradation, pointing to a substantial change in the state of physisorbed water molecules on the film surface. Previously, it was found that cellulose microfibrils retain easily evaporative moisture that normally leaves around 100 °C through water entrapment within the newly created hydrogen-bonding network.⁷⁸ Indeed, reinforcement through cellulose nanoparticles can be also exploited to chemically tune the wettability and surface properties of the conceived films as these scaffolds also behave to some extent as plastisizers.⁷⁹ Although no improvement in thermal properties was seen at lower temperature, a positive effect was recorded at high temperature treatment, owing certainly to the flame retardancy of phosphorylated cellulose embedded in a chitosan network.⁸⁰

Mechanical properties of the resulting films were also investigated (Figures 4 and S4). Tensile modulus and tensile strength are improved for cellulose-filled chitosan nanocomposites compared to native chitosan films. The incorporation of only 3 wt % of cellulosic hard-phase fillers into chitosan films allows adsorbance of a part of the external stress owing to their high Young's modulus. Tentatively, the following trend can be announced: (i) on the whole, the mechanical properties achieved with CNC derivatives are slightly better compared to those with MCC, suggesting the virtue of the nanosized effect of the filler for achieving an ideal nano-reinforcing effect in the polymer matrix owing to the highest surface area available for interaction with the matrix through nanoscale dispersion. It is well-established that filler agglomeration induces stress concentration spots in the polymer matrix and affects the dissipation of external stress through particle-polymer interaction.⁷¹ (ii) Phosphorylation improves the mechanical properties compared to native cellulose, and this statement is valid for both MCC and CNC. This should be attributed to enhanced interfacial interactions between the biopolymer and the filler as phosphate groups interact with amine and acetamide groups. (iii) PN-cellulose was more efficient as the filler compared to P-cellulose for both CNC and MCC derivatives, the highest values being reached for CS@PN-CNC-f. In quantitative terms, a large increase in the tensile modulus to 1649 MPa was noticed in CS@PN-CNC-f compared to 1195 MPa for neat chitosan films. An improvement in tensile strength of about 53% was also seen, compared to 39% for native chitosan films. A tentative explanation can be the slight rigidity of the phosphazene ring and its probable role as a cross-linker for individual fibers but also for its possible interfacial interaction with functional groups in the biopolymer. Whichever filler was used, a substantial decrease in the elongation at break was noticed for all these materials, in consistency with entanglement of the filler in the biopolymer network. The entanglement of cellulose as the hard phase affects the flexibility and plasticity of the network and leads to substantial local stress concentrations in the polymer matrix, which reduce the elongation at the break value of the resulting nanocomposite films.⁸¹ Notably, the use of cellulose as reinforcing particles allowed comparable mechanical properties to be obtained, using the same loading of the graphene oxide filler (3 wt %).⁴² Indeed, CS-GO-f has a tensile modulus of 1800 MPa, whereas the one for CS@PN-CNC-f was equal to 1649 MPa. Comparable tensile strengths of 60 and 53 MPa were also obtained for CS-GO-f and CS@PN-CNC-f, respectively. A comparable decrease in their elongation at break was also noticed (20% for both CS-GO-f and CS@PN-CNC-f).⁴²

Biological Activity of Chitosan-Modified Cellulose Films. We next made an assessment of the biological activity of these films, formulating the following questions: (i) does the filler size (micro vs nano) matter in the biological activity of the films? and (ii) does surface modification imparts interesting biological activity? Comparative experiments can provide key learning to build more efficient, multifunctional nanocomposites.

We discovered that the introduction of a tiny amount of cellulose in the chitosan backbone imparts cellulose-filled chitosan films with high antimicrobial activity compared to the native chitosan film alone (Figure 5). Indeed, CS@MCC-f inhibits both *S. aureus* and *E. coli* compared to CS@CNC-f. Unexpectedly, a small biological response was observed for

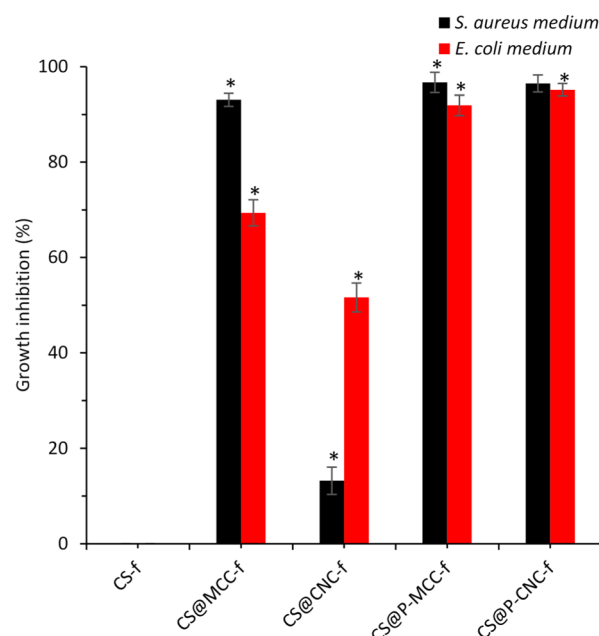


Figure 5. Antibacterial activity of the resulting nanocomposite films. Inhibition (%) of *S. aureus* (black) and *E. coli* (red) after 24 h incubation. Each bar represents the average and SD taken from $n \geq 3$ wells from three independent experiments. Comparison was made using one-way analysis of the Student *t*-test. * $p < 0.05$ vs control group.

CS@CNC-f, not exceeding 10% inhibition for *S. aureus*, highlighting the limitation of downsizing cellulose to the nanoscale, when biological activity is required. This finding parallels the abundance of report in the literature regarding decorating CNC with silver, zinc, titanium dioxide, and other antimicrobial nanoparticles for the preparation of biologically responsive materials.⁸²

Total inhibition was even reached with CS@P-MCC-f and CS@P-CNC-f in which phosphorylated micro- and nano-cellulose have been used as fillers. The inhibition can be attributed to the association of cellulose and phosphorus incorporation in chitosan films. The outstanding inhibitory effect reached without using known antibacterial agents (silver or other metal nanoparticles, oxides, and graphene derivatives)^{41,46,83} is of utmost importance as the introduction of any exogenous object might add cost and, more importantly, it might interfere with the full sustainability of cellulose-filled chitosan films. Moreover, such films are likely to be readily biodegradable.

Our attention was then given to other biological activity including hemolysis, hemoglobin adsorption, catalase intracellular activity, and methemoglobin (Figure 6a–d). Determination of the hemolytic properties of cellulose-filled chitosan nanocomposites is an important aspect of the present work, considering that these materials are intended to use as additives in food films and in food-packaging technology. The as-prepared bioplastics are expected to have a direct contact with humans, for example, in the wounds, creating a potential source of hemolytic damage or can be digested by animals after disposal in the environment as microplastics. Therefore, it is important to investigate the harmlessness of these new plastics toward the erythrocyte membrane. The *in vitro* tests performed are the basis for further *in vivo* analyses and risk assessment resulting from the use of cellulose-filled

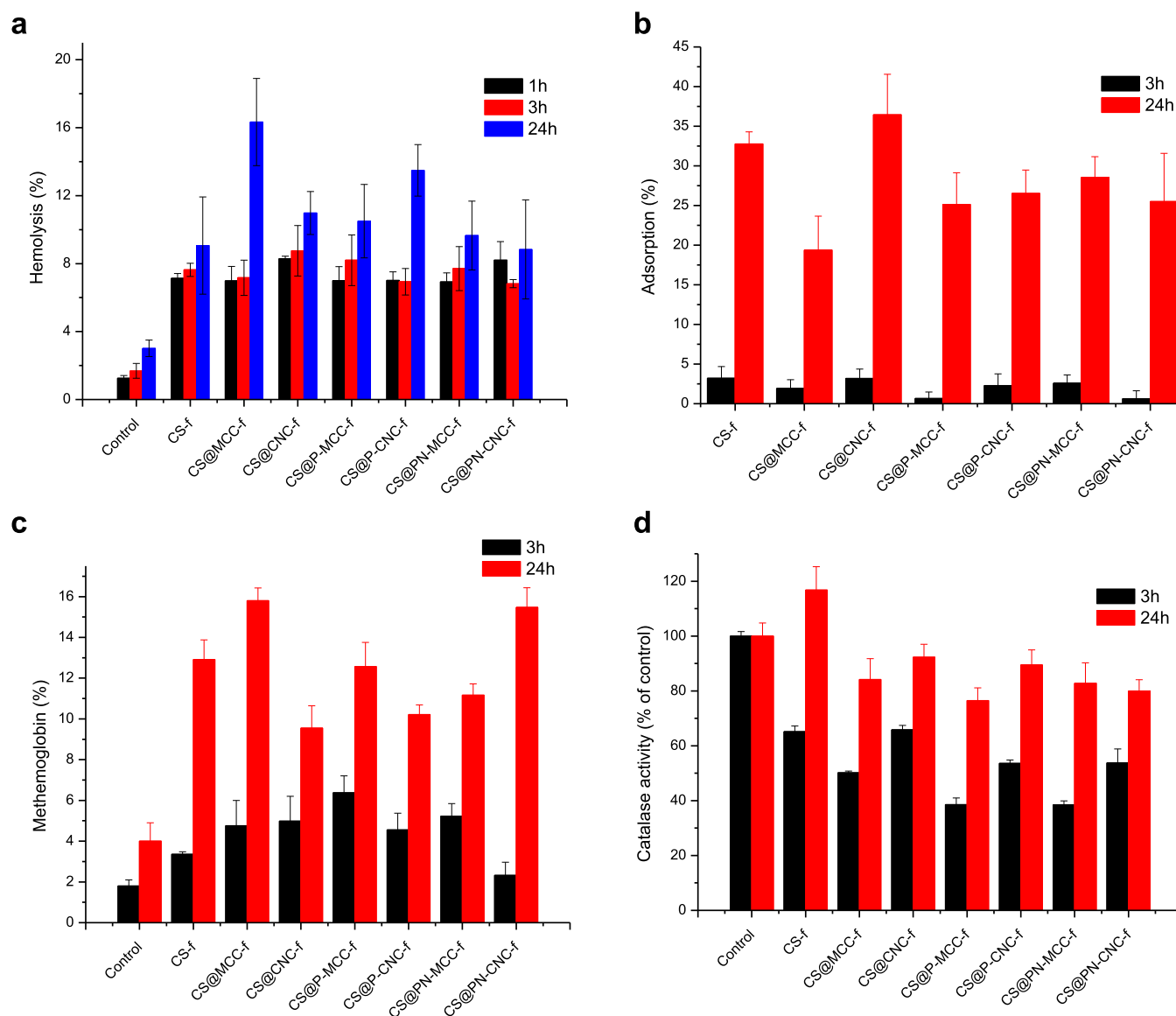


Figure 6. Hemolysis of erythrocytes after incubation with cellulose-filled chitosan materials (a); hemoglobin adsorption on the surface of cellulose-filled chitosan films (b); hemoglobin oxidation (c); and catalase activity (d) after incubation with cellulose-filled chitosan films. In (d), for control (red blood cells without films), catalase activity has been taken as 100% and the values for samples in the presence of films are presented as a percentage of this control. All changes are statistically significant compared to the control ($n = 6$, $p < 0.05$).

chitosan films. Human erythrocyte hemolysis was determined by measuring the hemoglobin content in the supernatant after incubation for 1, 3, and 24 h with cellulose-chitosan nanocomposites (Figure 6a). All the cellulose-chitosan films induced hemolysis, although it did not exceed 6–8% after incubation for 1 and 3 h, with no statistically significant differences between the nanocomposites. After 24 h, the percentage of hemolysis increased to 10–16%, the biggest increase (16.3%) being recorded for CS@MCC-f.

We also investigated the possibility of hemoglobin adsorption on the surface of cellulose-filled chitosan films to confirm or rule out the occurrence of significant hemolysis (Figure 6b). Incubation of all films with hemolysate for 3 h led to a slight adsorption of hemoglobin on the surface. After 24 h of incubation, a significant increase in the adsorption of hemoglobin was observed, reaching 19–36%. Native cellulose fillers induce a diverging pattern depending on their size as the lowest percentage of adsorption was recorded for CS@MCC-f,

whereas the highest was recorded for CS@CNC-f. The results suggest that hemoglobin released from erythrocytes is attached to cellulose-chitosan materials by 24 h, which decreases the content of hemoglobin in the solution, and was misread as a lack of any increase in hemolysis by this time.

To sum up, hemoglobin adsorption seems to be easier with CS@CNC-f and CS@-f, both displaying lower wettability. This result agrees with our previous results dealing with hemoglobin adsorption using chitosan-functionalized graphene nanocomposite films⁴² and fatty acid-modified silica materials.⁸⁴ Increased hemolysis was also observed for CS@CNC-f and CS@MCC-f with respect to native chitosan. In contrast, the role of surface phosphorylation seems to be contradictory in comparing conjointly the behavior of CS@MCC-f and CS@P-MCC-f on the one hand and of CS@CNC-f and CS@P-CNC-f on the other hand. Indeed, while hemolysis was reduced after phosphorylation of micro-sized cellulose, an increase in hemolysis was observed using P-CNC as a filler compared to

native CNC. Several factors alone or in combination could explain these results, including the presence of a glucose-like surface in cellulose fillers that may influence red blood cells. Plausible scenarios are a decrease in the ionic strength of the external solution leading to membrane expansion and the formation of small pores that then causes a release of hemoglobin.⁸⁵ Also, the possible adsorption of some proteins of the erythrocytes on the surface of cellulose-filled-chitosan films could significantly change the lifetime of erythrocytes.⁸⁶ Finally, high glucose concentration generates free radicals in an auto-oxidation process of glucose, resulting in an increase in cell lipid peroxidation and membrane damage,^{87–89} but further studies are needed before a valid explanation can be reached.

As an important antioxidant enzyme to defend organisms against excessive reactive oxygen species (ROS), CAT is essential; variation in its activity reflects to some extent the oxidation–reduction equilibrium in cells. After 3 h of incubation with cellulose-chitosan nanocomposites, erythrocyte catalase activity decreased significantly compared to the control (Figure 6d). The lowest values (~40%) were noticed for CS@P-MCC-*f* and CS@PN-MCC-*f* and slightly higher (~50%) for CS@MCC-*f*. After 24 h of incubation, catalase activity increased compared to the 3 h of incubation, but only the native form of CS@*f* was increased compared to the control. These findings suggest that cellulose incorporation reduces catalase activity, leading to oxidative imbalance. The mechanism of action of cellulose-chitosan nanocomposites on catalase activity is not clear, and depletion of NADPH necessary for maintaining enzyme activity is among the factors thought to decrease the catalase activity in erythrocytes.⁹⁰

We also tested the influence of cellulose-chitosan nanocomposite films on oxidation of hemoglobin in erythrocytes because a decreased catalase activity correlates with an increased methemoglobin (met-Hb) level in RBCs.^{42,91} Our cellulose-filled chitosan films led to oxidation of hemoglobin after 3 h of incubation with the erythrocytes, except CS@PN-CNC-*f*. For the control, a marginal percentage of methemoglobin (1.8%) was noticed after 3 h of incubation, increasing to 4% after 24 h of incubation (Figure 6c). The highest methemoglobin content (6.4%) was after 3 h of incubation in the sample treated with CS@P-MCC-*f*. After 24 h, statistically significant changes in the percentage of met-Hb content were observed, with the highest content for CS@PN-MCC-*f* (15.8%) and CS@PN-CNC-*f* (15.5%) and the lowest value for CS@CNC-*f* (~9.6%). These results are similar to those previously obtained using graphene-filled chitosan nanocomposites, with which we had also observed a reduction in catalase activity and an increase in the level of metHb.⁴³

CONCLUSIONS

Massive exploration of renewable resources as a sustainable alternative in nanocomposites is suspected to resolve the thorny issue surrounding currently used plastics. Herein, we rationally designed fully sustainable films by merging the two most abundant biobased building blocks, namely, chitosan derived from marine waste and disassembled micro-sized and nanosized phosphorylated cellulose. Phosphorus incorporation in cellulose fillers was dictated by the notorious biological properties and flame retardancy of phosphorylated materials. We have indeed succeeded in devising films with slightly improved thermal and mechanical performance as well as tunable interfacial properties. The noticeable change in thermal properties (high char residue) can be rooted in the

flame retardancy of phosphorus derivatives that extinguish the heat/fire, preventing its propagation, which later causes massive carbonization. Increase in the mechanical properties of cellulose-filled chitosan films, especially those reinforced with nanosized cellulose, can be attributed to the addition of a hard phase (CNCs) into a softer chitosan matrix, which absorbs part of the external stress (a high Young's modulus), whereas particle–particle and particle–polymer friction provides a way of dissipating stress. Biological activity also seems to be partially dependent on the nature of the functional reagent and the size of the filler. Interestingly, mechanical and biological properties attained herein are comparable to perhaps better than those recently reported using graphene oxide as nano-reinforcing particles.⁴² Besides, the presence of cellulose nanocrystals in polymer nanocomposites is expected to lead a more tortuous path to permeation of water and gas molecules for improving the barrier properties.^{92–94} Moreover, the addition of CNCs promotes the biodegradability of the whole nanocomposite films, which is of pivotal interest in the realm of bioplastics.^{95,96} These two points warrant further investigation to gain additional knowledge on these promising bioplastics. Considering the abundance of cellulose, its cost-effectiveness, and trivial surface functionalization and keeping in mind the tedious steps necessary for graphite oxidation, surface modification, and filler dispersion, cellulose could stand as a better chance of promoting the next generation of mechanically sustained and biologically-active bioplastics. To sum up, we have herein shown that holistic properties can be simultaneously tailored in the final nanomaterial through cellulose filler phosphorylation, which is suspected to broaden the range of modified cellulose fillers and fully sustainable bio(nano)composites.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.0c04426>.

DRIFT spectra, contact-angle measurements, typical stress–strain curves, and film thickness (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Maria Bryszewska – Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland; Email: maria.bryszewska@biol.uni.lodz.pl

Abdelkrim El Kadib – Euromed Research Center, Engineering Division, Euro-Med University of Fes (UEMF), 30070 Fès, Morocco; orcid.org/0000-0002-2213-7732; Email: a.elkadib@euromed.org

Authors

Sara Blilid – Euromed Research Center, Engineering Division, Euro-Med University of Fes (UEMF), 30070 Fès, Morocco; Laboratory of Organometallic and Macromolecular Chemistry-Composites Materials, Faculty of Sciences and Technologies, Cadi Ayyad University, 40000 Marrakech, Morocco; Institut Charles Gerhardt Montpellier, ICGM, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, 34296 Montpellier Cedex 5, France; EPHE, PSL Research University, 75014 Paris, France

Marta Kędzierska – Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland

Katarzyna Miłowska – Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0002-4050-2756

Natalia Wrońska – Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland; orcid.org/0000-0002-7823-0450

Mounir El Achaby – Materials Science and Nano-Engineering (MSN) Department, Mohammed VI Polytechnic University (UM6P), 43150 Benguerir, Morocco; orcid.org/0000-0001-6694-3739

Nadia Katir – Euromed Research Center, Engineering Division, Euro-Med University of Fes (UEMF), 30070 Fès, Morocco

Emmanuel Belamie – Institut Charles Gerhardt Montpellier, ICGM, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, 34296 Montpellier Cedex 5, France; EPHE, PSL Research University, 75014 Paris, France; orcid.org/0000-0003-4699-9035

Bruno Alonso – Institut Charles Gerhardt Montpellier, ICGM, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, 34296 Montpellier Cedex 5, France; orcid.org/0000-0002-3430-1931

Katarzyna Lisowska – Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland

Mohammed Lahcini – Laboratory of Organometallic and Macromolecular Chemistry-Composites Materials, Faculty of Sciences and Technologies, Cadi Ayyad University, 40000 Marrakech, Morocco; Chemical & Biochemical Sciences (CBS), Mohammed VI Polytechnic University (UM6P), 43150 Benguerir, Morocco; orcid.org/0000-0003-1049-7906

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acssuschemeng.0c04426>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from Projet Prioritaire (PPR1/2015/73), PHC Toubkal CNRS-CNRS (19/87), and the National Science Centre Poland grant no. 2017/25/B/NZ9/02900 is acknowledged.

REFERENCES

- (1) Okada, A.; Usuki, A. Twenty Years of Polymer-Clay Nanocomposites. *Macromol. Mater. Eng.* **2006**, *291*, 1449–1476.
- (2) Sinha Ray, S.; Okamoto, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 1539–1641.
- (3) Sinharay, S.; Bousmina, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Prog. Mater. Sci.* **2005**, *50*, 962–1079.
- (4) Sanusi, O. M.; Benelfellah, A.; Ait Hocine, N. Clays and carbon nanotubes as hybrid nanofillers in thermoplastic-based nanocomposites - A review. *Appl. Clay Sci.* **2020**, *185*, 105408.
- (5) George, J.; Ishida, H. A review on the very high nanofiller-content nanocomposites: Their preparation methods and properties with high aspect ratio fillers. *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *86*, 1–39.
- (6) Lambert, S.; Wagner, M. Environmental performance of bio-based and biodegradable plastics: the road ahead. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 6855–6871.

(7) Vollmer, I.; Jenks, M. J. F.; Roelands, M. C. P.; White, R. J.; van Harmelen, T.; de Wild, P.; van der Laan, G. P.; Meirer, F.; Keurentjes, J. T. F.; Weckhuysen, B. M. Beyond Mechanical Recycling: Giving New Life to Plastic Waste. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 15402.

(8) Jambeck, J. R.; Geyer, R.; Wilcox, C.; Siegler, T. R.; Perryman, M.; Andrady, A.; Narayan, R.; Law, K. L. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* **2015**, *347*, 768–771.

(9) Corcoran, P. L. Benthic plastic debris in marine and fresh water environments. *Environ. Sci.: Processes* **2015**, *17*, 1363–1369.

(10) Mattsson, K.; Hansson, L.-A.; Cedervall, T. Nano-plastics in the aquatic environment. *Environ. Sci.: Processes* **2015**, *17*, 1712–1721.

(11) MacArthur, D. E.; Waughray, D.; Stuchtey, M. *The New Plastics Economy, Rethinking the Future of Plastics*; World Economic Forum, 2016.

(12) Ruiz-Hitzky, E.; Fernandes, F. M. Progress in Bionanocomposites: From green plastics to biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1391.

(13) Ruiz-Hitzky, E.; Darder, M.; Aranda, P. Functional biopolymer nanocomposites based on layered solids. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3650–3662.

(14) El Hankari, S.; Bousmina, M.; El Kadib, A. Biopolymer@Metal-Organic Framework Hybrid Materials: A Critical Survey. *Prog. Mater. Sci.* **2019**, *106*, 100579.

(15) Raquez, J.-M.; Habibi, Y.; Murariu, M.; Dubois, P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1504–1542.

(16) Pourchez, J.; Chivas-Joly, C.; Longuet, C.; Leclerc, L.; Sarry, G.; Lopez-Cuesta, J.-M. End-of-life incineration of nanocomposites: new insights into nanofiller partitioning into by-products and biological outcomes of airborne emission and residual ash. *Environ. Sci.: Nano* **2018**, *5*, 1951–1964.

(17) Visakh, P.; Thomas, S.; Pothan, L. A. Fully green bionanocomposites. *A Handbook of Applied Biopolymer Technology*; Royal Society of Chemistry, 2011; pp 102–128.

(18) Ward, A. M.; Wyllie, G. R. A. Bioplastics in the General Chemistry Laboratory: Building a Semester-Long Research Experience. *J. Chem. Educ.* **2019**, *96*, 668–676.

(19) Hwang, K.-R.; Jeon, W.; Lee, S. Y.; Kim, M.-S.; Park, Y.-K. Sustainable bioplastics: Recent progress in the production of bio-building blocks for the bio-based next-generation polymer PEF. *Chem. Eng. J.* **2020**, *390*, 124636.

(20) Calvino, C.; Macke, N.; Kato, R.; Rowan, S. J. Development, processing and applications of bio-sourced cellulose nanocrystal composites. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *103*, 101221.

(21) Liu, Q.; Duan, B.; Xu, X.; Zhang, L. Progress in rigid polysaccharide-based nanocomposites with therapeutic functions. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 5690–5713.

(22) Nadar, S. S.; Vaidya, L.; Maurya, S.; Rathod, V. K. Polysaccharide based metal organic frameworks (polysaccharide-MOF): A review. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *396*, 1–21.

(23) Boury, B.; Plumejeau, S. Metal oxides and polysaccharides: an efficient hybrid association for materials chemistry. *Green Chem.* **2015**, *17*, 72–88.

(24) Yan, N.; Chen, X. Sustainability: Don't waste seafood waste. *Nature* **2015**, *524*, 155–157.

(25) El Kadib, A. Chitosan as a sustainable organocatalyst: a concise overview. *ChemSusChem* **2015**, *8*, 217–244.

(26) Molnár, Á. The use of chitosan-based metal catalysts in organic transformations. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *388*, 126–171.

(27) Yi, H.; Wu, L.-Q.; Bentley, W. E.; Ghodssi, R.; Rubloff, G. W.; Culver, J. N.; Payne, G. F. Biofabrication with Chitosan. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2881–2894.

(28) Sahariah, P.; Mässon, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 3846–3868.

(29) Ali, A.; Ahmed, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 273–286.

(30) Pavinatto, F. J.; Caseli, L.; Oliveira, O. N. Chitosan in Nanostructured Thin Films. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1897–1908.

- (31) El Kadib, A.; Bousmina, M.; Brunel, D. Recent progress in chitosan bio-based soft nanomaterials. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 308–331.
- (32) El Kadib, A. Green and Functional Aerogels by Macromolecular and Textural Engineering of Chitosan Microspheres. *Chem. Rec.* **2020**, *20*, 753–772.
- (33) Wang, H.; Qian, J.; Ding, F. Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 395–413.
- (34) Priyadarshi, R.; Rhim, J.-W. Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2020**, *62*, 102346.
- (35) Kumar, S.; Mukherjee, A.; Dutta, J. Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *97*, 196–209.
- (36) Chabbi, J.; Jennah, O.; Katir, N.; Lahcini, M.; Bousmina, M.; El Kadib, A. Aldehyde-functionalized chitosan-montmorillonite films as dynamically-assembled, switchable-chemical release bioplastics. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *183*, 287–293.
- (37) Chen, H.; Zhao, R.; Hu, J.; Wei, Z.; McClements, D. J.; Liu, S.; Li, B.; Li, Y. One-Step Dynamic Imine Chemistry for Preparation of Chitosan-Stabilized Emulsions Using a Natural Aldehyde: Acid Trigger Mechanism and Regulation and Gastric Delivery. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 5412–5425.
- (38) Chabbi, J.; Aqil, A.; Katir, N.; Vertruyen, B.; Jérôme, C.; Lahcini, M.; El Kadib, A. Aldehyde-conjugated chitosan-graphene oxide glucodynamers: Ternary cooperative assembly and controlled chemical release. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *230*, 115634.
- (39) Frindy, S.; Primo, A.; Qaiss, A. e. k.; Bouhfid, R.; Lahcini, M.; Garcia, H.; Bousmina, M.; El Kadib, A. Insightful understanding of the role of clay topology on the stability of biomimetic hybrid chitosan-clay thin films and CO₂-dried porous aerogel microspheres. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *146*, 353–361.
- (40) Frindy, S.; Primo, A.; Ennaji, H.; el kacem Qaiss, A.; Bouhfid, R.; Lahcini, M.; Essassi, E. M.; Garcia, H.; El Kadib, A. Chitosan-graphene oxide films and CO₂-dried porous aerogel microspheres: Interfacial interplay and stability. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *167*, 297–305.
- (41) Anouar, A.; Katir, N.; Mamede, A.-S.; Aboulaich, A.; Draoui, K.; Royer, S.; El Kadib, A. Synthesis and multifaceted use of phosphorylated graphene oxide: growth of titanium dioxide clusters, interplay with gold nanoparticles and exfoliated sheets in bioplastics. *Mater. Chem. Front.* **2019**, *3*, 242–250.
- (42) Wrońska, N.; Anouar, A.; El Achaby, M.; Zawadzka, K.; Kędzierska, M.; Miłowska, K.; Katir, N.; Draoui, K.; Różalska, S.; Piwoński, I.; Bryszewska, M.; El Kadib, A.; Lisowska, K. Chitosan-Functionalized Graphene Nanocomposite Films: Interfacial Interplay and Biological Activity. *Materials* **2020**, *13*, 998.
- (43) Pighinelli, L.; Kucharska, M. Chitosan-hydroxyapatite composites. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93*, 256–262.
- (44) Wang, S.-F.; Shen, L.; Zhang, W.-D.; Tong, Y.-J. Preparation and Mechanical Properties of Chitosan/Carbon Nanotubes Composites. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3067–3072.
- (45) Liu, Y.-L.; Chen, W.-H.; Chang, Y.-H. Preparation and properties of chitosan/carbon nanotube nanocomposites using poly(styrene sulfonic acid)-modified CNTs. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 232–238.
- (46) Hammi, N.; Wrońska, N.; Katir, N.; Lisowska, K.; Marcotte, N.; Cacciaguerra, T.; Bryszewska, M.; El Kadib, A. Supramolecular Chemistry-Driven Preparation of Nanostructured, Transformable, and Biologically Active Chitosan-Clustered Single, Binary, and Ternary Metal Oxide Bioplastics. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 61–69.
- (47) Izaguirre, N.; Gordobil, O.; Robles, E.; Labidi, J. Enhancement of UV absorbance and mechanical properties of chitosan films by the incorporation of solvolytically fractionated lignins. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *155*, 447–455.
- (48) Hänninen, A.; Sarlin, E.; Lyyra, I.; Salpavaara, T.; Kellomäki, M.; Tuukkanen, S. Nanocellulose and chitosan based films as low cost, green piezoelectric materials. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *202*, 418–424.
- (49) Crouvisier-Union, K.; Regina da Silva Farias, F.; Arunatat, S.; Griffin, D.; Gerometta, M.; Rocca-Smith, J. R.; Weber, G.; Sok, N.; Karbowski, T. Functionalization of chitosan with lignin to produce active materials by waste valorization. *Green Chem.* **2019**, *21*, 4633–4641.
- (50) Zhu, K.; Wang, Y.; Lu, A.; Fu, Q.; Hu, J.; Zhang, L. Cellulose/Chitosan Composite Multifilament Fibers with Two-Switch Shape Memory Performance. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, *7*, 6981–6990.
- (51) de Mesquita, J. P.; Donnici, C. L.; Pereira, F. V. Biobased Nanocomposites from Layer-by-Layer Assembly of Cellulose Nanowhiskers with Chitosan. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 473–480.
- (52) Cabañas-Romero, L. V.; Valls, C.; Valenzuela, S. V.; Roncero, M. B.; Pastor, F. I. J.; Diaz, P.; Martínez, J. Bacterial Cellulose-Chitosan Paper with Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 1568–1577.
- (53) Bilid, S.; Katir, N.; El Haskouri, J.; Lahcini, M.; Royer, S.; El Kadib, A. Phosphorylated micro- vs. nano-cellulose: a comparative study on their surface functionalisation, growth of titanium-oxophosphate clusters and removal of chemical pollutants. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 15555–15562.
- (54) Illy, N.; Fache, M.; Ménard, R.; Negrell, C.; Caillol, S.; David, G. Phosphorylation of bio-based compounds: the state of the art. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 6257–6291.
- (55) Barthel, S.; Heinze, T. Acylation and carbanilation of cellulose in ionic liquids. *Green Chem.* **2006**, *8*, 301–306.
- (56) Eyley, S.; Thielemans, W. Surface modification of cellulose nanocrystals. *Nanoscale* **2014**, *6*, 7764–7779.
- (57) Wohlhauser, S.; Delepierre, G.; Labet, M.; Morandi, G.; Thielemans, W.; Weder, C.; Zoppe, J. O. Grafting Polymer-sfromCellulose Nanocrystals: Synthesis, Properties, and Applications. *Macromolecules* **2018**, *51*, 6157–6189.
- (58) Thomas, B.; Raj, M. C.; Athira, K. B.; Rubiyah, M. H.; Joy, J.; Moores, A.; Drisko, G. L.; Sanchez, C. Nanocellulose, a Versatile Green Platform: From Biosources to Materials and Their Applications. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 11575–11625.
- (59) Gospodinova, N.; Grelard, A.; Jeannin, M.; Chitanu, G. C.; Carpov, A.; Thiéry, V.; Besson, T. Efficient solvent-free microwave phosphorylation of microcrystalline cellulose. *Green Chem.* **2002**, *4*, 220–222.
- (60) Lukasheva, N. V.; Tolmachev, D. A.; Karttunen, M. Mineralization of phosphorylated cellulose: crucial role of surface structure and monovalent ions for optimizing calcium content. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 1067–1077.
- (61) Luo, X.; Yuan, J.; Liu, Y.; Liu, C.; Zhu, X.; Dai, X.; Ma, Z.; Wang, F. Improved Solid-Phase Synthesis of Phosphorylated Cellulose Microsphere Adsorbents for Highly Effective Pb²⁺ Removal from Water: Batch and Fixed-Bed Column Performance and Adsorption Mechanism. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2017**, *5*, 5108–5117.
- (62) Ghanadpour, M.; Carosio, F.; Larsson, P. T.; Wågberg, L. Phosphorylated Cellulose Nanofibrils: A Renewable Nanomaterial for the Preparation of Intrinsically Flame-Retardant Materials. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 3399–3410.
- (63) Ghanadpour, M.; Carosio, F.; Ruda, M. C.; Wågberg, L. Tuning the Nanoscale Properties of Phosphorylated Cellulose Nanofibril-Based Thin Films To Achieve Highly Fire-Protecting Coatings for Flammable Solid Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 32543–32555.
- (64) Chen, L.; Ruan, C.; Yang, R.; Wang, Y.-Z. Phosphorus-containing thermotropic liquid crystalline polymers: a class of efficient polymeric flame retardants. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 3737–3749.
- (65) Wen, P.; Tai, Q.; Hu, Y.; Yuen, R. K. K. Cyclotriphosphazene-Based Intumescent Flame Retardant against the Combustible Polypropylene. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2016**, *55*, 8018–8024.
- (66) Caminade, A.-M. Phosphorus dendrimers for nanomedicine. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 9830–9838.

- (67) Bowler, M. W.; Cliff, M. J.; Waltho, J. P.; Blackburn, G. M. Why did Nature select phosphate for its dominant roles in biology? *New J. Chem.* **2010**, *34*, 784–794.
- (68) Beck-Candanedo, S.; Roman, M.; Gray, D. G. Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1048–1054.
- (69) Drabkin, D. L. Spectrophotometric studies; the crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. *J. Biol. Chem.*; 1946; *164*, 703–723. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21001166/>
- (70) Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1984; Vol. *105*, pp 121–126.
- (71) Crosby, A. J.; Lee, J. Y. Polymer nanocomposites: the “nano” effect on mechanical properties. *Polym. Rev.* **2007**, *47*, 217–229.
- (72) Moon, R. J.; Martini, A.; Nairn, J.; Simonsen, J.; Youngblood, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3941–3994.
- (73) Mensitieri, G.; Di Maio, E.; Buonocore, G. G.; Nedi, I.; Oliviero, M.; Sansone, L.; Iannace, S. Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 72–80.
- (74) Abdul Khalil, H. P. S.; Saurabh, C. K.; Adnan, A. S.; Nurul Fazita, M. R.; Syakir, M. I.; Davoudpour, Y.; Rafatullah, M.; Abdullah, C. K.; Haafiz, M. K. M.; Dungani, R. A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *150*, 216–226.
- (75) Brahmi, Y.; Katir, N.; Ianchuk, M.; Collière, V.; Essassi, E. M.; Ouali, A.; Caminade, A.-M.; Bousmina, M.; Majoral, J. P.; El Kadib, A. Low temperature synthesis of ordered mesoporous stable anatase nanocrystals: the phosphorus dendrimer approach. *Nanoscale* **2013**, *5*, 2850–2856.
- (76) Katir, N.; Benayad, A.; Rouchon, D.; Marcotte, N.; El Brahmi, N.; Majoral, J. P.; Bousmina, M.; El Kadib, A. Interfacial complexation driven three-dimensional assembly of cationic phosphorus dendrimers and graphene oxide sheets. *Nanoscale Adv.* **2019**, *1*, 314–321.
- (77) Aldana, A. A.; Toselli, R.; Strumia, M. C.; Martinelli, M. Chitosan films modified selectively on one side with dendritic molecules. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 22670–22677.
- (78) López-Rubio, A.; Lagaron, J. M.; Ankerfors, M.; Lindström, T.; Nordqvist, D.; Mattozzi, A.; Hedenqvist, M. S. Enhanced film forming and film properties of amylopectin using micro-fibrillated cellulose. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68*, 718–727.
- (79) Nordqvist, D.; Idermark, J.; Hedenqvist, M. S.; Gällstedt, M.; Ankerfors, M.; Lindström, T. Enhancement of the Wet Properties of Transparent Chitosan–Acetic-Acid–Salt Films Using Microfibrillated Cellulose. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2398–2403.
- (80) Fiss, B. G.; Hatherly, L.; Stein, R. S.; Friščić, T.; Moores, A. Mechanochemical Phosphorylation of Polymers and Synthesis of Flame-Retardant Cellulose Nanocrystals. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, *7*, 7951–7959.
- (81) Ouali, N.; Cavaillé, J.; Perez, J. Elastic, viscoelastic and plastic behavior of multiphase polymer blends. *Plast. Rubber Compos.* **1991**, *16*, 55–60.
- (82) Lizundia, E.; Puglia, D.; Nguyen, T.-D.; Armentano, I. Cellulose nanocrystal based multifunctional nanohybrids. *Prog. Mater. Sci.* **2020**, *112*, 100668.
- (83) Lizundia, E.; Goikuria, U.; Vilas, J. L.; Cristofaro, F.; Bruni, G.; Fortunati, E.; Armentano, I.; Visai, L.; Torre, L. Metal Nanoparticles Embedded in Cellulose Nanocrystal Based Films: Material Properties and Post-use Analysis. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2618–2628.
- (84) Pędziwiatr-Werbicka, E.; Miłowska, K.; Podlas, M.; Marcinkowska, M.; Ferenc, M.; Brahmi, Y.; Katir, N.; Majoral, J.-P.; Felczak, A.; Boruszewska, A.; Lisowska, K.; Bryszewska, M.; El Kadib, A. Oleochemical-Tethered SBA-15-Type Silicates with Tunable Nanoscopic Order, Carboxylic Surface, and Hydrophobic Framework: Cellular Toxicity, Hemolysis, and Antibacterial Activity. *Chem.—Eur. J.* **2014**, *20*, 9596–9606.
- (85) Ogiso, T.; Iwaki, M.; Ohtani, M. Hemolysis of Human Erythrocytes Induced by Glucose Solutions and Its Prevention. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 413–417.
- (86) Yildirim, A.; Ozgur, E.; Bayindir, M. Impact of mesoporous silica nanoparticle surface functionality on hemolytic activity, thrombogenicity and non-specific protein adsorption. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 1909–1920.
- (87) Jain, S. K.; McVie, R.; Jaramillo, J. J.; Palmer, M.; Smith, T. Effect of modest vitamin E supplementation on blood glycated hemoglobin and triglyceride levels and red cell indices in type I diabetic patients. *J. Am. Coll. Nutr.* **1996**, *15*, 458–461.
- (88) Giugliano, D.; Ceriello, A.; Paolisso, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care* **1996**, *19*, 257–267.
- (89) Nandhini, T. A.; Anuradha, C. V. Inhibition of lipid peroxidation, protein glycation and elevation of membrane ion pump activity by taurine in RBC exposed to high glucose. *Clin. Chim. Acta* **2003**, *336*, 129–135.
- (90) Kirkman, H. N.; Gaetani, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 44–50.
- (91) Maćczak, A.; Cyrkler, M.; Bukowska, B.; Michalowicz, J. Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (in vitro study). *Toxicol. In Vitro* **2017**, *41*, 143–149.
- (92) Li, F.; Yu, H.-Y.; Wang, Y.-Y.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Yao, J.-M.; Abdalkarim, S. Y. H.; Tam, K. C. Natural Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Nanocomposites with Multi-functional Cellulose Nanocrystals/Graphene Oxide Hybrids for High-Performance Food Packaging. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 10954–10967.
- (93) Ferrer, A.; Pal, L.; Hubbe, M. Nanocellulose in packaging: Advances in barrier layer technologies. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *95*, 574–582.
- (94) Nair, S. S.; Zhu, J.; Deng, Y.; Ragauskas, A. J. High performance green barriers based on nanocellulose. *Sustainable Chem. Processes* **2014**, *2*, 23.
- (95) Zhu, J.; Chen, Y.; Yu, H.-Y.; Guan, Y.; Zhou, Y.; Yang, X.; Zou, Z.-Y.; Tam, K. C. Comprehensive Insight into Degradation Mechanism of Green Biopolyester Nanocomposites Using Functionalized Cellulose Nanocrystals. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, *7*, 15537–15547.
- (96) Ferreira, F. V.; Dufresne, A.; Pinheiro, I. F.; Souza, D. H. S.; Gouveia, R. F.; Mei, L. H. I.; Lona, L. M. F. How do cellulose nanocrystals affect the overall properties of biodegradable polymer nanocomposites: A comprehensive review. *Eur. Polym. J.* **2018**, *108*, 274–285.



Article

Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films

Marta Kędzierska ^{1,*} , Sara Blilid ^{2,3}, Katarzyna Miłowska ¹ , Joanna Kołodziejczyk-Czepas ⁴ , Nadia Katir ² , Mohammed Lahcini ³, Abdelkrim El Kadib ² and Maria Bryszewska ¹

- ¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland; katarzyna.milowska@biol.uni.lodz.pl (K.M.); maria.bryszewska@biol.uni.lodz.pl (M.B.)
- ² Euromed Research Center, Engineering Division, Euro-Med University of Fes (UEMF), Fès 30070, Morocco; blilidsara@gmail.com (S.B.); n.katir@ueuromed.org (N.K.); a.elkadib@ueuromed.org (A.E.K.)
- ³ Laboratory of Organometallic and Macromolecular Chemistry-Composites Materials, Faculty of Sciences and Technologies, Cadi Ayyad University, Marrakech 40000, Morocco; m.lahcini@uca.ma
- ⁴ Department of General Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Lodz, Poland; joanna.kolodziejczyk@biol.uni.lodz.pl
- * Correspondence: marta.kedzierska@biol.uni.lodz.pl



Citation: Kędzierska, M.; Blilid, S.; Miłowska, K.; Kołodziejczyk-Czepas, J.; Katir, N.; Lahcini, M.; El Kadib, A.; Bryszewska, M. Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11386. <https://doi.org/10.3390/ijms222111386>

Academic Editor: Hitoshi Sashiwa

Received: 29 September 2021

Accepted: 18 October 2021

Published: 21 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Marine polysaccharides are believed to be promising wound-dressing nanomaterials because of their biocompatibility, antibacterial and hemostatic activity, and ability to easily shape into transparent films, hydrogels, and porous foams that can provide a moist micro-environment and adsorb exudates. Current efforts are firmly focused on the preparation of novel polysaccharide-derived nanomaterials functionalized with chemical objects to meet the mechanical and biological requirements of ideal wound healing systems. In this contribution, we investigated the characteristics of six different cellulose-filled chitosan transparent films as potential factors that could help to accelerate wound healing. Both microcrystalline and nano-sized cellulose, as well as native and phosphorylated cellulose, were used as fillers to simultaneously elucidate the roles of size and functionalization. The assessment of their influences on hemostatic properties indicated that the tested nanocomposites shorten clotting times by affecting both the extrinsic and intrinsic pathways of the blood coagulation system. We also showed that all biocomposites have antioxidant capacity. Moreover, the cytotoxicity and genotoxicity of the materials against two cell lines, human BJ fibroblasts and human KERT₁ keratinocytes, was investigated. The nature of the cellulose used as a filler was found to influence their cytotoxicity at a relatively low level. Potential mechanisms of cytotoxicity were also investigated; only one (phosphorylated microcellulose-filled chitosan films) of the compounds tested produced reactive oxygen species (ROS) to a small extent, and some films reduced the level of ROS, probably due to their antioxidant properties. The transmembrane mitochondrial potential was very slightly lowered. These biocompatible films showed no genotoxicity, and very importantly for wound healing, most of them significantly accelerated migration of both fibroblasts and keratinocytes.

Keywords: chitosan; cellulose; phosphorylated cellulose; bio-composites; wound-healing

1. Introduction

The skin, the largest organ of the human body, has many important functions. First, it creates a barrier against the penetration of pathogens as well as chemical and physical factors. It is also involved in regulating body temperature, perceives external stimuli, protects against water loss, affects the hormonal balance, and contributes to the immune system [1–3]. Due to the complexity and importance of these functions for the organism, the organ must function properly and, especially, must ensure its full continuity. Therefore, many mechanisms have evolved to ensure effective healing of wounds and skin defects.

Proper wound healing protects organisms against pathogens that can cause local and systemic infections, including sepsis [4,5].

One of the problems in modern medicine is the process of healing chronic wounds. Each year, millions of people worldwide experience both acute and chronic skin injuries, and ~37 million people suffer from chronic wounds [6]. Chronic wounds most often affect the elderly. The rate of their occurrence is constantly increasing due to the aging of society and the ages of patients [7,8]. “Non-healing” wounds most often concern patients suffering from peripheral arteriosclerosis, diabetic foot, and people immobilized with bedsores [9].

Wound healing is a very complicated process due to the involvement of many factors and the complexity of the associated mechanisms. The repair process depends on many types of cells and factors, including fibroblasts, growth factors, cytokines and elements of the extracellular matrix [10]. During healing, complex reactions of chemically and biologically active substances take place as well as physical phenomena expressed by an increase in tensile strength and changes in skin elasticity.

Healing mechanisms can be divided into three main phases: debridement (hemostasis), cell proliferation (migration), and restoration (protein generation and wound contraction with scar formation) [11]. Damage to the skin is associated with the rupture of blood vessels and bleeding, which are inseparable features of a wound. Hemostasis and inflammation then occur.

Hemostasis, its main goal being to create a lamellar plug that protects the wound against external factors and stops bleeding, begins immediately after injury. At the same time, monocytes, neutrophils, and mast cells diffuse into the plug-forming site. The hemostatic response, including the activation of blood platelets, triggers the plasma coagulation cascade and generation of the thrombin enzyme, which are important elements that stimulate tissue remodeling and wound healing [12]. The clot is a temporary structure that allows the migration of biomolecules and is the basis of wound healing factors [5]. One of main cellular factors involved in the healing mechanism is platelet-derived growth factor (PDGF) in the blood. The essence of its presence is the activation of fibroblasts and macrophages, triggering a further stage of the tissue repair process by creating the extracellular matrix (ECM) [13,14].

The next stage is cell proliferation and reconstruction of connective tissue containing collagen fibers. Macrophages determine the transition from the purification phase to the multiplication phase.

Proliferation leads to the formation of a base called granulation tissue, on which new epidermis is reconstructed. Within two weeks of injury, mast cells become active, stimulating the rapid multiplication of keratinocytes and fibroblasts. The substrate for this reconstruction of the epidermis consists of a network of collagen fibers, glycoprotein contained in the extracellular matrix (fibronectin), and hyaluronic acid. An integral process in the proliferation phase is angiogenesis [15,16]. In the final stage of wound healing, the extracellular matrix is restructured, and type I collagen is produced. The wound is completely closed with the participation of contractile myofibroblasts [2].

Current therapeutic strategies are insufficiently effective, making it necessary to focus on new therapeutic approaches and develop technologies for treating both persistent short- and long-term wounds. In this framework, the inherent properties of natural polysaccharides seem to be attractive; their use has already stimulated extensive research to find improved devices [17–22].

Chitosan extracted from crustaceans is one of the most interesting polysaccharides, owing to the abundance of its source, the presence of nitrogen in the skeletal structures, and its ease of shaping into hydrogels, porous beads, and transparent films [23,24]. Its potential drawback lies in its poor mechanical properties, which can be circumvented by adding a tiny amount of nanometric filler (e.g., graphene oxide, ceramic metal oxide, clay, calcium carbonate, metals, and hard carbon) [25–28]. We previously investigated the entrapment and growth of different objects inside chitosan films to access highly reactive bioplastics [29–32]. With the aim of avoiding any undesirable or side effects that might

emanate from the filler nature, we further explored the use of naturally abundant and biodegradable micro- and nanocellulose as fillers, allowing access to fully compatible cellulose-filled chitosan nanocomposites [33]. Interestingly, phosphorylated cellulose fillers also enhance the antibacterial activity of chitosan films, making these materials active without the entrapment of silver nanoparticles, zinc oxide clusters, or any other costly synthetic metals. Additionally, these films are transparent, which is very convenient when used as wound dressings to directly observe the wound and accurately monitor its healing. Herein, we investigated the use of phosphorylated and native cellulose-filled chitosan biocomposites as potential materials to accelerate wound healing. These biomaterials were tested for their hemostatic properties, cytotoxicity against two cell lines (fibroblasts and keratinocytes), antioxidant properties, and influence on cell migration.

2. Results and Discussion

For our study, we selected seven chitosan-based films (Figure 1). One of them, denoted as CS, was built by casting a colloidal solution of chitosan; it served as a benchmark. We also added 3 wt% microcrystalline cellulose (MCC) and nanosized cellulose (CNC) to the starting chitosan cellulose to create CS@MCC and CS@CNC, respectively. Herein, any comparison should reflect the pivotal role played by the size of the filler and could highlight interest in downsizing cellulose to the nanoscale. We also modified both MCC and CNC with POCl_3 to produce P-MCC and P-CNC and used cyclo- triphosphazene ring to access PN-MCC and PN-CNC [34]. These phosphorylated celluloses were also used as fillers to build novel cellulose-filled chitosan films. Any discrepancy in material performance could be attributed to filler functionalization. Detailed characterization of these materials has already been described in [33,34].

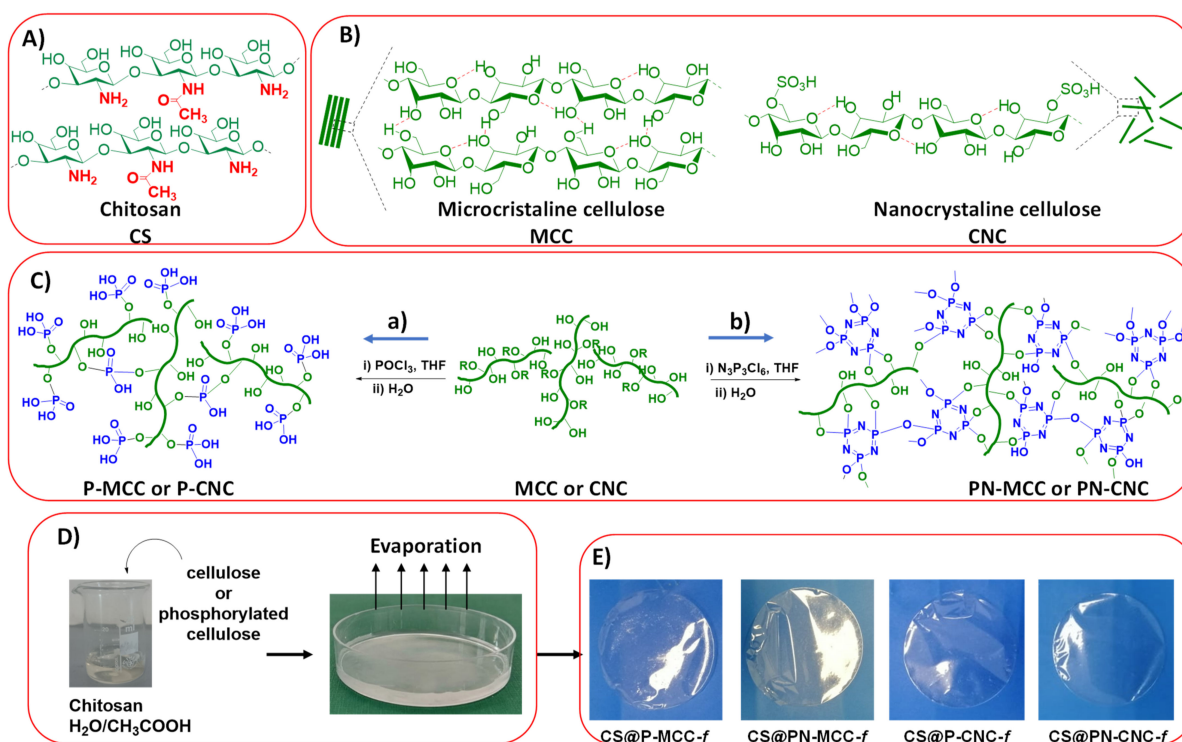


Figure 1. Multistep preparation of cellulose-filled chitosan films. (A) the chemical structure of chitosan used to generate flexible and transparent films; (B) the structure of the two cellulose fillers used to reinforce chitosan, namely microcrystalline cellulose (MCC) with tactoids and isolated tiny crystals of nanocellulose (CNC); (C) the use of two different phosphorylated reagents (POCl_3 or $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_6$) affords two kinds of phosphorylated cellulose (P-MCC/P-CNC and PN-MCC/PN-CNC); (D) mixing of chitosan and cellulose derivative followed by the introduction of the resulting solution in a petri dish and further evaporation of the solvent; (E) digital photos of the resulting cellulose-filled chitosan films, illustrating their transparency.

2.1. Hemostatic Properties

The first stage was done to evaluate the influence of cellulose biocomposites on the activation of the extrinsic and the intrinsic pathways of the blood plasma coagulation system. The effects of the biocomposites were determined based on well-known diagnostic biomarkers, i.e., blood clotting times. Prothrombin (PT), thrombin (TT), and the activated partial thromboplastin time (aPTT) were determined after 15 min of incubation with the tested films. Figure 2 shows that all of these coagulometric parameters were shortened compared with control blood plasma, which indicated that the composites accelerated blood coagulation.

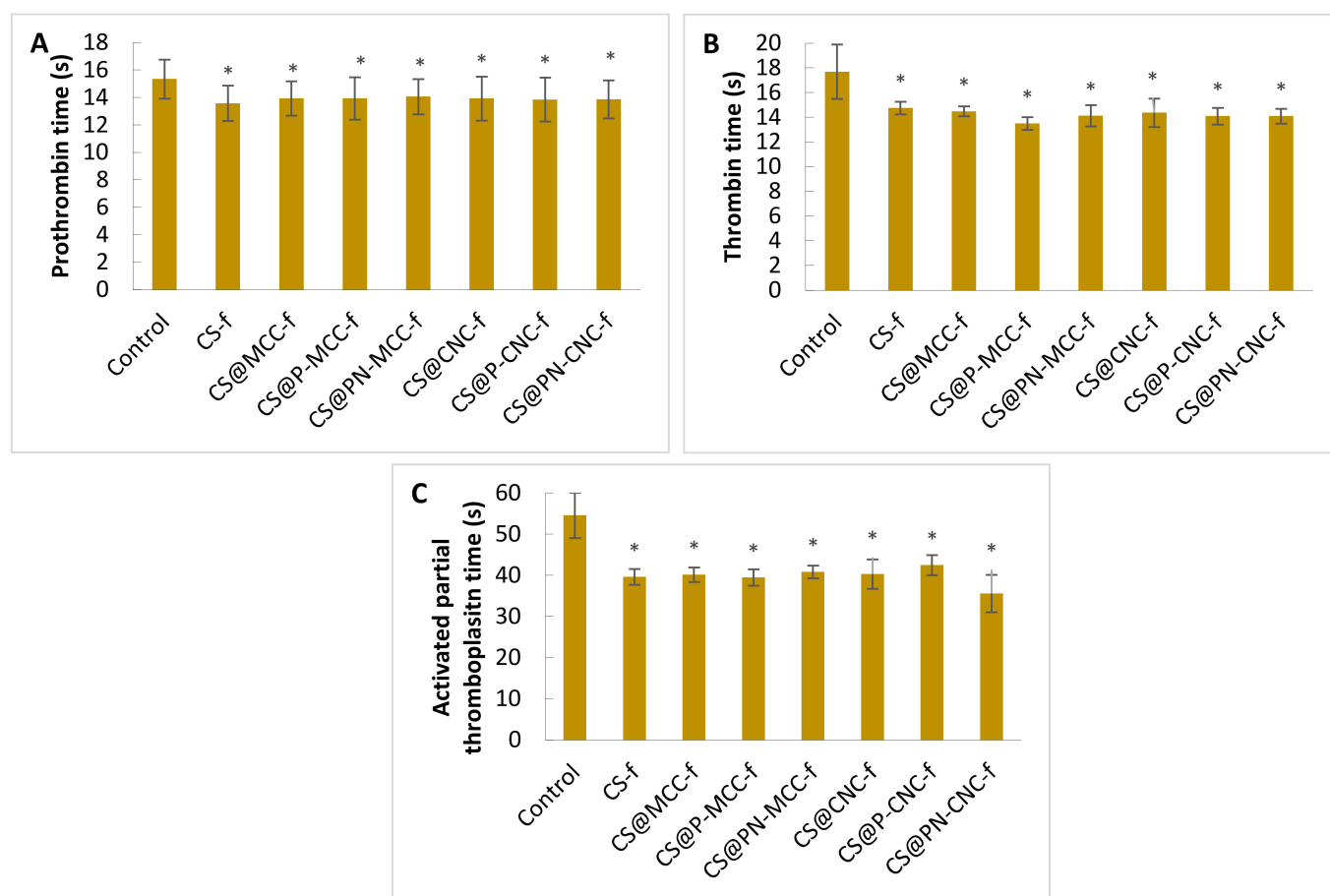


Figure 2. PT (A), TT (B), and aPTT (C) blood clotting times of control human blood plasma incubated with chitosan-cellulose biocomposites. $n = 10$, * $p < 0.05$.

Data on prothrombin times after incubation with cellulose films are provided in Figure 2A. The control plasma samples (i.e., blood plasma untreated with biocomposites) coagulated after 15.3 ± 1.4 s. All biocomposites reduced the time similarly to 14–13 s. Figure 2B shows thrombin times. For the control sample, the time was 17.7 ± 2.2 s. Incubation with biocomposites reduced this by ~4 s. The most efficient procoagulant activity in the TT measurements occurred in samples incubated with CS@P-MCC-f. Another time measured was the aPTT, which indicated the activity of the intrinsic coagulation pathway. The control took 54.6 ± 5.5 s, and the incubation of plasma with biocomposites significantly shortened the clot formation time (Figure 2C). The highest level of clotting activity occurred with the CS@PN-CNC-f composite, for which the aPTT time was 35.6 ± 4.5 s. Similar results were found by Li et al. [35] who tested the influence of collagen with oxidized microcrystalline cellulose on hemostatic properties. aPTT and TT of sponge collagens with 0.25% cellulose (M2) had the lowest levels among the materials tested, being significantly

reduced compared to the normal saline group. The results show that a cellulose supplement can shorten the aPTT time and activate blood plasma clotting factors (VIII, IX and XI and XII), which corresponds to M2 promoting factor XII activation. The data also imply that M2 has a direct impact on the intrinsic coagulation pathway but not on the extrinsic pathway. A reduction in TT indicated that the conversion of plasma fibrinogen into a fibrin clot in the samples of the M2 group was significantly increased compared with the control group. In summary, the addition of cellulose to the tested material could be directly involved in stimulating the intrinsic coagulation pathway, thereby accelerating blood plasma clotting.

Cheng et al. [36] studied the hemostatic mechanism for oxidized microcrystalline cellulose and its composites. They showed that ORC (Oxidized Regenerated Cellulose), OMCC (Oxidized Microcrystalline Cellulose), and the hemostatic composite affected the activation of coagulation factors VIII, IX, XI, XII but did not affect factors III and VII, suggesting that only the intrinsic blood coagulation pathway was activated. This activity can significantly accelerate the activation of blood coagulation factor XII and promote the generation of thrombin [37]. In the presence of thrombin, soluble fibrinogen polymerizes and turns into a fibrin clot. The formation of a fibrin network on the surface of the damaged blood vessel wall is crucial for filling the injury, stopping bleeding, and modulating the activity of the coagulation and fibrinolytic proteins as well as stimulating wound healing [38]. As in the case of the tested cellulosic biomaterials, this investigation focused on a sponge based on large, mesoporous silica nanoparticles (MSN) and *N*-alkylated chitosan (AC) [39]. aPTT was significantly shortened by MSN, MSN-GACS (mesoporous silica nanoparticles with a glycerol-modified *N*-alkylated chitosan sponge), and kaolin, whereas AC had no influence on aPTT. In addition, the PT of all of these agents was unchanged, indicating that MSN-GACS does not significantly affect the extrinsic coagulation pathway. SiO₂ and kaolin can induce activation of the intrinsic coagulation pathway by activating plasma coagulation factor XII. Therefore, the results suggest that the MSNs in MSN-GACS, rather than AC, freely contact the blood components and activate the intrinsic pathway. The coagulation potential of AC could depend on its positive charge, which can be adsorbed on the cytomembranes of blood cells and by some proteins [40].

2.2. Measurement of the Total Antioxidant Capacity

The antioxidant capacity of chitosan-cellulose biocomposites was analyzed on the basis of ABTS's radical scavenging capacity, as shown in Figure 3 [41,42].

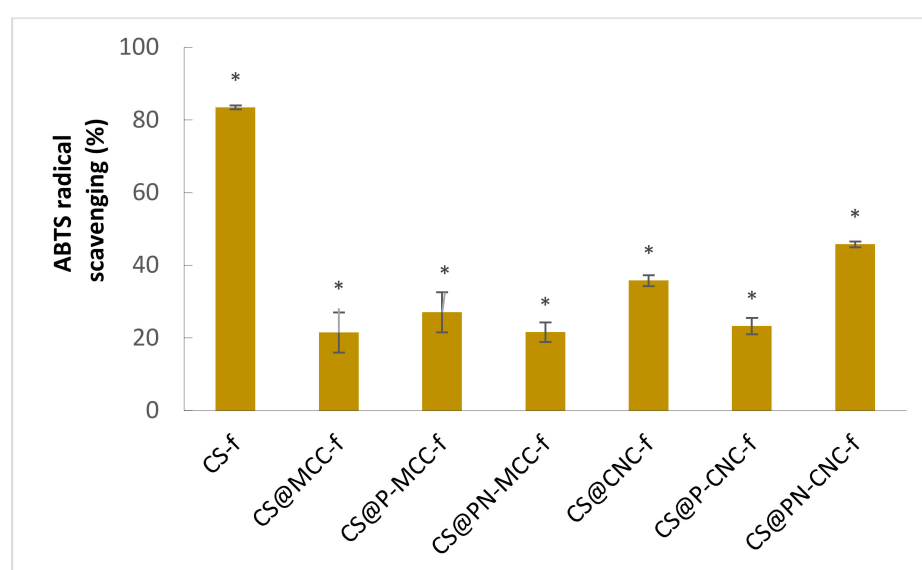


Figure 3. Antioxidant properties of chitosan-cellulose biomaterials after 15 min of incubation, expressed as a percentage of inhibition, $n = 6$, * $p < 0.05$.

All nanocomposites tested were found to have antioxidant properties after 15 min of incubation. The nanocomposite with the highest ABTS radical scavenging capacity was the best antioxidant. In the case of the films, free radicals were most effectively removed by the chitosan film, where the scavenging capacity was 83.5%. Nanocomposites containing cellulose in their structure also show antioxidant activity; however, the radical scavenging values were lower compared with CS-f. Nanocomposites reinforced with phosphorylated micro- and nanocellulose (CS@P-MCC-f and CS@PN-MCC-f) were found to have similar antioxidant properties to the nanocomposite without modification, CS@MCC-f. The results are consistent with those presented in other reports, suggesting that cellulose has antioxidant properties [43]. Materials containing nanocellulose have greater antioxidant capacity than those containing microcrystalline cellulose. The highest value for CS@PN-CNC-f was 46%. These results suggest that adding cellulose to chitosan may partially reduce its antioxidant properties. Others have tested the antioxidant properties of different cellulose-containing composites. Zhang et al. [44] showed that cellulose nanocrystals (CNC) and cellulose nanofiber (CNF) are excellent controlled release agents and stabilizers that significantly increase the antioxidant and antibacterial properties of edible food-packaging films. Others have also shown antioxidant properties of composites containing cellulose; however, they were often increased by adding other substances, e.g., Rosemary and Aloe Vera essential oils, which contain polyphenols [45] or melanin nanoparticles [46].

2.3. Cell Viability

The cytotoxicity of cellulose-filled-chitosan biocomposites was assessed by cell viability studies using BJ and KERTr cell lines after 24 h of incubation with biocomposites. Cell viability was assessed with the MTT assay. The percentages of viable cells are given relative to control cells incubated without biomaterials (the control being taken as 100%) in Figure 4. All of our tested composites, except for CS-f, showed statistically significantly decreased viability for both cell lines. However, the viability of the cells was not <70%. The decrease in viability depended on the composition of composites and the type of cells. Keratinocytes were more sensitive than fibroblasts (Figure 4). The biggest decrease in KERTr viability was found with the three microcrystalline cellulose composites. For CS@MCC-f, CS@P-MCC-f and CS@PN-MCC-f, the viabilities ranged from 70 to 72%. The least toxic were the CS@CNC-f and CS-f composites, which reduced viability by ~15%. For fibroblasts, the most toxic film (CS@P-CNC-f) decreased viability to ~76%. In contrast, the viability of BJ treated with CS-f remained at the control level (Figure 4A).

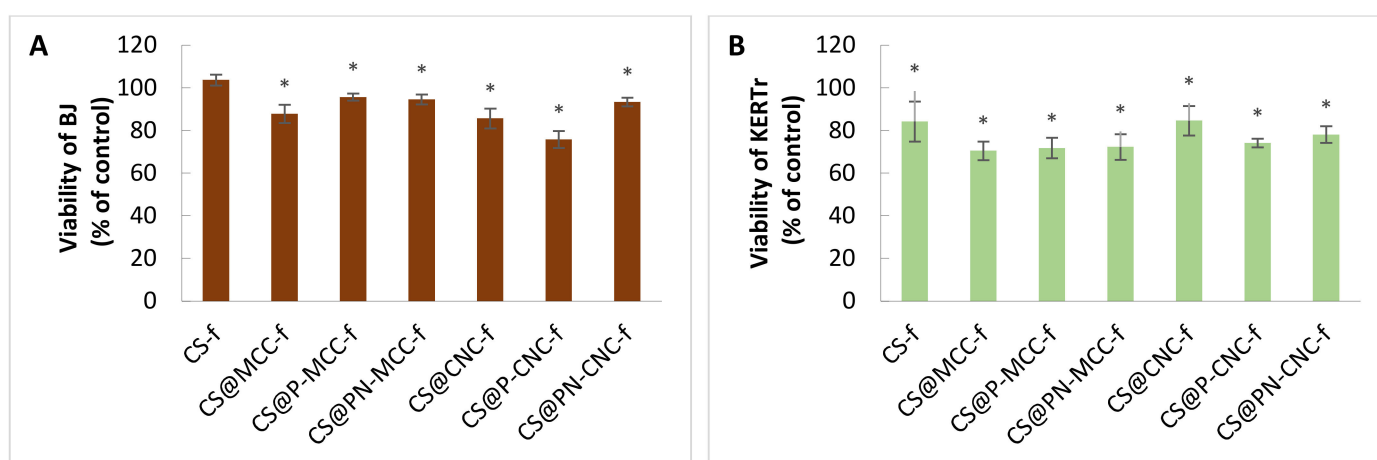


Figure 4. Viability of BJ (A) and KERTr (B) treated with chitosan-cellulose biocomposites for a 24 h incubation period, $n = 6$.

* $p < 0.05$.

There is information on the cytotoxicity of biomaterials containing nanocellulose. Bio-nanocomposites that do not decrease viability below 80% can be considered noncytotoxic.

Poonguzhali et al. [47] assessed the effect of chitosan-PVP-nanocellulose composites on fibroblasts (NIH-3T3). All of the composites decreased in viability to 40–70% after 24 h of incubation and to 60–80% after 3 and 5 days. An increase in viability proved the good compatibility of the composites, because after 3 and 5 days, the cells began to proliferate. Naseri et al. [48] used porous nanocomposite electrospun mats based on chitosan-cellulose nanocrystals for wound healing. The in vitro cytocompatibility of cellulose nanocrystals and electrospun mats (MCNC_{HCl} and XMCNC_{HCl}) was measured in a direct contact system using adipose-derived stem cells (ASC) and the L929 cell line. The biomaterials were stained with MTT. Cells in contact with all of their materials had similar morphologies to the negative (non-cytotoxic) control. There was no zone of cell growth inhibition; therefore, the biomaterials were considered noncytotoxic. Some previous studies also showed no cytotoxicity for nanocellulose and nanochitin [49–51].

In our study, the slight decrease in metabolic activity compared with the control was probably unrelated to cell death; the decrease could have been related to decreased cell proliferation. One possible explanation for the decreased proliferation may have been increased mechanical stress caused by polysaccharides, which could have affected the proliferative capacity of other cell types in 3D matrices [52]. A bigger reduction in metabolic activity by keratinocytes may indicate that these types of cells are more sensitive than fibroblasts, consistent with the findings of Burd et al. [53]. Similar results were shown by Čolić et al. [54]. CNF (cellulose nanofibrils) material was noncytotoxic to keratinocytes. The cells retained the same morphology as the control cells, indicating the suitability of CNF as a wound dressing material. They also showed reduced metabolic activity and cell proliferation but low cytotoxicity from CNF. Cellulose materials have previously been shown to reduce cell proliferation without affecting the viability of keratinocytes [55]. CNF (50 µg/mL) did not affect fibroblasts or keratinocytes over a 24 h incubation period, showing that the potential leakage of CNFs in a wound could be acceptable [56].

2.4. Generation of Reactive Oxygen Species

To check whether reactive oxygen species (ROS) reduce the viability or proliferative capacities of BJ and KERTr cells, their level was determined after 24 h of incubation with our tested materials, the results being related to the control (100%). Only one of the tested films (SC@P-MCC-f) significantly increased the level of ROS in BJ cells. The other tested films did not significantly affect ROS in cells or might have reduce their concentration in some cases (Figure 5). Regarding fibroblasts (Figure 5A), the most significant decrease in ROS occurred in samples incubated with CS@P-CNC-f and CS@CNC-f.

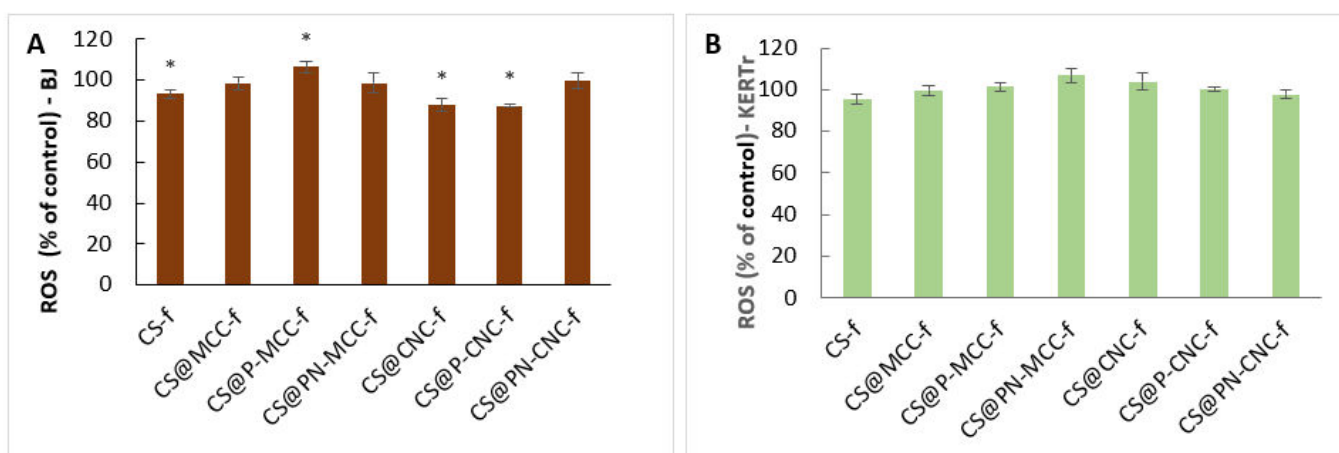


Figure 5. The content of reactive oxygen species in cells of BJ (A) and KERTr (B) incubated for 24 h with chitosan-cellulose biocomposites, $n = 6$. * $p < 0.05$.

Similar results were obtained for modified cellulose nanofibrillation by Aimonen et al. [57], who investigated whether wood-derived nanofibrillated cellulose (NFC) induces intracellular ROS production. Only U-NFC (unmodified) induced a significant increase in ROS formation compared to the negative control at 500 $\mu\text{g/mL}$ after 24 h of exposure, whereas C-NFC (carboxymethylated), H-NFC (hydroxypropyltrimethylammonium), P-NFC (phosphorylated), and S-NFC (sulphoethylated) did not significantly increase the level of ROS for any doses or exposure times.

2.5. Assessment of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

Alterations to the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) after incubation with chitosan-cellulose biocomposites were monitored using a JC-1 fluorescent probe technique. Experiments on our two cell lines, BJ and KERTr, showed that unmodified chitosan film (CS-f) slightly, but significantly, increased $\Delta\Psi_m$, which suggests that the film does not affect proapoptotic activity (Figure 6). On the other hand, chitosan-cellulose films did not change $\Delta\Psi_m$, or some of them just gave slightly lower potentials. For fibroblasts incubated with CS@P-MCC-f, the lowest value was 90% of the control value, and for keratinocytes, the biggest decrease was with the CS@CNC-f composite, $\Delta\Psi_m$ (88%).

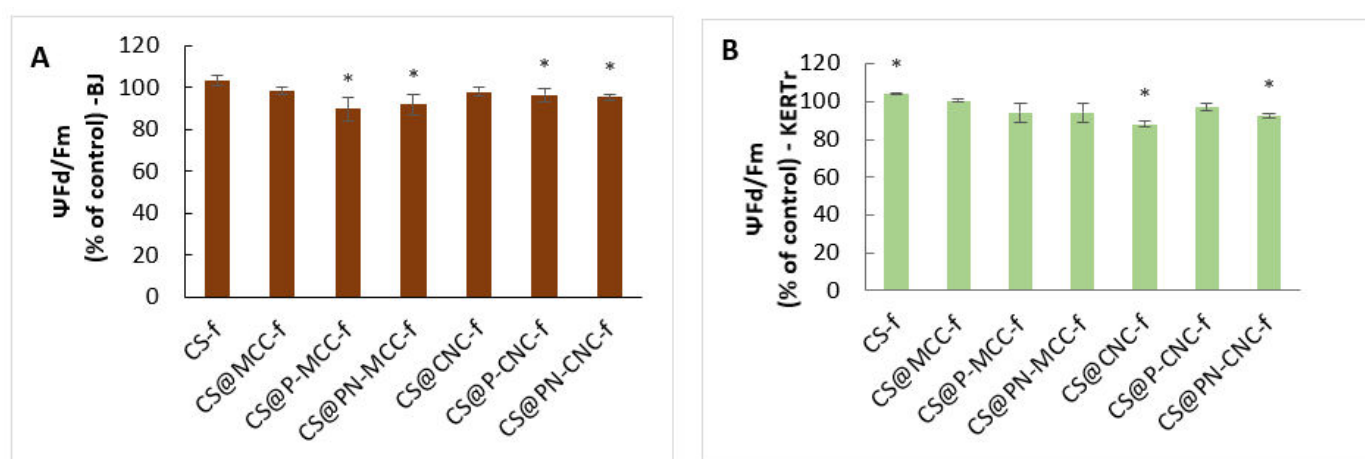


Figure 6. The transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) of BJ (A) and KERTr (B) incubated for 24 h with chitosan-cellulose biocomposites, $n = 6$. * $p < 0.05$.

As suggested by others, biomaterials containing modified forms of cellulose may lower the $\Delta\Psi_m$ by generating mitochondrial ROS [58–60]. Sunasee et al. [61] showed that the cationic nanocrystalline cellulose (CNCs) derivative induces NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion associated with mitochondrial ROS production. CNC-AEMA2 (aminoethylmethacrylamide) was associated with the biggest loss in $\Delta\Psi_m$, indicating a decrease in the red/green ratio compared with untreated cells. Depolarization of the mitochondrial membrane can directly impact ATP production by mitochondria. Therefore, intracellular and extracellular levels of ATP were also measured. Both CNC-AEMA1 and CNC-AEMA2 decreased intracellular ATP in J774A1 (mouse macrophage) cells; however, CNC-AEMA2 gave a more pronounced negative effect than CNC-AEMA1, as reflected by a significant increase in the extracellular ATP content.

We found a relationship between the $\Delta\Psi_m$ and ROS results for CS@P-MCC-f. This film gave the highest increase in ROS inside BJ cells and led to the largest decrease in $\Delta\Psi_m$, which explains the mechanism of cell membrane depolarization, as the production of intracellular reactive oxygen species interferes with cellular ATP levels, thereby reducing the mitochondrial potential [62,63].

2.6. Migration of Fibroblasts and Keratinocytes

Another important aspect is the influence of chitosan-cellulose composites on the migration process of BJ and KERTr cells. The ability of keratinocytes and fibroblasts to migrate to the wound environment from adjacent areas also determines the success of the healing process. The level of cell migration was determined by the migration assay using ThinCert™ (Figure 7). Among the biomaterials analyzed, CS@CNC-f and CS@MCC-f most strongly increased fibroblast migration after 24 h of incubation. These composites increased cell migration by one and a half times compared with untreated cells. Composite CS@PN-CNC-f had the smallest influence on the migration of fibroblasts. In the case of keratinocytes, migration was lower than with fibroblasts. The highest level of keratinocytes migrated in samples treated with CS@MCC-f was similar to fibroblasts, but the value was lower, ~126%. Interestingly, one of the CS@PN-CNC-f films delayed the migration of keratinocytes compared with the control. It can be concluded that both the microcrystalline and nanocrystalline forms of cellulose have positive effects on migration; however, modification with P- (phosphorylated) and PN- (cyclotriphosphazene) groups reduce the migration effect. Wang et. al. [64] investigated whether bacterial cellulose (BC)/gelatin membranes with electric field stimulation affect cell migration, thereby accelerating wound healing. In particular, a 40% stretched BC/gelatin membrane promoted the adhesion, orientation, and migration of NIH3T3 cells. The aligned BC/gelatin membrane synergistically directed the migration of NIH3T3 cells and significantly improved wound healing by accelerating wound closure, increasing the granulation thickness, collagen deposition, and angiogenesis. These findings suggest that a combination of 40% stretched BC/gelatin with electric field stimulation may be a promising therapeutic strategy to guide cell migration for improving wound healing.

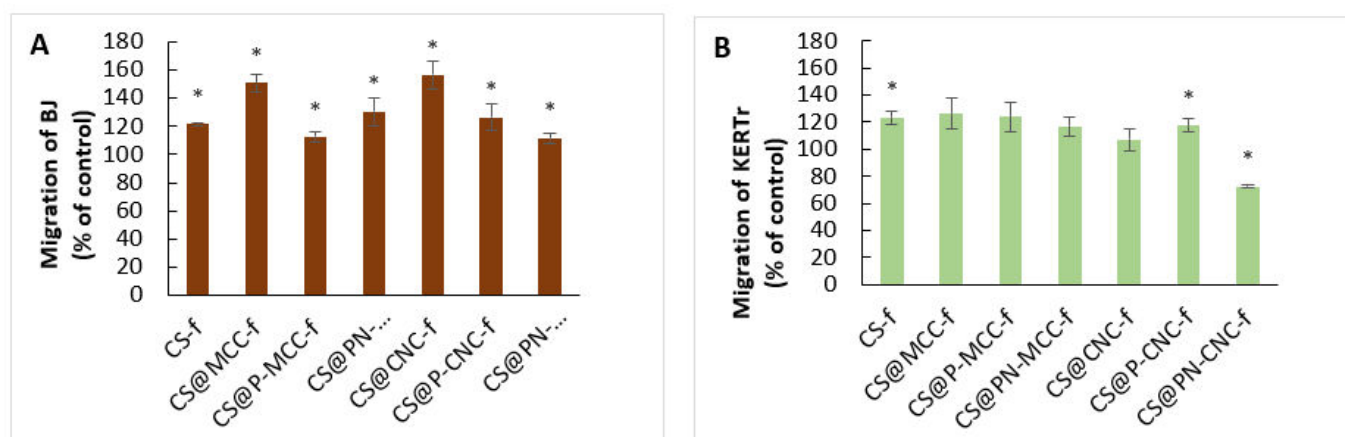


Figure 7. The migration of BJ (A) and KERTr (B) cells incubated for 24 h with chitosan-cellulose biocomposites, $n = 6$, * $p < 0.05$.

Research by Bacakova et al. [65] aimed to improve a clinically used carboxymethylcellulose (Hcel® NaT) wound dressing by coating it with fibrin and pre-seeding it with skin fibroblasts to create a cell carrier with the potential to deliver skin cells to a wound. This novel cell-enriched dressing is expected to improve the healing capacity of deep wounds. After degradation of the fibrin coating by cells, their cellulose scaffolds would become less attractive than the wound bed for cell adhesion, and thus, spontaneous release and migration of cells from these scaffolds could be expected. The scaffolding could then be easily removed, and thus scaffolds based on fibrin-modified cellulose can serve as cell carriers for skin wounds. A similar phenomenon was seen with human keratinocytes grown on poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) plates used clinically to treat severe burns [66].

2.7. Genotoxicity

For testing materials that may have potential use in medicine, it is important to check their activities from different aspects, notably their genotoxicity. For this purpose, the comet test was used, which gives an answer to whether composites induce single- or double-stranded DNA breaks. Genotoxicity of materials may result from direct interactions with DNA or from an indirect response induced by several factors, including surface stress, through the direct influence of particles on DNA, the release of toxic ions from soluble nanoparticles, or the generation of oxidative stress [67–69]. The percentage of DNA in the tail is used to describe damage in the test specimens. The results shown in Figure 8A,B concern the DNA content in the tails of fibroblasts and keratinocytes, respectively, after 24 h of incubation with chitosan-cellulose biocomposites. Negative controls were untreated cells, and positive controls were cells treated with H₂O₂. All films significantly increased the tail moment. The greatest tail moment was found for cells treated with CS@P-MCC-f. CS@P-MCC-f also slightly increased the level of ROS, which might have caused oxidative stress and led to DNA damage. However, these changes did not exceed 10%, so it can be concluded that the tested films are non-genotoxic. Genotoxicity measurements of cellulose-containing biocomposites were carried out by Coelho et al. [70], who checked the toxicity of bacterial cellulose membranes functionalized with hydroxyapatite and the antibone morphogenetic protein 2 (BC-HA) on a murine osteoblast line, MC3T3. The percentage of DNA in the tail determined using the Comet Assay revealed that BC-HA is non-genotoxic compared with its negative control (NC); the percentage of DNA in the tail was found to be approximately 3%. They also tested the toxicity of therapeutic contact lenses based on bacterial cellulose with coatings to provide transparency. The assessment showed genotoxicity in only one case, but this was due to diclofenac sodium. None of the lenses tested had a mutagenic effect [71]. Moreira et al. [72] also confirmed that cellulose is nongenotoxic; they concluded from the comet test that cellulose nanofibers (NFs) do not induce DNA strand breaks or crosslinks.

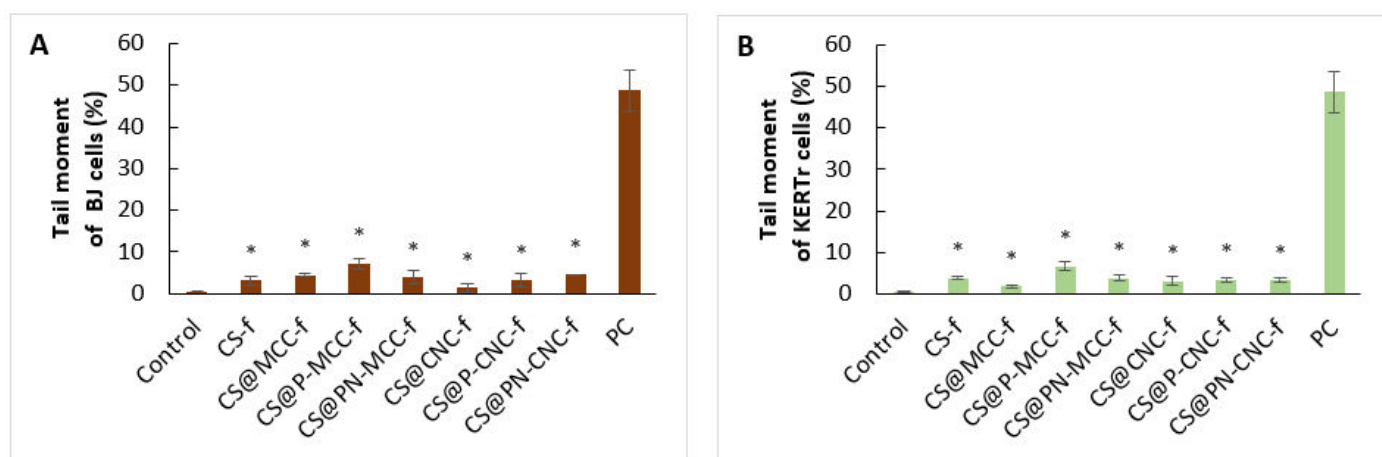


Figure 8. The genotoxicity of BJ (A), KERTr (B) cells incubated for 24 h with chitosan-cellulose biocomposites, $n = 6$, * $p < 0.05$.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Cellulose-filled chitosan nanostructured films were prepared in accordance with previously described procedures [33]. The commercially available reagents and solvents phosphoryl chloride, hexachlorotricyclophosphazene, ethanol (99.8%), tetrahydrofuran (97%), and acetic acid (98%) were purchased from Across and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chitosan (190–310 kDa) and 85% deacetylation degree were purchased from Sigma-Aldrich (Hamburg, Germany). Phosphate-buffered saline (PBS) was purchased from BioShop (Burlington, ON, Canada). Glutaraldehyde 25% and osmium tetroxide

4% solution were purchased from Agar Scientific (Stansted, UK). Absolute ethanol was purchased from EMSURE (Darmstadt, Germany). Microcrystalline cellulose (MCC, CAS 9004-34-6) synthesized from cotton linters was purchased from Sigma-Aldrich. Cotton wool used for the synthesis of nanocellulose was purchased from Fisher Scientific (Hampton, NH, USA). Ultrasonication involved a VWR ultrasonic cleaner (USC-THD: Power 9 VWR International GmbH, Vienna, Austria).

The human fibroblast BJ (CRL-2522) cell line and human keratinocyte CCD 1102 KERTr (CRL-2310) were purchased from American Type Culture Collection ATCC® (Manassas, VA, USA). Keratinocyte serum-free medium with added keratinocyte supplements, including bovine pituitary extract (BPE), human recombinant epidermal growth factor (EGF), fetal bovine serum (FBS), and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), was purchased from Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Blood from healthy donors was obtained from the Regional Blood Donation and Blood Treatment Center in Lodz, Poland. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 3-(4,5-diphenyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), potassium persulfate (di-potassium peroxodisulfate), phosphate buffered saline (PBS) tablets, fetal bovine serum, and trypsin were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Commercially available reagents for the determination of clotting times (Dia-PT and DiaPTT) were purchased from Diagon (Budapest, Hungary). The thrombin enzyme was provided by Biomed (Lublin, Poland).

Fresh human blood plasma for hemostatic assays derived from buffy coats (from healthy volunteers) was purchased from the Regional Centre of Blood Donation and Blood Treatment in Lodz (Poland).

The genotoxicity study used a fluorescent dye that strongly binds to DNA by DAPI intercalation (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Membrane culture inserts for 24-well plates, PET, and 8 µm pores to check cell migration were purchased from Biokom (Janki, Poland).

All other chemicals used were of analytical grade, and solutions were prepared using water purified by the Mili-Q system.

3.2. Measurements of Prothrombin Time (PT)

Activation of the extrinsic and intrinsic pathways of blood coagulation [73] was determined using the Optic Coagulation Analyzer K-3002 (KSELMED, Grudziadz, Poland) [74,75]. In measurements of the PT, human plasma (1.5 mL) was incubated with cellulose films in the form of squares (0.5 × 0.5 cm) for 15 min at 37 °C and then sampled in a 50 µL coagulometric cuvette with 50 µL thromboplastin (i.e., Dia-PT reagent; DIAGON, Budapest, Hungary; a commercial preparation was dissolved in 2 mL deionized water) and incubated for 1 min at 37 °C on a block heater. After incubation, the cuvette was transferred to the analyzer, and 50 µL of 25 mM CaCl₂ was immediately added.

3.3. Measurements of the Thrombin Time (TT)

Human plasma (1.5 mL) was incubated with cellulose biomaterials in the form of squares (0.5 × 0.5 cm) for 15 min, sampled into a 50 µL measuring cuvette, and incubated for 1 min at 37 °C on a block heater. The cuvette was transferred to the measuring holes and 100 µL thrombin (Biomed, Lublin, Poland) was added (final concentration 1 U/mL). The thrombin time (TT) was determined coagulometrically (Optic Coagulation Analyser K-3002; KSELMED, Grudziadz, Poland).

3.4. Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT)

Activation of the intrinsic blood coagulation pathway was determined using the Dia-PTT reagent (i.e., cephalin preparation for activated partial thromboplastin time measurements dissolved in 4 mL deionized water and incubated at 37 °C for 30 min). A cuvette was placed in the coagulometer thermostat (Optic Coagulation Analyzer K-3002;

KSELMED, Grudziadz, Poland) and 50 µL of plasma previously incubated for 15 min with cellulose biocomposites was introduced to it. The dia-PTT reagent was added to the plasma in the cuvette. The mix was incubated at 37 °C for 3 min. Then, 50 µL of 0.025 M CaCl₂ was added to the cuvette prior to measurement. Following the addition of CaCl₂, further clotting factors were activated, leading to the formation of a blood plasma fibrin clot.

3.5. Measurement of the Total Antioxidant Capacity

A colored blue-green solution of the radical ABTS (ABTS^{•+}) is formed by the reaction between ABTS and K₂O₈S₂. ABTS and potassium persulfate were dissolved in distilled water to final concentrations of 7 and 2.45 mM, respectively. These two solutions were mixed and left to stand in a dark at room temperature for 16 h before use in order to produce the ABTS radical (ABTS^{•+}). The absorption spectrum of ABTS^{•+} is characterized by the presence of several maxima for the wavelengths 415, 645, 734, and 815 nm. Adding an antioxidant to the solution reduces the concentration of the ABTS radical, discoloring the solution [76]. The ABTS radical solution was diluted with distilled water to an absorbance of 0.7–0.9 at 734 nm. Biocomposites were added to the diluted ABTS^{•+} solution (1.5 mL) and incubated for 15 min, and the absorbance was read using a spectrophotometer. The percentage of reaction inhibition was calculated from the formula (1):

$$\text{ABTS radical scavenging (\%)} = (1 - A/A_0) \times 100\% \quad (1)$$

where:

A₀—represents the absorbance of the control (only ABTS) at 734 nm

A—represents the absorbance of the sample (ABTS + film) at 734 nm

3.6. Cell Culture

Cells were cultured using regular practices. Adherent BJ cells were grown in DMEM growth medium, whereas the KERTr cells were grown in Keratinocyte-Serum Free medium (Gibco). DMEM was supplemented by increased concentrations of vitamins and amino acids, as well as pyruvate and glucose. DMEM was supplemented with 10% inactivated FBS and an antibiotic (1% penicillin). Keratinocyte-Serum Free (Gibco) medium was supplemented with Keratinocyte Supplements, including Bovine Pituitary Extract (BPE, Gibco) and human recombinant epidermal growth factor (EGF, Gibco). Both cultures were carried out under standard conditions in a CO₂ incubator (37 °C, 95% air and 5% CO₂, 100% relative humidity). Cells of both lines were maintained in the logarithmic growth phase by regular passage into new culture flasks after the cells had reached ~80% confluence. Monolayers were washed sequentially with an isotonic saline solution (0.9%), and the cell monolayers were trypsinized by adding 0.25% trypsin with EDTA and KERTr by adding a 0.25% TrypLE solution (Gibco) in the appropriate volumes. Cells were incubated for 3–5 min in a CO₂ incubator and checked under a microscope. After detachment, DMEM culture medium was added to BJ and Keratinocyte-Serum Free was added to KERTr, respectively. Cell viability was checked at each passage using Trypan blue, which enters cells with damaged cell membranes, making them blue. A small amount of the cell suspension (~10 µL) was mixed 1:1 with Trypan blue and applied to the plates. During measurement, the total cell density and the amount of dead and living cells per 1 mL of suspension were determined.

3.7. Cell Viability Assay (MTT Assay)

The cytotoxicity of chitosan-cellulose films was measured by the MTT assay, which is based on cellular reduction of the soluble yellow dye 3-[4,5-tetrazolium salt) dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) by mitochondrial dehydrogenases to water-insoluble purple formazan in living cells. Therefore, the amount of formazan crystals is proportional to the number of living cells, because the dehydrogenases are inactive in dead cells [77,78].

The BJ cells were seeded in flat-bottomed 24-well plates at concentrations of 5×10^4 (BJ) and 10^5 (KERTr) cells in 400 μ L medium per well. After 24 h, they were treated with films in the form of 0.5×0.5 cm squares, with the controls being untreated. The plates with biocomposites were incubated for 24 h under culture conditions before the MTT test was used. The medium was removed from the wells, and the cells were washed twice with PBS (200 μ L). MTT reagent (200 μ L) was added to the wells and incubated for 3 h at 37 °C. MTT was aspirated, and 400 μ L DMSO was added to each well. The absorbance at 570 nm was measured spectrophotometrically (BioTek, Synergy HTX multi-mode reader, Winooski, VT, USA). MTT tests were repeated in 6 separate experiments. The percentage of viability was calculated using the formula (2):

$$\% \text{ Viability} = A_s / A_c \times 100\% \quad (2)$$

where: A_s is the absorbance of the sample and A_c is the absorbance of the samples control (untreated cells).

3.8. Generation of Reactive Oxygen Species

H_2DCFDA is a form of reduced fluorescein that freely penetrates cells, where it is hydrolyzed to its non-fluorescent form, H_2DCF , by intracellular esterases. Subsequently, H_2DCF is oxidized by ROS to 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). DCF is localized in the cytoplasm and is strongly fluorescence, its intensity being proportional to the concentration of ROS [79–81].

BJ cells were seeded in black 96-well plates at 1.25×10^4 per well and KERTr cells at 2.5×10^4 per well. After 24 h of incubation with the biocomposites, the medium was removed, and the cells were washed with PBS before 50 μ L 2 μ M H_2DCFDA was added. The probe plate incubation time was 15 min. The solution was recovered, and 50 μ L of PBS was added per well. Samples were analyzed using a Fluoroscanner Ascent FL microplate reader (BioTek, Synergy HTX multi-mode reader) with an excitation wavelength of $\lambda_{ex} = 495$ and emission wavelength of $\lambda_{em} = 529$.

3.9. Assessment of the Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

One of the parameters that proves mitochondrial dysfunction is a decrease in $\Delta\Psi_m$. The JC-1 probe (5,5-iodide,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolycarbocyanine) was used to determine $\Delta\Psi_m$. The probe is a positively charged lipophilic fluorescent marker. Normal cells with appropriate potentials ensure more efficient functioning of metabolic pathways, providing the cell with more ATP, so $\Delta\Psi_m$ values range from -120 to -180 mV. In damaged cells, energy production in the form of ATP is decreased, and membrane depolarization—a decrease in the potential—occurs. The primary location for the probe is the mitochondrial matrix. JC-1 comes in monomer and dimer forms. The dimeric form occurs when the mitochondrial membrane is polarized, with a high $\Delta\Psi_m$. Red fluorescence is then emitted. In the case of the monomeric form, the value of $\Delta\Psi_m$ is lower, and the characteristic fluorescence is green [82].

BJ cells were plated in black 96-well plates at 12.5×10^3 /well and KERTr cells were plated at 25×10^3 . After incubation for 24 h with biocomposites, the medium was removed. After washing with PBS, 50 μ L of JC-1 (1 μ M) was added. The plate was incubated for 30 min in the dark, and the solution was removed from the wells. PBS (50 μ L) was added to each well and measured. In the analysis, specialized filters were used to measure the fluorescence of monomers ($\lambda_{ex} = 485$ nm, $\lambda_{em} = 538$ nm) and dimers ($\lambda_{ex} = 530$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm). From the measurement on a Fluoroscanner Ascent FL microplate reader (BioTek, Synergy HTX multi-mode reader), the fluorescence coefficient was calculated (3):

$$\Psi_m = F_d / F_m \quad (3)$$

where Ψ_m is the transmembrane mitochondrial potential directly proportional to the fluorescence coefficient, F_d is the fluorescence of dimers, and F_m is the fluorescence of monomers.

3.10. Cell Migration

BJ and KERTr cells were starved overnight in serum-free medium with 0.2% bovine serum albumin (BSA) [83,84]. Harvested BJ cells were washed twice in PBS and resuspended in serum-free DMEM medium with 0.2% BSA to obtain an appropriate final concentration of 2.5×10^5 cells/mL, whereas KERTr cells were resuspended in growth-factor-free medium to the same cell density. Twenty-four-well ThinCert™ cell culture inserts with 8 μ m pores and translucent PET membranes were placed in the wells of a CELLSTAR® cell culture plate. Six hundred microliters of DMEM medium with 10% FBS was added to each well of the BJ cell culture plate (lower compartment). For keratinocytes, Keratinocyte-Serum Free medium with growth factors was added to the lower wells. Two hundred microliters of BJ cell suspension with 450 μ L of free-serum medium DMEM was added to each cell culture insert, and the same volumes of KERTr and free-growth factor medium Keratinocyte-Serum Free were used. The plate with inserts was incubated for 24 h in an incubator at 37 °C and 5% CO₂ in air. The culture medium was removed from the ThinCert™ cell culture inserts, and the inserts were transferred to the wells of a freshly prepared 24-well plate containing 500 μ L of Trypsin-EDTA per well. This plate was incubated for 10 min in a cell culture incubator at 37 °C and 5% CO₂ with sporadic agitation. The inserts were discarded, and 200 μ L of Trypsin-EDTA solution (now containing the detached migratory cells) was transferred from each well into a new well of a flat-bottom 24-well plate. Finally, the viability of the migrating cells was determined using the MTT test and measured spectrophotometrically at 570 nm.

3.11. Comet Assay

The alkaline version of the comet assay was carried out according to the procedure of Singh et al. [85] with slight modifications described by Blasiak and Kowalik [86]. Briefly, 100 μ L (50,000 cells) of cell suspension was mixed with 10 μ L of 0.75% low melting-point agarose (LMP) at 37 °C and spread on a normal agarose (NMP) pre-coated microscope slide. The slides with cells were covered with a coverslip and subsequently placed on an ice-cold surface to solidify for about 10 min. The coverslips were removed, and the slides were placed in cold lysing solution (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10; the last two components were added freshly). Lysis took 1 h at 4 °C in the dark. The slides were incubated in an electrophoretic buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min to allow the unwinding of DNA before electrophoresis. Electrophoresis was run in the same buffer at 0.73 V/cm (28 mA) for 20 min to allow damaged DNA or fragments to migrate towards the anode. The slides were washed in water, drained, stained with 2 μ g/mL DAPI, and covered with coverslips. Microscopic analysis was started after a minimum of 30 min. To prevent additional DNA damage, the whole procedure was conducted under limited light or in the dark. The comets were analyzed by an Eclipse fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) attached to a COHU 4910 video camera (Cohu, Inc., San Diego, CA, USA) equipped with a UV-1 A filter block and connected to a personal computer-based image analysis system Lucia-Comet v. 4.51 (Laboratory Imaging, Praha, Czech Republic). The tail moment, as a measure of DNA damage in the graphic presentation, represents the mean of 50 images (comets) randomly selected from each sample of 3 individual experiments.

3.12. Statistical Analysis

Data are presented as the mean $\pm$ SD from a minimum of 3 sets of measurements. Statistical differences between the control and treatment groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's analysis. $p < 0.05$ was taken as statistically significant.

4. Conclusions

While the use of marine polysaccharides for wound healing has been intensely investigated, few reports have focused on deciphering the role of the filler used to reinforce the polysaccharide matrix in accelerating or delaying wound healing. We have consequently designed several nanocomposite films built from chitosan marine waste. The common threat with these materials is the use of cellulose as a filler. The use of icrometric versus nanometric cellulose and phosphorylated versus non-modified cellulose enabled the preparation of seven films. Our investigation allowed a comparative performance relationship based on the size of the filler and the functionalization type. Measurements of the hemostatic, cytotoxic, and genotoxic properties of cellulose-filled-chitosan films showed that these nanocomposites shorten the clotting times by affecting both the extrinsic and intrinsic coagulation systems and have antioxidant properties. They only slightly reduced the viability of human skin cells and were not genotoxic. In addition, most of the tested nanocomposites significantly accelerated the migration of both fibroblasts and keratinocytes, which is very important since increased skin cell migration promotes wound healing and accelerates scarring. Associated with the previously demonstrated antibacterial properties of phosphorylated cellulose-filled chitosan films, the results shown herein suggest that these transparent, fully degradable, and biocompatible nanocomposite films have the potential to be implemented in wound dressing devices.

Author Contributions: Conceptualization, M.K. and K.M.; methodology, M.K. and K.M.; software, M.K. and K.M.; investigation, M.K.; resources, K.M. and A.E.K.; preparation and characterization of functional cellulose films S.B., N.K. and M.L. writing—original draft preparation, M.K.; writing—review and editing, M.K., K.M., J.K.-C., A.E.K., M.B. supervision, K.M.; funding acquisition, K.M. and M.B.; analysis M.K and K.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by (PHC 19/87) (CNRST-CNRS) and Projet Prioritaire (PPR1/2015/73).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: This research was funded in part by (PHC 19/87) (CNRST-CNRS) and Projet Prioritaire (PPR1/2015/73). A.E.K. thanks also UEMF and Académie Hassan II des Sciences et Technique for funding the Nano-Bio-Mat project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Atala, A.; Lanza, R.; Thomson, J.A.; Nerem, R. *Principles of Regenerative Medicine*; Elsevier: New York, NY, USA, 2011.
- Lanza, R.; Langer, R.; Vacanti, J. *Principles of Tissue Engineering*; Elsevier: Burlington, MA, USA, 2007; pp. 421–429.
- Roubelakis, M.G.; Trohatou, O.; Roubelakis, A.; Mili, E.; Kalaitzopoulos, I.; Papazoglou, G.; Pappa, K.I.; Anagnou, N.P. Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Rev.* **2014**, *10*, 417–428. [[CrossRef](#)]
- Kalinin, A.E.; Kajava, A.V.; Steinert, P.M. Epithelial barrier function: Assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* **2002**, *24*, 789–800. [[CrossRef](#)]
- Martin, P. Wound healing—Aiming for perfect skin regeneration. *Science* **1997**, *276*, 75–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wild, T.; Rahbarnia, A.; Kellner, M.; Sobotka, L.; Eberlein, T. Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition* **2010**, *26*, 862–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Forrest, R.D. Early history of wound treatment. *J. R. Soc. Med.* **1982**, *75*, 198–205. [[PubMed](#)]
- Harris, T.R.; Bransford, J.D.; Brophy, S.P. Roles for learning sciences and learning technologies in biomedical engineering education: A review of recent advances. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 29–48. [[CrossRef](#)]
- Pittman, J. Effect of aging on wound healing: Current concepts. *J. Wound Ostomy Cont. Nurs.* **2007**, *34*, 412–417. [[CrossRef](#)]
- Pikuła, M.; Langa, P.; Kosikowska, P.; Trzonkowski, P. Komórki macierzyste i czynniki wzrostu w gojeniu ran. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2015**, *69*, 874–885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Loeb, L. A comparative study of the mechanism of wound healing. *J. Med. Res.* **1920**, *41*, 247–281.

12. Opneja, A.; Kapoor, S.; Stavrou, E.X. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thromb. Res.* **2019**, *179*, 56–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Andrea, J.; Gallini, R.; Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 1276–1312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Balakrishnan, B.; Mohanty, M.; Umashankar, P.R.; Jayakrishnan, A. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6335–6342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lau, K.; Paus, R.; Tiede, S.; Day, P.; Bayat, A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp. Dermatol.* **2009**, *18*, 921–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Peplow, P.V.; Chatterjee, M.P. A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. *Cytokine* **2013**, *62*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hu, H.; Xu, F.J. Rational design and latest advances of polysaccharide-based hydrogels for wound healing. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 2084–2101. [[CrossRef](#)]
18. Cheng, H.; Li, C.; Jiang, Y.; Wang, B.; Wang, F.; Mao, Z.; Xu, H.; Wang, L.; Sui, X. Facile preparation of polysaccharide-based sponges and their potential application in wound dressing. *J. Mater. Chem. B.* **2018**, *6*, 634–640. [[CrossRef](#)]
19. Jing, X.; Sun, Y.; Ma, X.; Hu, H. Marine polysaccharides: Green and recyclable resources as wound dressings. *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5*, 5595–5616. [[CrossRef](#)]
20. Liang, Y.; He, J.; Guo, B. Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. *ACS Nano* **2021**, *15*, 12687–12722. [[CrossRef](#)]
21. Zhong, Y.; Xiao, H.; Seidi, F.; Jin, Y. Natural Polymer-Based Antimicrobial Hydrogels without Synthetic Antibiotics as Wound Dressings. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 2983–3006. [[CrossRef](#)]
22. Rial-Hermida, M.I.; Rey-Rico, A.; Blanco-Fernandez, B.; Carballo-Pedrares, N.; Byrne, E.M.; Mano, J.F. Recent Progress on Polysaccharide-Based Hydrogels for Controlled Delivery of Therapeutic Biomolecules. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*, 4102–4127. [[CrossRef](#)]
23. Chen, X.; Yang, H.; Yan, N. Shell Biorefinery: Dream or Reality? *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 13402–13421. [[CrossRef](#)]
24. El Kadib, A. Green and Functional Aerogels by Macromolecular and Textural Engineering of Chitosan Microspheres. *Chem. Rec.* **2020**, *20*, 753–772. [[CrossRef](#)]
25. Mohandas, A.; Deepthi, S.; Biswas, R.; Jayakumar, R. Chitosan based metallic nanocomposite scaffolds as antimicrobial wound dressings. *Bioact. Mater.* **2018**, *3*, 267–277. [[CrossRef](#)]
26. Qu, B.; Luo, Y. A review on the preparation and characterization of chitosan-clay nanocomposite films and coatings for food packaging applications. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **2021**, *2*, 100–102.
27. Rezaei, F.S.; Sharifianjazi, F.; Esmaeilkhani, A.; Salehi, E. Chitosan films and scaffolds for regenerative medicine applications: A review. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *273*, 118631. [[CrossRef](#)]
28. Chabbi, J.; Aqil, A.; Katir, N.; Vertruyen, B.; Jerome, C.; Lahcini, M.; El Kadib, A. Aldehyde-conjugated chitosan-graphene oxide glucodynamers: Ternary cooperative assembly and controlled chemical release. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *230*, 115634. [[CrossRef](#)]
29. Wrońska, N.; Katir, N.; Miłowska, K.; Hammi, N.; Nowak, M.; Kędzierska, M.; Anouar, A.; Zawadzka, K.; Bryszewska, M.; El Kadib, A.; et al. Antimicrobial effect of chitosan films on food spoilage bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5839. [[CrossRef](#)]
30. Wronska, N.; Anouar, A.; El Achaby, M.; Zawadzka, K.; Kędzierska, M.; Miłowska, K.; Katir, N.; Draoui, K.; Rózsalska, S.; Piwonski, I.; et al. Chitosan-Functionalized Graphene Nanocomposite Films: Interfacial Interplay and Biological Activity. *Materials* **2020**, *13*, 998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Hammi, N.; Wrońska, N.; Katir, N.; Lisowska, K.; Marcotte, N.; Cacciaguerra, T.; Bryszewska, M.; El Kadib, A. Supramolecular chemistry driven preparation of nanostructured, transformable and biologically-active chitosan-clustered single, binary and ternary metal oxide bioplastics. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 61–69.
32. Chabbi, J.; Jennah, O.; Katir, N.; Lahcini, M.; Bousmina, M.; El Kadib, A. Aldehyde-functionalized chitosan-montmorillonite films as dynamically-assembled, switchable-chemical release bioplastics. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *183*, 287–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Blilid, S.; Kędzierska, M.; Wrońska, N.; El Achaby, M.; Katir, N.; Belamie, E.; Alonso, B.; Lisowska, K.; Lahcini, M.; Bryszewska, M.; et al. Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-filled chitosan nanocomposites as fully sustainable, biologically active bioplastics. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 18354–18365. [[CrossRef](#)]
34. Blilid, S.; Katir, N.; El Haskouri, J.; Lachini, M.; Royer, S.; El Kadib, A. Phosphorylated micro- vs. nano-cellulose: A comparative study on their surface functionalisation, growth of titanium-oxo-phosphate clusters and removal of chemical pollutants. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 15555. [[CrossRef](#)]
35. Li, H.; Cheng, W.; Liua, K.; Chen, L.; Huang, Y.; Wang, X.; Lva, Z.; He, J.; Li, C. Reinforced collagen with oxidized microcrystalline cellulose shows improved hemostatic effects. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *165*, 30–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cheng, W.; He, J.; Chen, M.; Li, D.; Li, H.; Chen, L.; Cao, Y.; Wang, J.; Huang, H. Preparation, Functional Characterization and Hemostatic Mechanism Discussion for Oxidized Microcrystalline Cellulose and Its Composites. *Fibers Polym.* **2016**, *17*, 1277–1286. [[CrossRef](#)]
37. Schonauer, C.; Tessitore, E.; Barbagallo, G.; Albanese, V.; Moraci, A. The use of local agents: Bone wax, gelatin, collagen, oxidized cellulose. *Eur. Spine J.* **2004**, *13*, 89–96. [[CrossRef](#)]
38. Brown, A.C.; Barker, T.H. Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1502–1514. [[CrossRef](#)]

39. Chen, Z.; Han, L.; Liu, C.; Du, Y.; Hu, X.; Du, G.; Shan, C.; Yang, K.; Wang, C.; Li, M.; et al. A rapid hemostatic sponge based on large, mesoporous silica nanoparticles and N alkylated chitosan. *Nanoscale* **2018**, *10*, 20234–22024. [\[CrossRef\]](#)
40. Kheirabadi, B.S.; Scherer, M.R.; Estep, J.S.; Dubick, M.A.; Holcomb, J.B. Determination of efficacy of new hemostatic dressings in a model of extremity arterial hemorrhage in swine. *J. Trauma* **2009**, *67*, 450–460. [\[CrossRef\]](#)
41. Zhang, H.; Yang, Y.; Zhou, Z. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. *J. Integr. Agric.* **2018**, *17*, 256–263. [\[CrossRef\]](#)
42. Arnao, M.B.; Cano, A.; Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* **2001**, *73*, 239–244. [\[CrossRef\]](#)
43. Espinosa, E.; Bascón-Villegas, I.; Rosal, A.; Pérez-Rodríguez, F.; Chinga-Carrasco, G.; Rodríguez, A. PVA/(ligno)nanocellulose biocomposite films. Effect of residual lignin content on structural, mechanical, barrier and antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *141*, 197–206. [\[CrossRef\]](#)
44. Zhang, W.; Zhang, Y.; Cao, J.; Jiang, W. Improving the performance of edible food packaging films by using nanocellulose as an additive. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *166*, 288–296. [\[CrossRef\]](#)
45. El Fawal, G.F.; Omer, A.M.; Temer, T.M. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities for cellulose acetate films incorporated with Rosemary and Aloe Vera essential oils. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 1510–1518. [\[CrossRef\]](#)
46. Roy, S.; Kim, H.C.; Kim, J.W.; Zhai, L.; Zhu, Q.Y.; Kim, J. Incorporation of melanin nanoparticles improves UV-shielding, mechanical and antioxidant properties of cellulose nanofiber based nanocomposite films. *Mater. Today Commun.* **2020**, *24*, 100984. [\[CrossRef\]](#)
47. Poonguzhali, R.; Khaleel Basha, S.; Sugantha Kumari, V. Synthesis and characterization of chitosan-PVP-nanocellulose composites for in-vitro wound dressing application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *105*, 111–120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Naseri, N.; Mathew, A.P.; Girandon, L. Porous electrospun nanocomposite mats based on chitosan–cellulose nanocrystals for wound dressing: Effect of surface characteristics of nanocrystals. *Cellulose* **2015**, *22*, 521–534. [\[CrossRef\]](#)
49. Dong, S.; Hirani, A.A.; Colacino, K.R.; Lee, Y.W.; Roman, M. Cytotoxicity and Cellular Uptake of Cellulose Nanocrystals. *Nano Life* **2012**, *2*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
50. Rodríguez, K.; Gatenholm, P.; Renneckar, S. Electrospinning cellulosic nanofibers for biomedical applications: Structure and in vitro biocompatibility. *Cellulose* **2012**, *19*, 1583–1598. [\[CrossRef\]](#)
51. Mathew, A.P.; Oksman, K.; Karim, Z.; Liu, P.; Khan, S.A.; Naseri, N. Process scale up and characterization of wood cellulose nanocrystals hydrolysed using bioethanol pilot plant. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, *58*, 212–219. [\[CrossRef\]](#)
52. Rokstad, A.M.; Brekke, O.L.; Steinkjer, B.; Ryan, L.; Kolláriková, G.; Strand, B.L.; Skjåk-Bræk, G.; Lambris, J.D.; Lacík, I.; Mollnes, T.E.; et al. The induction of cytokines by polycation containing microspheres by a complement dependent mechanism. *Biomaterials* **2013**, *34*, 621–630. [\[CrossRef\]](#)
53. Burd, A.; Kwok, C.H.; Hung, S.C.; Chan, H.S.; Gu, H.; Lam, W.K.; Huang, L. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound Repair Regen.* **2007**, *15*, 94–104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Čolid, M.; Mihajlović, D.; Mathew, A.; Naseri, N.; Kokol, V. Cytocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose* **2015**, *22*, 763–778.
55. Paddle-Ledinek, J.E.; Nasa, Z.; Cleland, H.J. Effect of Different Wound Dressings on Cell Viability and Proliferation. *Plast. Reconstr. Surg.* **2006**, *117*, 110–118. [\[CrossRef\]](#)
56. Petersen, N.; Gatenholm, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 1277–1286. [\[CrossRef\]](#)
57. Aimonen, K.; Suhonen, S.; Hartikainen, M.; Lopes, V.R.; Norppa, H.; Ferraz, N.; Catalán, J. Role of Surface Chemistry in the In Vitro Lung Response to Nanofibrillated Cellulose. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 389. [\[CrossRef\]](#)
58. Jabaut, J.; Ather, J.L.; Taracanova, A.; Poynter, M.E.; Ckless, K. Mitochondria-targeted drugs enhance Nlrp3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in association with alterations in cellular redox and energy status. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *60*, 233–245. [\[CrossRef\]](#)
59. Bulua, A.C.; Simon, A.; Maddipati, R.; Pelletier, M.; Park, H.; Kim, K.Y.; Sack, M.N.; Kastner, D.L.; Siegel, R.M. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAP). *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 519–533. [\[CrossRef\]](#)
60. Zhou, R.; Yazdi, A.S.; Menu, P.; Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **2011**, *469*, 221–225. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Sunasee, R.; Araoye, E.; Pyram, D.; Usha, D.; Hemraz, D.; Boluk, Y.; Ckless, K. Cellulose nanocrystal cationic derivative induces NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion associated with mitochondrial ROS production. *Biochem. Biophys. Rep.* **2015**, *4*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
62. Tyagi, N.; Ovechkin, A.V.; Lominadze, D.; Moshal, K.S.; Tyagi, S.C. Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *J. Cell Biochem.* **2006**, *98*, 1150–1162. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Wei, J.; Liu, M.; Liu, H.; Wang, H.; Wang, F.; Zhang, Y.; Lin, X. Oleanolic acid arrests cell cycle and induces apoptosis via ROS-mediated mitochondrial depolarization and lysosomal membrane permeabilization in human pancreatic cancer cells. *J. Appl. Toxicol.* **2012**, *33*, 756–765. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

64. Wang, L.; Mao, L.; Qi, F.; Li, X.; Ullah, W.M.; Zhon, M.; Shi, Z.; Yan, G. Synergistic effect of highly aligned bacterial cellulose/gelatin membranes and electrical stimulation on directional cell migration for accelerated wound healing. *Chem. Eng. J.* **2021**, *424*, 130563. [\[CrossRef\]](#)
65. Bacakova, M.; Pajorova, J.; Sopuch, T.; Bacakova, L. Fibrin-Modified Cellulose as a Promising Dressing for Accelerated Wound Healing. *Materials* **2018**, *11*, 2314. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Dvorankova, B.; Smetana, K., Jr.; Vacik, J.; Jelinkova, M. Cultivation of keratinocytes on poly HEMA and their migration after inversion. *Folia Biol.* **1996**, *42*, 83–86.
67. Collins, A.R.; Dobson, V.L.; Dusinska, M.; Kennedy, G.; Stetina, R. The comet assay: What can it really tell us? *Mutat. Res.* **1997**, *375*, 183–193. [\[CrossRef\]](#)
68. Collins, A.R.; Oscoz, A.A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C.C.; Stetina, R. The comet assay: Topical issues. *Mutagen. Adv.* **2008**, *23*, 143–151. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Donaldson, K.; Aitken, R.; Tran, L.; Stone, V.; Duffin, R.; Forrest, G.; Alexander, A. Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol. Sci.* **2006**, *92*, 5–22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Coelho, F.; Cavicchioli, M.; Specian, S.S.; Scarel-Caminaga, R.M.; Penteado, L.; Medeiros, A. Bacterial cellulose membrane functionalized with hydroxiapatite and anti-bone morphogenetic protein 2: A promising material for bone regeneration. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0221286.
71. Coelho, F.; do Vale Braidão, G.V.; Cavicchioli, M.; Mendes, L.S.; Specian, S.S.; Franchi, L.P. Toxicity of therapeutic contact lenses based on bacterial cellulose with coatings to provide transparency. *Contact Lens Anterior Eye* **2019**, *42*, 512–519. [\[CrossRef\]](#)
72. Moreira, S.; Silva, N.B.; Almeida-Lima, J.; Rocha, H.A.O.; Medeiros, S.R.B.; Alves, C.; Gama, F.M. BC nanofibres: In vitro study of genotoxicity and cell proliferation. *Toxicol. Lett.* **2009**, *189*, 235–241.
73. Prasa, D. The ability of thrombin inhibitors to reduce the thrombin activity generated in plasma on extrinsic and intrinsic activation. *Thromb Haemost.* **1997**, *77*, 498–503. [\[CrossRef\]](#)
74. Kolodziejczyk-Czepas, J.; Sieradzka, M.; Moniuszko-Szajwaj, B.; Nowak, P.; Oleszek, W.; Stochmal, A. Phenolic fractions from nine *Trifolium* species modulate the coagulant properties of blood plasma in vitro without cytotoxicity towards blood cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **2018**, *70*, 413–425. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Kolodziejczyk-Czepas, J.; Ponczek, M.; Sady-Janczak, M.; Pilarski, R.; Bukowska, B. Extracts from *Uncaria tomentosa* as antiplatelet agents and thrombin inhibitors—The in vitro and in silico study. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, 113494. [\[CrossRef\]](#)
76. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 277–285. [\[CrossRef\]](#)
77. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [\[CrossRef\]](#)
78. Yoo, D.J.; Ravichandiran, P.; Subramaniam, S.A.; Kim, S.-Y.; Kim, J.-S.; Park, B.-H.; Shim, K.S. Synthesis and anticancer evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives containing a phenylamino-sulfanyl moiety. *ChemMedChem* **2019**, *14*, 512.
79. Myhre, O.; Andersen, J.M.; Aarnes, H.; Fonnum, F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1575–1582. [\[CrossRef\]](#)
80. Ravichandiran, P.; Maslyk, M.; Sheet, S.; Janeczko, M.; Premnath, D.; Kim, A.R.; Yoo, D.J. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Potential Antibacterial Agents. *ChemistryOpen* **2019**, *8*, 589–600. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Ravichandiran, P.; Sheet, S.; Premnath, D.; Kim, A.R.; Yoo, D.J. 1,4-Naphthoquinone Analogues: Potent Antibacterial Agents and Mode of Action Evaluation. *Molecules* **2019**, *24*, 1437. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Feldkamp, T.; Kribben, A.; Weinberg, J.M. Assessment of mitochondrial membrane potential in proximal tubules after hypoxia-reoxygenation. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2005**, *288*, 1092–1102. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Entschladen, F.; Drell, T.L.; Lang, K.; Masur, K.; Palm, D.; Bastian, P.; Niggemann, B.; Zaenker, K.S. Analysis methods of human cell migration. *Exp. Cell Res.* **2005**, *307*, 418–426. [\[CrossRef\]](#)
84. Boyden, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* **1962**, *115*, 453–466. [\[CrossRef\]](#)
85. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191. [\[CrossRef\]](#)
86. Blasiak, J.; Kowalik, J. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat. Res.* **2000**, *469*, 135–145. [\[CrossRef\]](#)



Article

Glassy-like Metal Oxide Particles Embedded on Micrometer Thicker Alginate Films as Promising Wound Healing Nanomaterials

Marta Kędzierska ^{1,*} , Nisrine Hammi ², Joanna Kolodziejczyk-Czepas ³ , Nadia Katir ² , Maria Bryszewska ¹ , Katarzyna Milowska ¹ and Abdelkrim El Kadib ^{2,*}

- ¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; maria.bryszewska@biol.uni.lodz.pl (M.B.); katarzyna.milowska@biol.uni.lodz.pl (K.M.)
- ² Euromed Research Center, Engineering Division, Euro-Med University of Fes (UEMF), Route de Meknes, Rond-Point de Bensouda, Fès 30070, Morocco; n.hammi@ueuromed.org (N.H.); n.katir@ueuromed.org (N.K.)
- ³ Department of General Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; joanna.kolodziejczyk@biol.uni.lodz.pl
- * Correspondence: marta.kedzierska@biol.uni.lodz.pl (M.K.); a.elkadib@ueuromed.org (A.E.K.)

Abstract: Micrometer-thicker, biologically responsive nanocomposite films were prepared starting from alginate-metal alkoxide colloidal solution followed by sol-gel chemistry and solvent removal through evaporation-induced assembly. The disclosed approach is straightforward and highly versatile, allowing the entrapment and growth of a set of glassy-like metal oxide within the network of alginate and their shaping as crack-free transparent and flexible films. Immersing these films in aqueous medium triggers alginate solubilization, and affords water-soluble metal oxides wrapped in a biocompatible carbohydrate framework. Biological activity of the nano-composites films was also studied including their hemolytic activity, methemoglobin, prothrombin, and thrombin time. The effect of the films on fibroblasts and keratinocytes of human skin was also investigated with a special emphasis on the role played by the incorporated metal oxide. This comparative study sheds light on the crucial biological response of the ceramic phase embedded inside of the films, with titanium dioxide being the most promising for wound healing purposes.

Keywords: alginate; metal oxide clusters; flexible films; hemolytic activity; prothrombin and thrombin time; wound healing



Citation: Kędzierska, M.; Hammi, N.; Kolodziejczyk-Czepas, J.; Katir, N.; Bryszewska, M.; Milowska, K.; El Kadib, A. Glassy-like Metal Oxide Particles Embedded on Micrometer Thicker Alginate Films as Promising Wound Healing Nanomaterials. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5585. <https://doi.org/10.3390/ijms23105585>

Academic Editor: Sergey Dobretsov

Received: 20 April 2022

Accepted: 14 May 2022

Published: 17 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Polysaccharides are notoriously recognized as biocompatible and abundant building-blocks, built from naturally-designed intriguing architecture units, with additional advantages of featuring functional groups for further modification [1,2]. Commonly, these carbohydrates can be processed in water, under mild conditions, and can be configured in different forms (fibers, films, microspheres, monoliths, fine powders) with possible textural engineering of their secondary structures [3–5]. These features have triggered their use as precursors for nanostructured hybrid materials [6,7].

Alginate extracted from brown algae is among the most interesting carbohydrates. Its structure consists of alternated blocks of (1,4)-linked urinate residues of pyranose rings featuring carboxylic pendant groups (Figure 1). Alginate is extensively used for the entrapment of biologically active materials for diverse applications such as the controlled release of drug or cosmetics, biological catalysis, food preservation and the transport of enzymes for detergency [8,9]. Alginate also reacts with divalent and multivalent cations to form the so-called ionotropic gels [10]. Alginate can be also distinguished by its outstanding cell encapsulation virtues, compared to its polysaccharide congeners. In essence, the two

inherent properties of alginate, namely (i) its ability to form a strong gelling network with tunable strength, and (ii) its stabilizing effect toward metal clusters and nanoparticles, are credited its use to host chemical objects [11,12]. Modified alginate consequently presents enormous potential for further use as wound healing and tissue engineering materials.

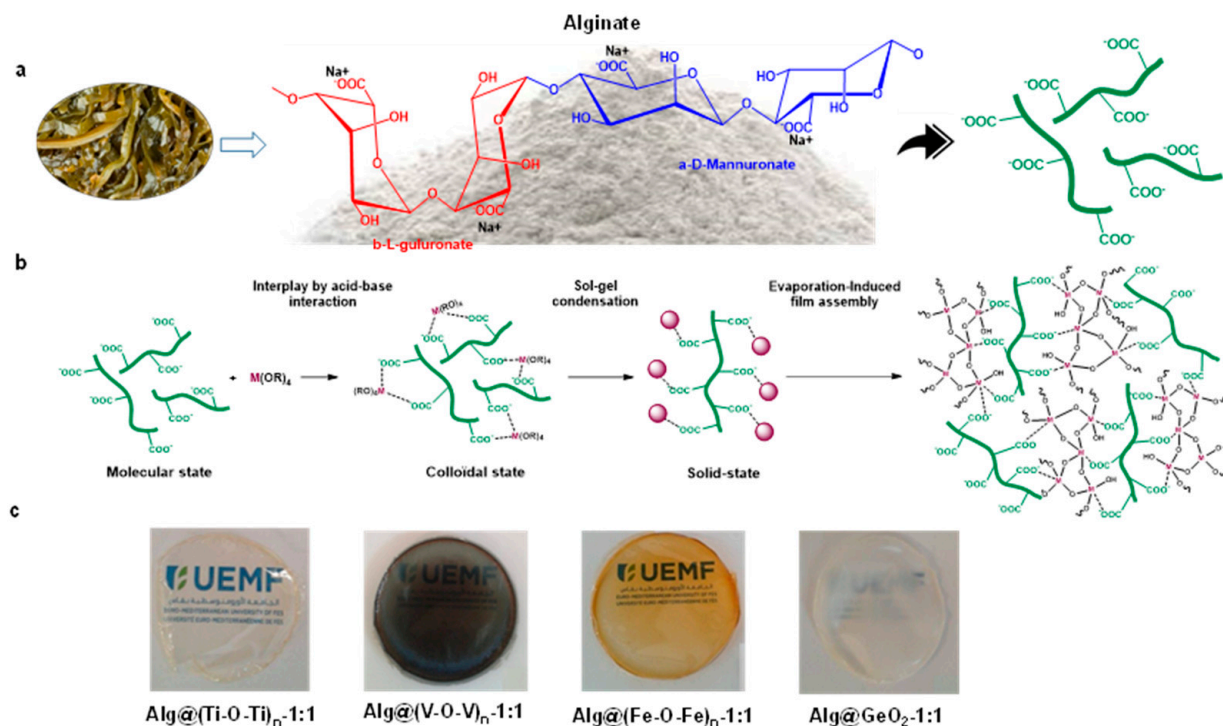


Figure 1. Stepwise preparation of the functional alginate-metal oxide $[\text{Alg} @ (\text{M-O-M})_n]$ films. (a) chemical structure of alginate. (b) a plausible mechanism taking place during the sol-gel process and the film formation. (c) digital photos.

Prompted by the possible involvement of its carboxylic acid to stabilize metal alkoxide sol-gel species and the straightforward casting of its body as flexible films, we envisioned that such an approach could lead to the preparation of sol-gel modified alginate films. Notably, many nanosized metal oxide particles have been proven to be biologically active, opening indeed a new channel of possibilities in nanomedicine [13,14]. We have consequently investigated different sol-gel precursors to trigger the growth of titanium dioxide, iron oxide, zinc oxide, germanium oxide, and vanadium oxide inside of alginate films. These metal oxides were selected considering their precedents in sol-gel chemistry and the available data concerning their biological activity. Their dissolution further provides an entry to ultra-stable, water-dispersed metal oxide nanoparticles coated on a carbohydrate framework. Biological activity of these films was undertaken to obtain insight into their possible use for tissue engineering and wound healing applications.

2. Results and Discussion

2.1. Preparation and Characterisation of $\text{Alg} @ (\text{M-O-M})_n$ Films

The preparation of alginate-metal oxide $\text{Alg} @ (\text{M-O-M})_n$ films is a multistep procedure starting from aqueous sodium alginate solution, to which an ethanol solution of metal alkoxide was added dropwise (Figure 1).

After aging and stirring until homogenization, the mixture was poured into a Petri dish and the removal of the solvent triggered sol-gel condensation and growth of the metal oxide clusters and simultaneous densification of the network. The process leads to the formation of micrometer thicker films that can be easily taken off from the initial mold, and handled without precautions. As a result, flexible and transparent crack-free films are obtained as illustrated in Figure 1c. Interestingly, the amount of the metal oxide can be tuned with

respect to that of alginate and the resulting films were denoted as Alg@(M-O-M)_n-X:Y (where Alg refers to alginate, (M-O-M)_n refers to the metaloxane network grown inside and X:Y is the amount of alginate and metal oxide engaged. This amount is calculated based on the number of carboxylic groups within the alginate, being 0.231 mmol·g⁻¹. As it will be commented later, when the structure of the metaloxane network could be unambiguously established, the expected structure is directly mentioned [ex. GeO₂ rather than (Ge-O-Ge)_n] whereas the general formula of (M-O-M)_n is used when only the amorphous network was grown inside of the films. We have interestingly noticed that an impressive equimolar amount (1:1) of COO⁻:M could be held within the matrix without disrupting the sol-gel polymerization or the film quality despite the well-established stiffness of the metal oxide phase. This result highlights the importance of the following in-situ synthesis, especially for high metal oxide loading, compared to conventional physical mixing of the formed metal oxide and polymeric alginate that do not provide high-quality films. Above this ratio, the excess of metal oxide with respect to alginate provides less regular films with significant cracking, meaning that there is a limit for the amount of metal oxide to be entrapped while keeping the film quality and transparency.

Observation with the naked eye provides evidence for the incorporation of the metal oxide clusters inside as the film color corresponds to that of the native metal precursor solution (dark green for vanadium oxide, transparent for zinc oxide, light yellow for titanium dioxide and white for germanium oxide) (Figure 1c). The thickness of the films ranges from 15 to 25 µm. EDX mapping was also used to confirm the presence of these inorganic oxide species where the incorporated element was seen in the spectra (Figure S2b). The infrared spectra of the films exhibited asymmetric stretching of the carboxylate groups at 1592 cm⁻¹, characteristic of the alginate backbone. Additional typical bands at 1407 cm⁻¹ and 1302 cm⁻¹ were also observed, indicating the intactness of alginate during the self-assembly and sol-gel polymerization. Besides, the fingerprint of the metal oxide was also noticed at low regions, typical of an extended network of M-O-M based inorganic materials. While those seen for V-O-V at 789 cm⁻¹ and for Ti-O-Ti at 1084 cm⁻¹ overlap with those of alginate, the ones related to Fe-O-Fe (546 cm⁻¹) and Ge-O-Ge (862 cm⁻¹) are well distinguished, thereby providing clear evidence for the formation of M-O-M bridges inside of the films (Figures 2 and S3).

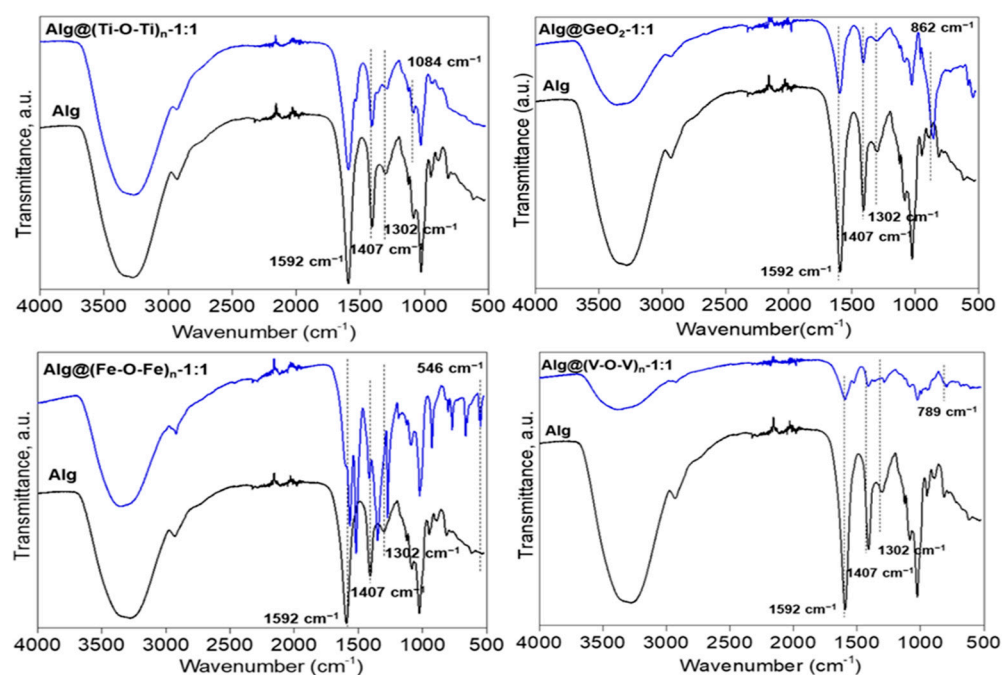


Figure 2. FTIR spectra of Alg and the corresponding Alg@(M-O-M)_n nanocomposites.

SEM analyses of $\text{Alg} @ (\text{Ti-O-Ti})_n$ -1:1 show a smooth surface with no visible clustering or aggregation that may be assigned to uncontrolled growth of the metal oxide species. In the case of $\text{Alg} @ \text{ZnO}$ -1:1, regular discrete nanoparticles are visible and in the case of $\text{Alg} @ (\text{Fe-O-Fe})_n$ -1:1 slightly bigger objects can be distinguished from the network, as a result of the significant growth of the resulting metal oxide particles (Figures 3 and S2a). However, the pattern is very typical of well-controlled nanoparticles rather than randomly grown surfactant-free nanoparticles. Nice regular nano-squares are also observed in the case of $\text{Alg} @ \text{GeO}_2$ -1:1 where the squares are attributed to the formation of crystalline germanium oxide. However, the flexibility of the film is also maintained as it is for other materials, meaning that the growth of the crystalline phase has occurred intimately within the alginate network, thereby excluding the phase separation (Figure 3).

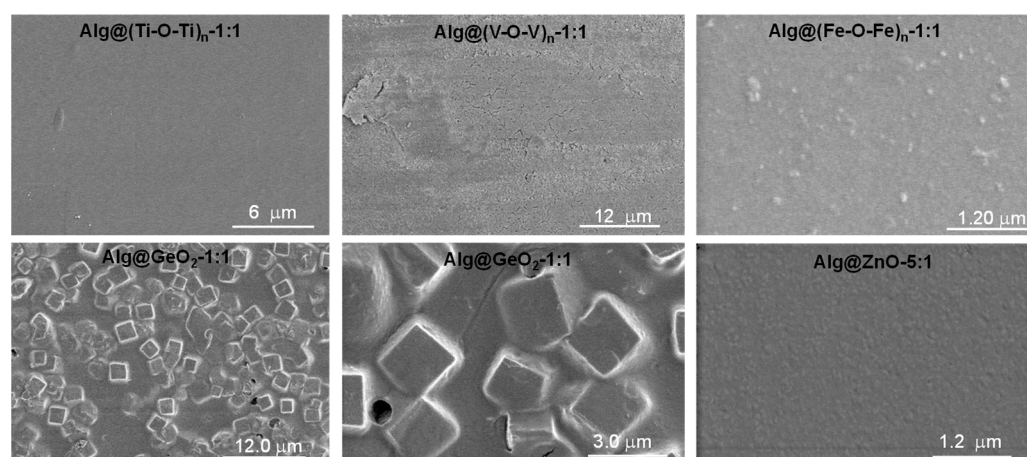


Figure 3. SEM of $\text{Alg} @ (\text{Ti-O-Ti})_n$ -1:1, $\text{Alg} @ (\text{V-O-V})_n$ -1:1, $\text{Alg} @ (\text{Fe-O-Fe})_n$ -1:1, $\text{Alg} @ \text{GeO}_2$ -1:1 and $\text{Alg} @ \text{ZnO}$ -5:1 films.

X-ray diffraction (XRD) reveals that, depending on the metal precursor, amorphous or crystalline phase could be formed inside (Figure S4). Indeed, no crystalline peaks could be observed in the case of $\text{Alg} @ (\text{Ti-O-Ti})_n$ -1:1, $\text{Alg} @ \text{ZnO}$ -5:1 and for $\text{Alg} @ \text{ZnO}(\text{Cl})$ -5:1 meaning that only amorphous titanium dioxide and zinc oxide could be formed under our conditions. Some crystalline peaks were observed in the case of $\text{Alg} @ (\text{V-O-V})_n$ -1:1. Well-resolved crystals are also noticed in the case of $\text{Alg} @ \text{GeO}_2$ -1:1, that match perfectly with α -quartz-like trigonal GeO_2 structure with P3221 hexagonal symmetry. The size of the crystal is of 51 nm as estimated by Scherrer equation. In the case of $\text{Alg} @ (\text{Fe-O-Fe})_n$ -1:1, XRD reveals the presence of one diffraction peak at 2θ value of 13° . This single crystal fits well with the crystalline structure of $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$ with an average size of 9.73 nm. These similarities suggest the formation of three iron clusters ligated by carboxylic groups following the well-known egg-model and their confinement inside.

High thermal stability was noticed for alginate-metal oxides $\text{Alg} @ (\text{M-O-M})_n$ film as compared to the native alginate film owing to the successful incorporation of metal oxide within the film (Figure S5). A significant increase of T50 (50 wt% decomposition temperature) was observed from 271°C for alginate film to 495°C for $\text{Alg} @ (\text{Ti-O-Ti})_n$ -1:1, with an impressive ΔT of 224°C . Furthermore, up to 28 wt% of inorganic oxide residue remained after complete degradation of the polysaccharide films at 900°C .

We have next triggered disintegration of alginate-based hybrid films under aqueous conditions (Table S1b). $\text{Alg} @ (\text{M-O-M})_n$ could be dissolved easily in neutral solutions compared to analogues chitosan-based films that necessitate gentle acidic solution [15]. $\text{Alg} @ \text{GeO}_2$ -1:1, $\text{Alg} @ (\text{Fe-O-Fe})_n$ -1:1 and $\text{Alg} @ (\text{V-O-V})_n$ -1:1 dissolve instantaneously to give a long term stable dispersed solution (Figure 4a–e). Visualization of these solutions by transmission electron microscopy confirms the formation of discrete and small nanoparticles (Figure 4 and Figure S6). The smallest size (nearly 5 nm) observed in the case of $\text{Alg} @ (\text{Fe-O-Fe})_n$ -1:1 and $\text{Alg} @ (\text{Ti-O-Ti})_n$ -1:1, which is the consequence of the structure-

directing growth exerted by alginate, is consistent with the amorphous nature of the metal oxide phase, as a substantial expansion is necessary to trigger crystallization. In the case of germanium oxide, regular spherical particles of nearly 80 nm are observed upon dissolution, meaning that germanium oxide crystals are built from the association of these elementary nanoparticles. More interestingly, these solutions maintain their colloidal stability for an extended time of two months, with no noticeable evolution or sedimentation. This long-term stability contrasts with the high surface energy of metal oxide particles in water, and could be explained by an intimate interplay of the metal oxide and the alginate backbone where the latter ensure favorable interfacial interactions with the milieu while preventing the coarsening of the metal oxide nanoparticles. A similar behavior was previously disclosed for water-dispersed Prussian blue nanoparticles prepared by dissolution of porous polysaccharide-Prussian blue aerogels [16] and by dismantling of chitosan-mixed metal oxide films [15]. To sum up, the prolonged stability of these colloidal solutions is due to the presence of metal oxide nanoparticles (with a small size) and their strong interplay through hydrogen-bonding with alginate.

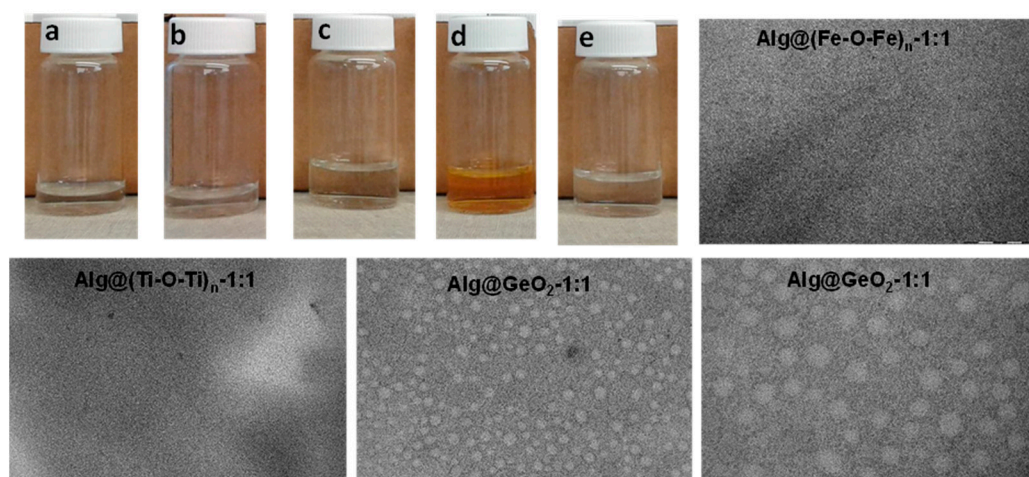


Figure 4. Digital photos and TEM. (a) Alg. (b) Alg@(Ti-O-Ti)_n-1:1, (c) Alg@(V-O-V)_n-1:1, (d) Alg@(Fe-O-Fe)_n-1:1, (e) Alg@GeO₂-1:1 and their corresponding transmission electronic microscopy.

2.2. Hemolytic Activity and Hb Adsorption

Human erythrocytes hemolysis was determined by measuring the hemoglobin content after incubation (1 and 3 h) with alginate nanocomposites (Figure 5a). We observed that all alginate-metal oxide nanocomposites induced hemolysis. The degree of hemolysis depends on the metal oxide entrapped inside and the incubation time. For 1-h incubation, the largest hemolysis of 9% was caused by Alg@(V-O-V)_n-1:1 while the lowest value (2%) was for Alg@GeO₂-1:1. For the other films, the hemolysis ranged from 2.5 to 5% and increases to around 3–11% after 3 h of incubation. Again, the highest hemolysis was induced by Alg@(V-O-V)_n film and the lowest hemolysis was observed for Alg@ZnO(Cl)-5:1 and Alg@ZnO-20:1. Notably, the percentage of hemolysis measured for Alg@ZnO(Cl)-5:1 and Alg@(Ti-O-Ti)_n-1:1 was higher after 1 h of incubation than after 3 h of incubation.

The decrease in hemolysis after prolonged incubation gave grounds to check the adsorption of hemoglobin on the surface of the films (Figure 5b). As in hemolysis, adsorption of hemoglobin depended on the type of their modification. Adsorption ranges from 1.5% to 15% after 1 h of incubation and from 3% to 26% after 3 h. The lowest percentage of adsorption after 3 h of incubation was recorded for Alg@ZnO-5:1 and Alg@GeO₂-1:1 films, and the highest for Alg@(V-O-V)_n-1:1. The results suggest that Hb released from erythrocytes is adsorbed to alginate materials, which results in a decrease in the hemoglobin content in the solution, which was regarded as no increase in hemolysis after 3 h of incubation. A low hemolysis and adsorption of Hb after incubation with alginate alone film (Alg) and a germanium oxide-containing film (Alg@GeO₂-1:1) may suggest that these two films are

the least hemotoxic. These results are in agreement with the previously reported literature. The highest hemolysis was observed for Alg@(V-O-V)_n-1:1. Precedents have shown that vanadium pentoxide induces 65% hemolysis of red blood cells [17] while other works have suggested the involvement of vanadium species in producing lipid peroxidation in the erythrocyte membrane, leading to hemolysis, with a possible interference with the erythroid differentiation process [18]. A correlation between the degree of hemolysis and the decrease in the reduction of peripheral erythrocytes after exposure to vanadium has been also demonstrated [19]. For Alg@ZnO films, hemolysis was directly proportional to the concentration of ZnO in the films, in agreement with the literature [20,21]. An opposite trend was however observed for Alg@ZnO(Cl), which points to the role of the starting precursor that contain chloride. However, adsorption of hemoglobin may interfere with the determination of the level of hemolysis.

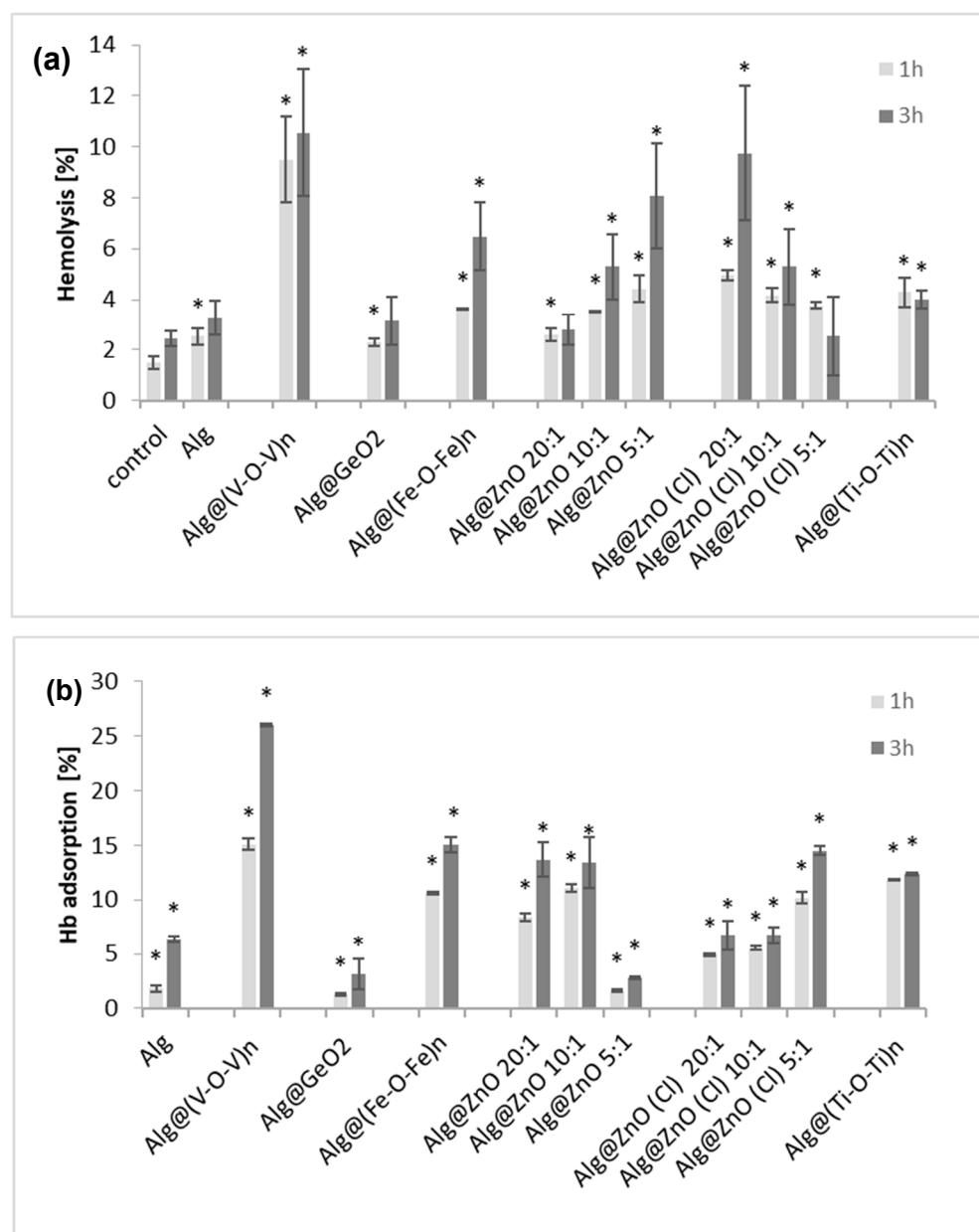


Figure 5. (a) Hemolysis of erythrocytes incubated with alginate-metal oxide nanocomposite films for 1 and 3 h. All changes are statistically significant compared with the control ($n = 6$, $* p < 0.05$). (b) Hemoglobin adsorption by different alginate-metal oxide composites incubated for 1 and 3 h ($n = 10$, $* p < 0.05$).

2.3. Methemoglobin

We next turned our attention to measure the percentage of methemoglobin. In fact, circulating hemoglobin is always at risk of being oxidized to methemoglobin, in which the molecule retains its original tetrameric structure but can no longer carry oxygen.

We herein noticed that most alginate-metal oxide films cause oxidation of hemoglobin after 1 h incubation with erythrocytes (Figure 6). The measured methemoglobin was only 2% for the control after 1 h of incubation and increases to 4% after 3 h. After 1 h incubation with alginate films, the highest methemoglobin content (20%) was in the sample incubated with Alg@(V-O-V)_n-1:1. Statistically significant changes in the percentage of met-Hb content were observed for all alginate composites after 3 h incubation. A percentage of 7% was measured for Alg@ZnO-20:1 while a high amount of met-Hb was rather measured for Alg@(Fe-O-Fe)_n-1:1 (37%) and for Alg@(V-O-V)_n-1:1 (42%). We indeed conclude that the presence of iron oxide and vanadium oxide in alginate films contributes to the increase in the level of metHb in erythrocytes in in vitro tests.

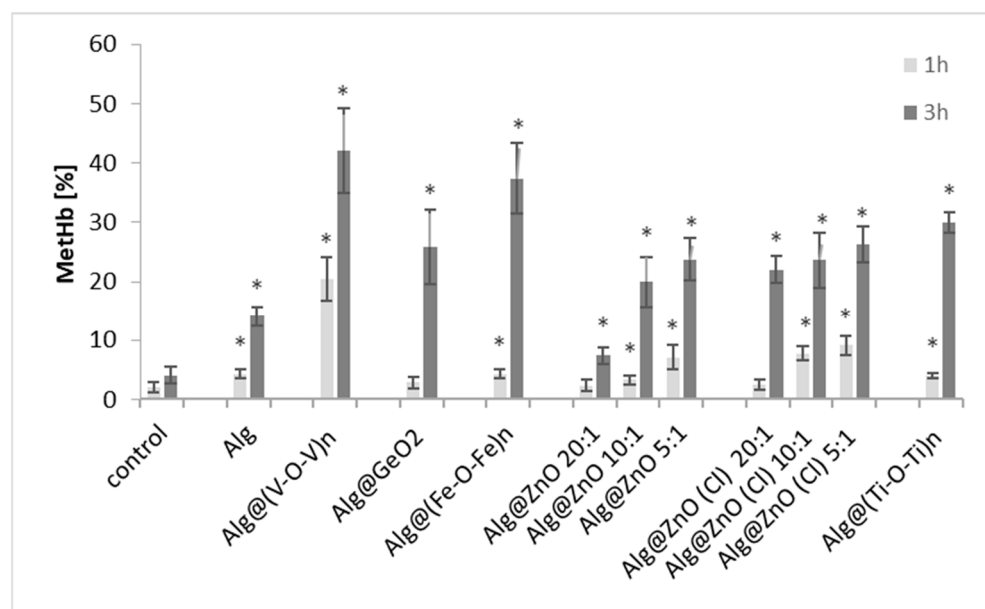


Figure 6. Percentage of methemoglobin in erythrocytes incubated with alginate composites for 1 and 3 h. All changes are statistically significant compared with the control ($n = 6$, $* p < 0.05$).

2.4. Cytotoxicity (MTT)

In order to assess the cytotoxicity of the tested composites on fibroblasts and keratinocytes of human skin, the MTT test was performed. Cytotoxicity of biocomposites was assessed based on cell viability after 3 h of incubation (Figure 7). The percentage of viable cells was calculated relative to controls (cells incubated without biocomposite) whose viability was considered 100%. All the test nanocomposites decreased the viability of BJ and KERTr cells, but unmodified alginate film can be considered non-toxic as cell viability is above 80%. After incubation of cells with Alg, BJ cell viability was around 85% and KERTr around 90%. The Alg@(Ti-O-Ti)_n film also showed low toxicity in consistency with the literature. Kecelil et al. [22] showed that titanium oxide did not cause a large decrease in the viability of fibroblasts, the viability of fibroblasts incubated with TiO₂ was comparable to the control. The most toxic composites to fibroblasts were Alg@(V-O-V)_n and Alg@(Fe-O-Fe)_n, reducing the cells viability to ~20% (Figure 7a). For keratinocytes, zinc-containing composites were the most toxic, with Alg@ZnO(Cl)-5:1 recording only 24% viability and 27% for Alg@ZnO-10:1 (Figure 7b). The obtained results showed indeed that the cytotoxicity of the films is caused by the presence of metal oxides and varies depending on their type.

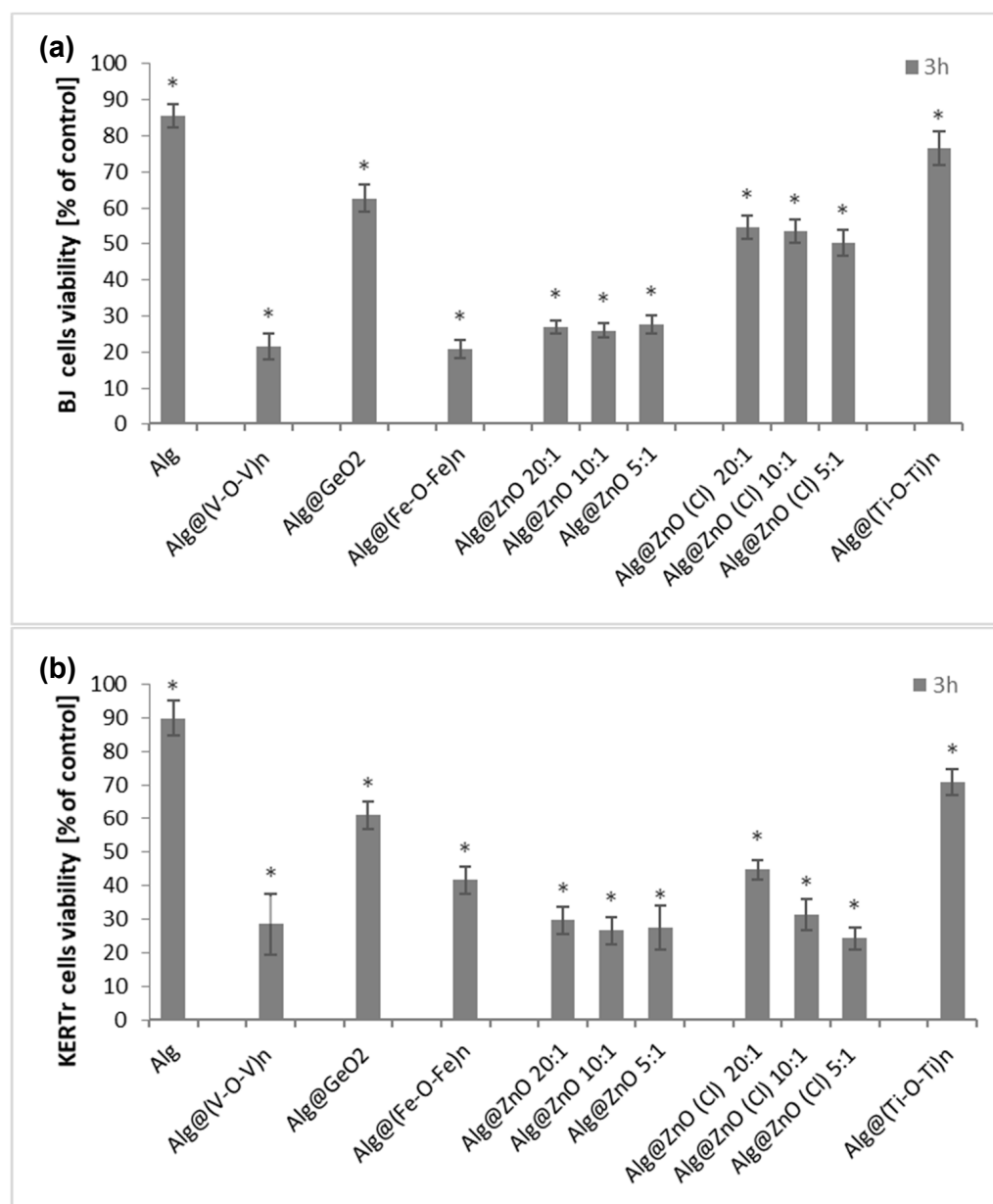


Figure 7. Viability of BJ (a) and KERTr (b) cells treated with alginate composites for 3 h. All changes are statistically significant compared with the control ($n = 6$. * $p < 0.05$).

These results are not surprising given the well-established toxicity of metal oxide nanoparticles, which are mainly attributed to the adsorption of protein on their highly-reactive surface. The adsorption capacity of metal oxide nanoparticles is an important factor in the in-vitro cytotoxicity assessment for low toxicity materials [23–25]. Besides, it has been also mentioned that some metal oxide nanoparticles act as a reservoir to release soluble substances that possibly induce severe mitochondrial dysfunction and induction of intracellular ROS [24]. Given that alginate-metal oxide films behave by themselves as precursors for soluble nanoparticles, this could explain the reduced viability noticed with these films.

2.5. ROS Generation

For the determination of the role of reactive oxygen species (ROS) in the cytotoxic activity of alginate biocomposites, BJ and KERTr cells were incubated with the tested materials for 3 h. The results were referenced to a 100% control. Alginate films did not

induce ROS, but alginate-metal oxide films slightly induced oxidative stress, leading to an increase in the number of intracellular reactive oxygen species (Figure 8). The level of ROS was the highest for both cell lines for Alg@(V-O-V)_n-1:1 and was about 110% for BJ and 135% for KERTr. For composites Alg@ZnO-5:1, Alg@ZnO (Cl)-5:1 and Alg@(Ti-O-Ti)_n-1:1 ROS level in fibroblasts was in the range of 105–107%, while Alg@(Fe-O-Fe)_n-1:1, Alg@ZnO(Cl)-20:1, Alg@ZnO(Cl)-10:1 did not generate ROS. Their level was lower or the same as in the control. However, the level of reactive oxygen species in keratinocytes after incubation with the modified films was in the range of 105–135%. Only Alg@(Ti-O-Ti)_n-1:1 did not contribute to the increase in ROS levels.

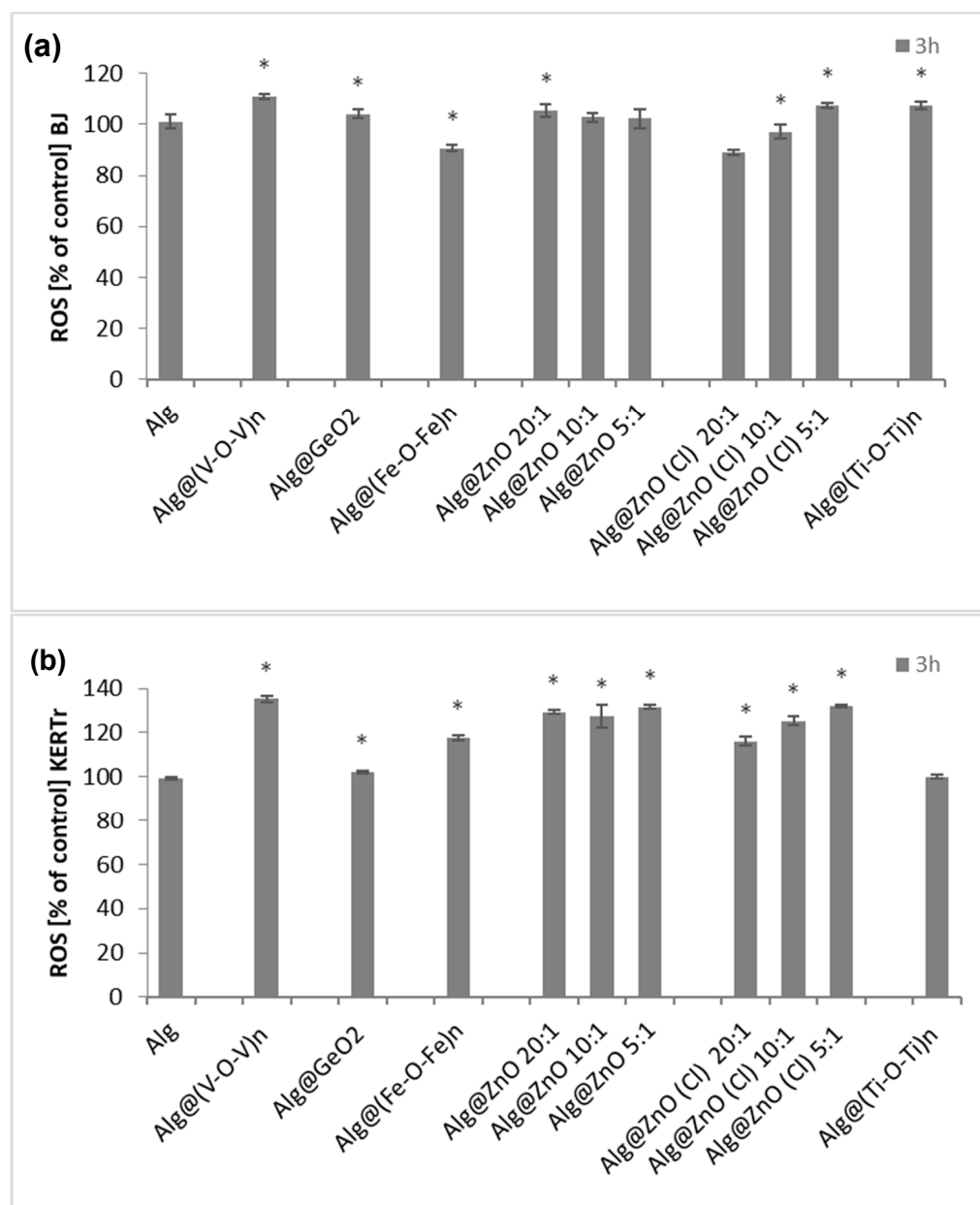


Figure 8. Percent of reactive oxygen species in BJ (a) and KERTr (b) cells incubated by 3 h with alginate composites. ($n = 6$, * $p < 0.05$).

It is well known that metal oxide nanoparticles induce oxidative stress in culture cells [26]. In A549 cells, remarkable increase of the intracellular ROS level was induced by ZnO and ZnO-S exposure [27]. Moreover, internalized nanoparticles produce ROS directly and indirectly via mitochondrial dysfunction [26]. However, ROS generated by

nanoparticles metal oxides play signaling and regulatory roles (antiseptic role in wound healing and wound-to-leucocyte signaling) in tissue engineering [28–30]. Metal oxide nanoparticles show indeed good potential for therapy of different diseases and pathogen control. Aside from the important biological functions of ROS such as cell proliferation, migration, signalization, wound healing and so forth, the generated reactive species could have a detrimental effect above a certain amount by producing an inflammatory response and generating oxidative stress and eventual apoptosis of normal cells [31].

2.6. Assessment of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

The method using the JC-1 probe allows to assess the proapoptotic activity of alginate biomaterials modified with metal oxides, associated with the change of transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$). Our studies have shown that most biocomposites exhibit low proapoptotic capacity (Figure 9). Incubation of BJ cells with alginate films caused slight depolarization or hyperpolarization of the mitochondrial membrane (Figure 9a).

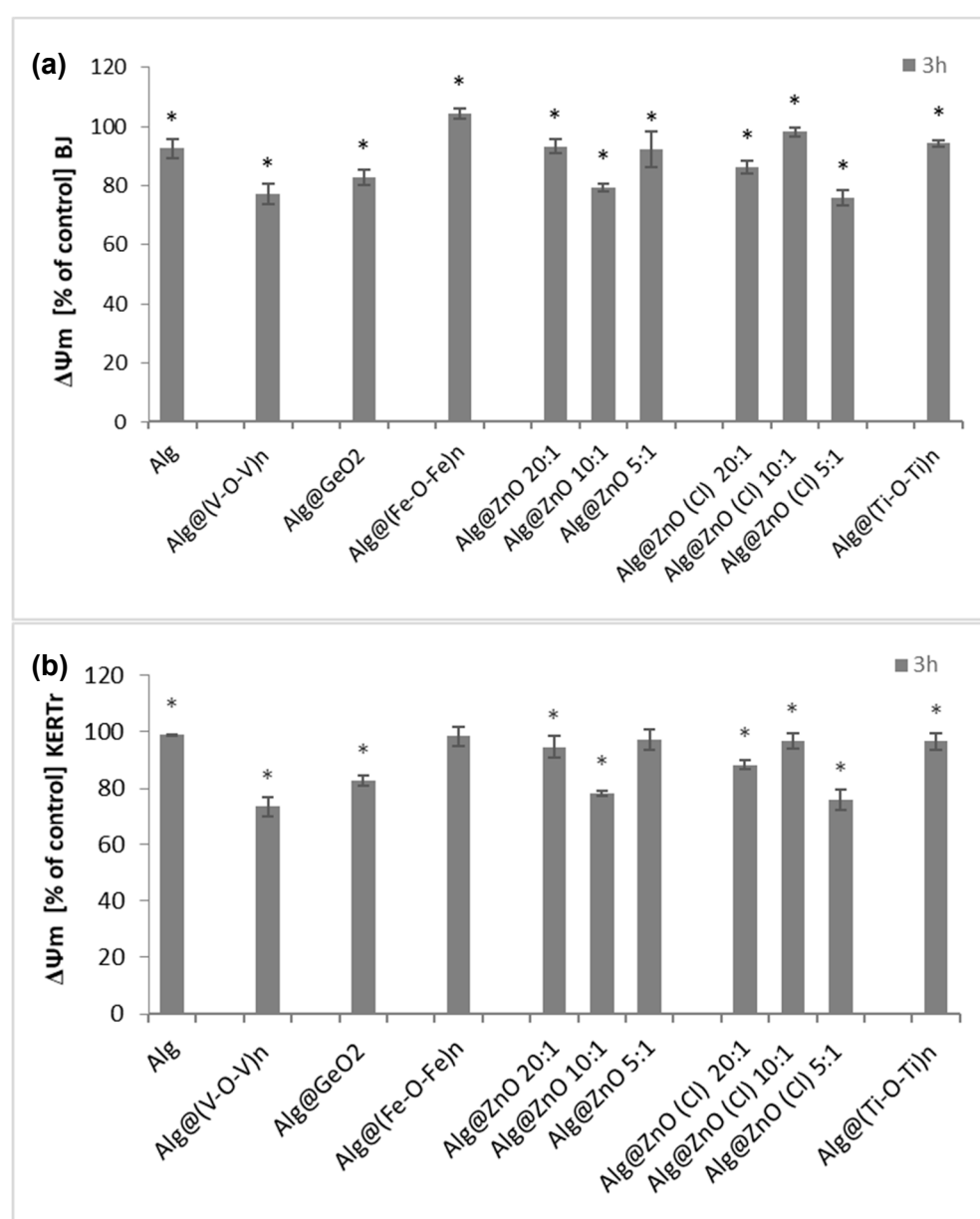


Figure 9. Changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) after incubation (3 h) with alginate composites in (a) BJ and (b) KERTr cells ($n = 6$, * $p < 0.05$).

The largest decrease in $\Delta\Psi_m$ was observed for Alg@ZnO(Cl)-5:1, Alg@(V-O-V)_n or Alg@ZnO-10:1, while there was an increase for Alg@(Fe-O-Fe)_n. Similar results can be observed in the case of KERTr keratinocytes incubated for 3 h with biocomposites. The greatest decrease in mitochondrial potential is seen in cells incubated with Alg@ZnO-10:1, Alg@ZnO(Cl)-5:1 and Alg@(V-O-V)_n. The remaining composites did not cause significant changes in potential and remained at the control level. These studies suggest that it is the type of metal oxide modifying the alginate composite that influences the changes in the mitochondrial potential. Previous studies have demonstrated that alginate does not cause changes in mitochondrial activity in fibroblasts (NIH 3T3) [32,33] while other works have gained insight into the role of zinc oxide nanoparticles for the reduction of mitochondrial membrane potential [34]. A substantial decrease in mitochondrial potential was also associated to the presence of vanadium oxide, which consolidate the results obtained herein with Alg@(V-O-V)_n [35–39].

2.7. Genotoxicity (Comet Assay)

An important aspect of testing the toxicity of any material intended to use in wound healing is the determination of their genotoxicity. The influence of all types of composites on the DNA of skin cells is an extremely important stage in in vitro research. Comet assay identifies single-stranded and double-stranded DNA breaks as well as any chemical and enzymatic modifications that can turn into DNA breaks or chromatids. The results presented in Figure 10 show the comet tail length as a percentage of the level of damage. After 3 h of incubation, the percentage of the tail for BJ and KERTr amounted to a maximum of 10–15%. For fibroblasts the most genotoxic nanocomposites were Alg@ZnO(Cl)-20:1, Alg@ZnO-20:1, Alg@ZnO-10:1, while Alg@(Fe-O-Fe)_n can be ranked as slightly less toxic. For keratinocytes the strongest DNA damaging effect was noticed for Alg@(Fe-O-Fe)_n, Alg@ZnO-20:1, Alg@ZnO-10:1. Indeed, the entrapment of iron oxide and zinc oxide instead of the alginate films induces a significant damage in DNA, whereas no damage can be associated to the use of native alginate Alg, as the tail length percentage was very low, about 4% for fibroblasts and 2% for keratinocytes. A critical survey of the literature shows the genotoxicity of titanium dioxide, zinc oxide, iron oxide and most of them occur through DNA oxidation by ROS and DNA strand breaks [40–47].

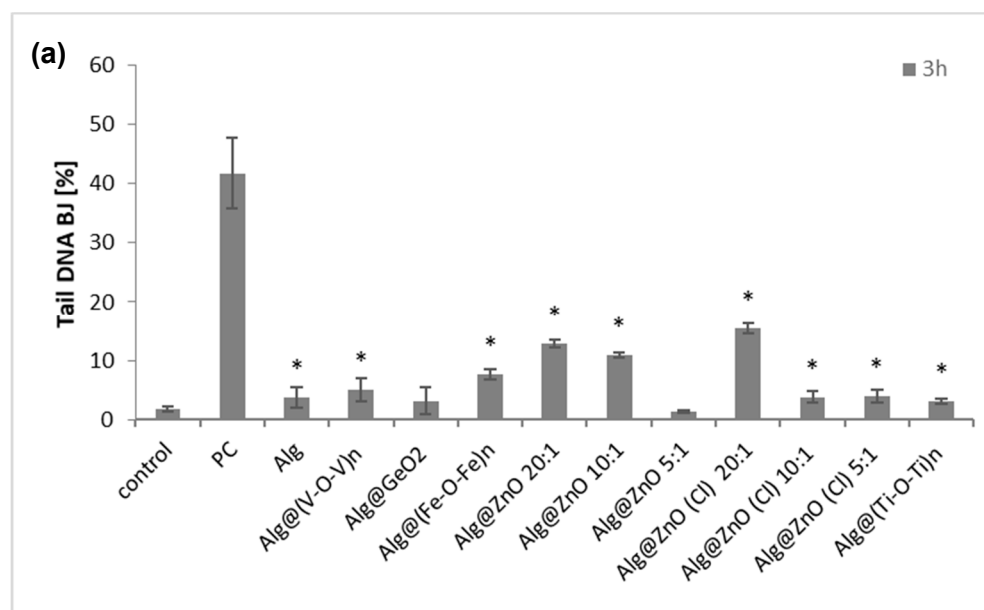


Figure 10. Cont.

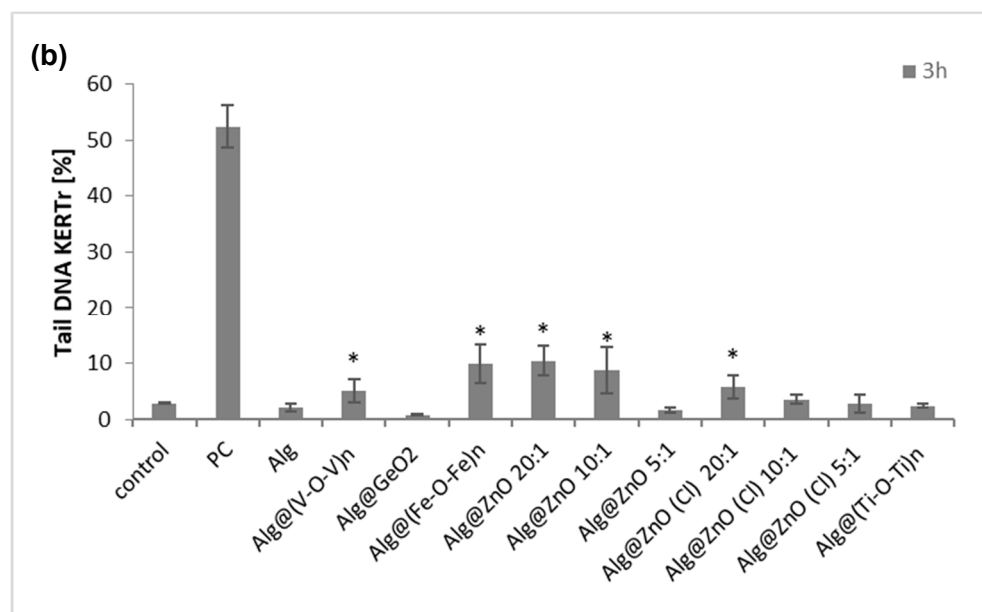


Figure 10. The genotoxicity of alginate composites to BJ cells (a) and KERTr cells (b) incubated for 3 h (PC- positive control; cells treated with H₂O₂), $n = 6$. * $p < 0.05$.

2.8. Migration Cells Fibroblasts and Keratinocytes

The skin cell migration process plays an important role in closing a wound and rebuilding damaged tissue. To assess the influence of alginate nanocomposites on the migration process of BJ and KERTr cells, we have selected films displaying lowest toxicity against the cells. We noticed that some of the tested composites increased the migration of both fibroblasts and keratinocytes after 3 h of incubation (Figure 11). Alginate alone (Alg) increased the migration of both type of cells. Alg@(Ti-O-Ti)_n had the greatest impact on the stimulation of the migration of fibroblasts and keratinocytes, for which the migration level was about 140% for BJ and about 170% for KERTr. Alg@GeO₂ composite also activated the migration of fibroblasts, but slightly reduced the migration of keratinocytes. On the other hand, all selected alginates composites containing zinc oxide (Alg@ZnO(Cl)) caused a reduction in cell migration compared to the control, which might be due to the toxicity of Alg@ZnO(Cl). To summarize, Alg, Alg@(Ti-O-Ti)_n and Alg@GeO₂ stimulate the migration of skin cells, which may potentially affect faster wound healing. These results complement those previously reported in the literature on the positive effect of alginate-based materials for cell migration and explain the extensive use of alginate derivatives in tissue engineering [48–52].

2.9. Prothrombin Time (PT), Thrombin Time (TT) and Amidolytic Activity of Thrombin

To determine the effects of the examined composites on the hemostatic properties of blood plasma, two types of blood clotting tests, i.e., the prothrombin time (PT) and the thrombin time (TT), were used. The PT parameter reflects the tissue factor-induced activation of the blood plasma coagulation cascade, and provides information on functionality of the extrinsic pathway of coagulation and thrombin generation. Figure 12a shows that the prothrombin time (PT) was slightly reduced in plasma containing the functionalized alginate films compared to the control. The PT for control was 15.6 s. The shortest time was obtained after incubation with Alg@ZnO-20:1 and it was 12.2 s. The weakest effect on reducing the clotting time was observed for Alg@(Fe-O-Fe)_n-1:1 and was equal to 14 s. Measurements of the prothrombin time demonstrated indeed that alginate-based nanocomposites shortened this clotting time, i.e., increased the activation of prothrombin and generation of the thrombin enzyme.

The thrombin time corresponds to the last step of blood clotting, during which fibrinogen is transformed into fibrin by thrombin. Surprisingly, in the TT test, the anti-coagulant

effects was found. Figure 12b. shows that the thrombin times were prolonged in plasma incubated with alginate films, when compared to the control. Incubation of plasma with alginate films had no protective effect on plasma clotting ability. For the control, the thrombin time was about 18 s. Alg@(Fe-O-Fe)_n-1:1 had the strongest effect on extending of thrombin time—it was about 36 s, being twice as long as in control. Films: Alg@GeO₂-1:1 and Alg@(Ti-O-Ti)_n-1:1 did not show procoagulant abilities.

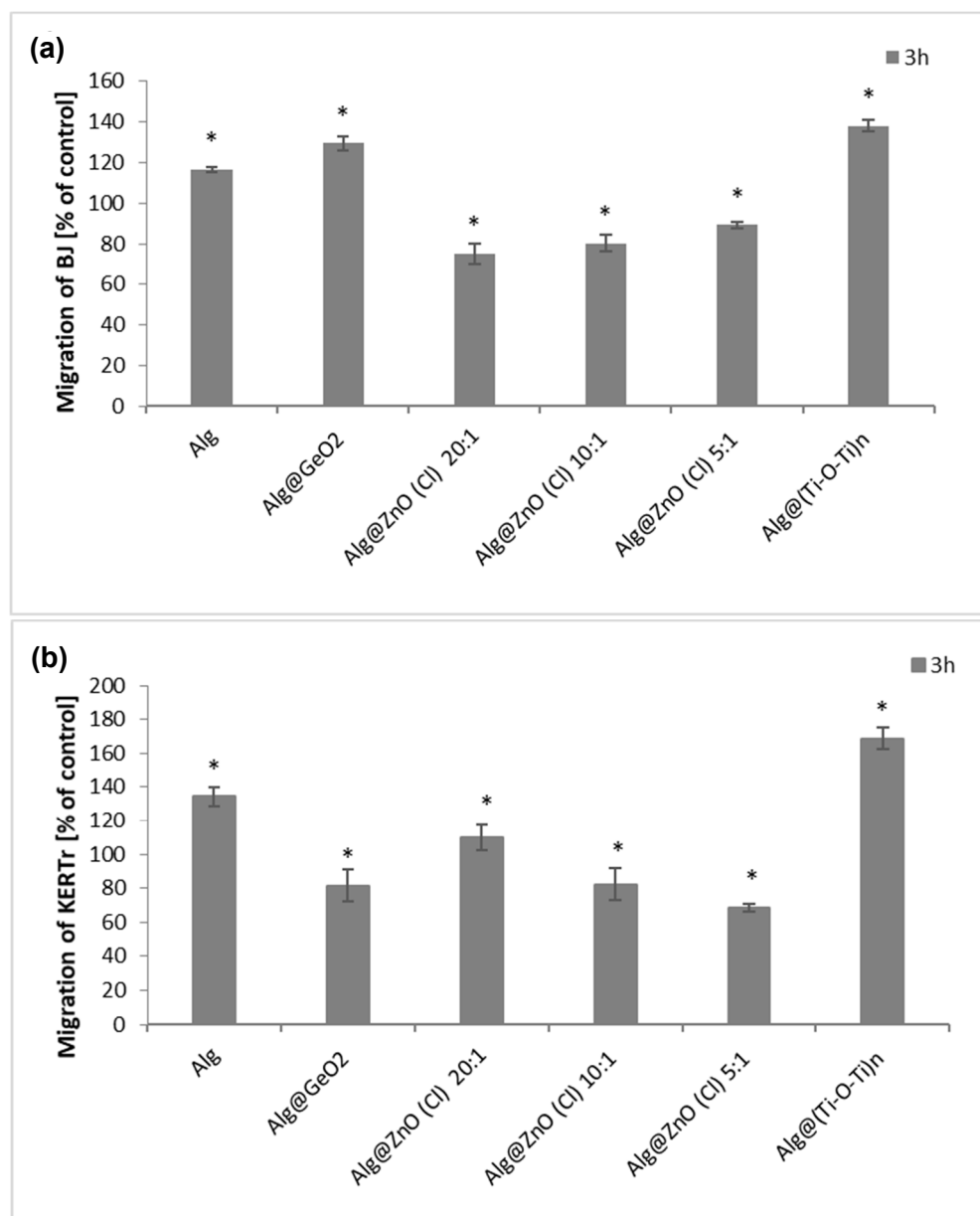


Figure 11. The migration of (a) BJ, (b) KERTr cells incubated for 3 h with modified alginate biocomposites ($n = 6$. * $p < 0.05$).

Our findings indicated modulatory effects of the examined alginate nanocomposites and their diverging actions at different steps on the blood plasma coagulation cascade. While the coagulation cascade activation and propagation were stimulated by the examined alginate nanocomposites (acc. to PT results), at the level of the active enzyme (thrombin), these substances acted rather as inhibitors of coagulation (TT results). Thus, to determine whether the examined composites were able to inhibit the thrombin activity, additional experiments devoted to their influence on this enzyme were also performed. Results from the amidolytic activity of thrombin exposed to the alginate composites evidently demonstrated

their thrombin-inhibitory effects (Figure 12c). The most effective thrombin inhibitors were Alg@ZnO-10:1, Alg@ZnO-5:1 and Alg@ZnO(Cl)-10:1, reducing the hydrolytic activity of this enzyme by about 80%. Mechanistically speaking, the blood coagulation process is a complex cascade of enzymatic reactions associated with an extensive network of other interactions, including cofactor properties of the coagulation surface, allosteric modulation of enzyme activities as well as both the positive and negative feedback effects [53]. Thrombin enzyme is susceptible to regulation by different factors, including ions, allosteric modulators and direct or indirect inhibitors [54]. Its structure contains two anion-binding exosites (I and II), responsible for interactions with negatively charged regions on cofactors and other molecular targets for thrombin [55]. Herein, measurements of the PT and the thrombin amidolytic activity assay demonstrated that the alginate nanocomposites may act as thrombin inhibitors. Considering the negatively charged surface of alginate nanocomposites, their interactions with the exosites I and II seem to be the most likely mechanisms of allosteric regulation of this enzyme by the presence of these materials and their inhibitory action on thrombin.

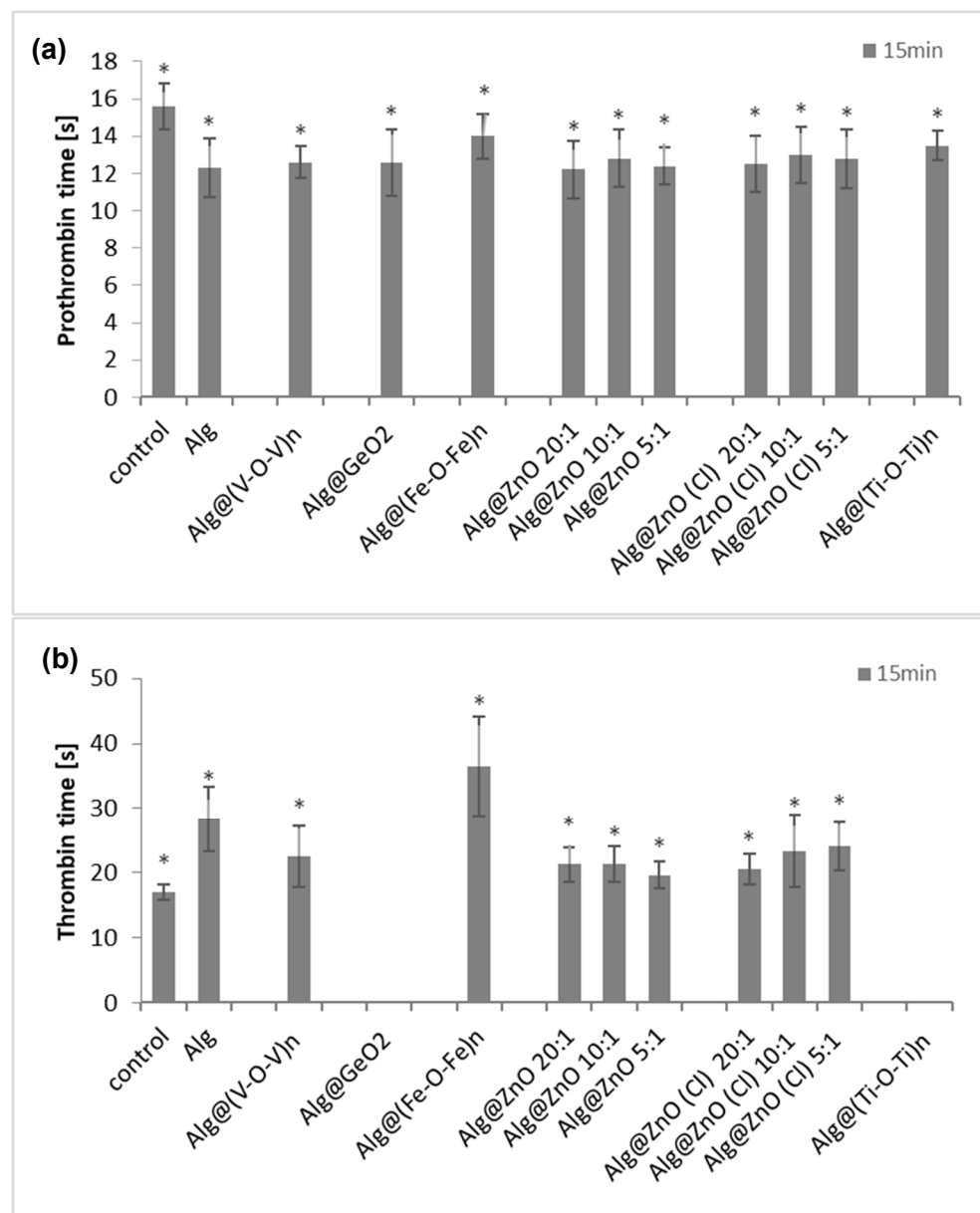


Figure 12. Cont.

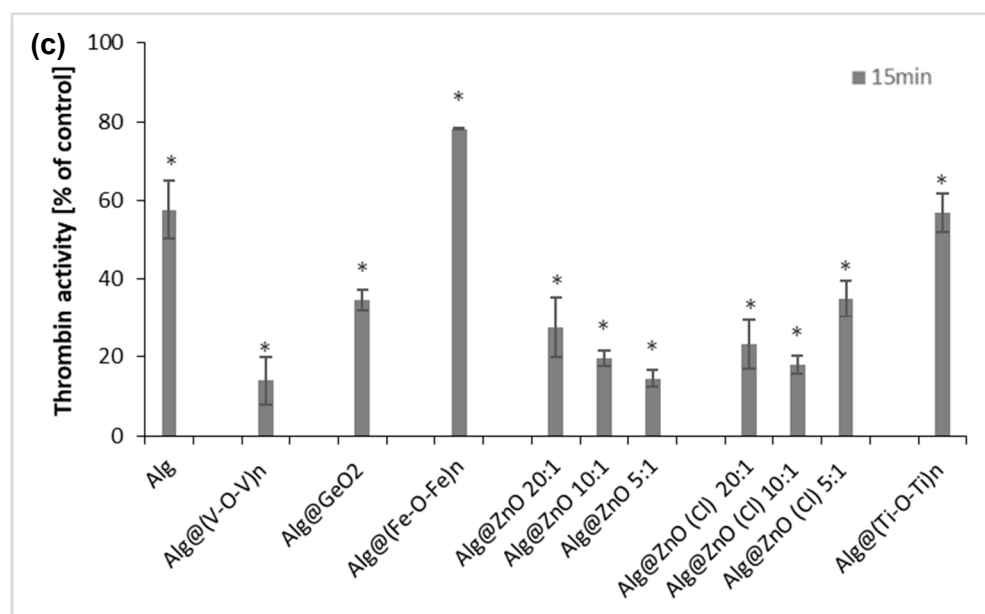


Figure 12. Effects of the examined alginate composites on human blood plasma clotting parameters: (a) Prothrombin time in plasma incubated with alginate composites. All changes are statistically significant compared with the control (untreated plasma) ($n = 8$, $* p < 0.05$); (b) Thrombin time in plasma incubated with alginate composites. All changes are statistically significant compared with the control (untreated plasma) ($n = 8$, $* p < 0.05$); (c) Amidolytic activity of thrombin incubated with alginate composites. All changes are statistically significant compared with the control ($n = 4$, $* p < 0.05$). In the thrombin amidolytic assay, the activity of control (untreated enzyme) was assumed as 100%.

3. Materials and Methods

3.1. Chemical and Reagents

Titanium diisopropoxide bis (acetylacetonate) ($\text{Ti}(\text{acac})_2\text{O}i\text{Pr}_2$), Vanadium III acetylacetonate ($\text{V}(\text{acac})_3$), iron (III) acetylacetonate ($\text{Fe}(\text{acac})_3$), Zinc acetate ($\text{Zn}(\text{OAc})_2$), Zinc chloride (ZnCl_2), Germanium(IV) ethoxide ($\text{Ge}(\text{OEt})_4$), absolute ethanol, were obtained from Sigma Aldrich (Hamburg, Germany), and used without any further purification. Sodium alginate was supplied by Sigma Aldrich, and used as received.

3.2. Characterisation Techniques

Fourier transformed infrared spectra were obtained with a PerkinElmer Spectrum 100FT-IR spectrometer on neat samples (ATR FT-IR) (PerkinEmler, Shelton, CT, USA). X-ray powder diffraction (XRD) patterns were recorded on a D8 Advance Bruker AXS system (Karlsruhe, Germany) using $\text{Cu K}\alpha$ radiation with a step size of 0.02° in the 2θ range from 10° to 80° for WAXS (geometry: Bragg–Brentano, $\theta/2\theta$ mode). Scanning electronic microscopy (SEM) images were obtained using a JEOL JSM 6700F (SEMTECH Solution, North Billerica, MA, USA). Transmission electronic microscopy (TEM) images were obtained using JEOL (JEOL JEM2010, 200 Kv, Pleasanton, CA, USA) at an activation voltage of 200 kV. Thermogravimetric analyses (TGA) were obtained with a thermal analyzer instrument Q500 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) on the range $25\text{--}1000^\circ\text{C}$ at heating speed of $5^\circ\text{C}/\text{min}$.

3.3. Preparation of Alginate-Metal Oxide Films

A quantity of 0.05 g of sodium alginate powder (0.231 mmol of carboxylic acid sodium salt unit) was dissolved in 4 mL of deionized water and stirred for 1 h. Next, a selected ethanol solution of metal precursor [$\text{Ti}(\text{acac})_2\text{O}i\text{Pr}_2$, $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, ZnCl_2 , $\text{Ge}(\text{OEt})_4$ and $\text{Fe}(\text{acac})_3$] with different molar ratio with respect to COO^- unit of alginate, was added to the transparent solution. The mixture was stirred for additional 2 h at room temperature

until complete homogenization. The resulting solution was cast onto a clean petri dish at room temperature for 24 h until total evaporation of the solvent. Specific experimental conditions are given in Table S1a.

3.4. Materials for Biological Studies

Human fibroblast BJ (CRL-2522) and human keratinocyte CCD 1102 KERTr (CRL2310) cell line were purchased from American Type Culture Collection ATCC® (Manassas, VA, USA). Keratinocyte serum-free medium with added keratinocyte supplements, including bovine pituitary extract (BPE), human recombinant epidermal growth factor (EGF), fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), were purchased from Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-diphenyl)-2-tetrazolium bromide (MTT), 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA), potassium persulfate (di-potassium peroxodisulfate), phosphate buffered saline (PBS) tablets, fetal bovine serum, and trypsin were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Commercially available reagents for the determination of clotting times (Dia-PT and DiaPTT) were purchased from Diagon (Budapest, Hungary). The thrombin enzyme was provided by Biomed (Lublin, Poland) and 3 and Chromogenix S-2238® substrate (H-D-Phenylalanyl-L-pipecolyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride) by Diapharma (Beckett Ridge, OH, USA). Blood from healthy donors and fresh human blood plasma for hemostatic assays derived from buffy coats (from healthy volunteers) were obtained from the Regional Blood Donation and Blood Treatment Center in Lodz (Poland). Membrane culture inserts for 24-well plates, PET, and 8 µm pores to check cell migration were purchased from Biokom (Janki, Poland). All other chemicals used were of analytical grade, and solutions were prepared using water purified by the Mili-Q system.

3.5. Hemolysis Assay

The red blood cells (RBCs) were collected after centrifugation of whole blood at 3000 rpm (10 min, 4 °C), and purified by three cycles of washing with PBS (phosphate buffered saline; pH = 7.4). To study the effect of alginate composites on erythrocyte stability, red blood cells (RBCs) suspended in PBS to a final hematocrit (HTC) of 10% were treated with different modified alginate composites, in the form of squares with dimensions 0.5 cm × 0.5 cm for 1 or 3 h. Erythrocytes in PBS (without alginate composite) were used as a control. After incubation, samples were centrifuged (3000 rpm, 10 min) and the absorbance of supernatant was measured spectrophotometrically (Jasco V-650, Jasco International Co., Osaka, Japan) at 540 nm to calculate the percentage of hemolysis according to the following equation:

$$\% \text{ Hemolysis} = A_s / A_c \times 100\%$$

where:

A_s represents the absorbance of the sample

A_c represents the absorbance of the erythrocytes in water (100% of hemolysis).

3.6. The Adsorption of Hemoglobin (Hb)

The experiment was carried out to investigate whether alginate composites adsorb hemoglobin from the environment. Alginate squares with dimensions of 0.5 cm × 0.5 cm were added to hemoglobin solutions (0.1% v/v). Samples were incubated at 37 °C for 1 or 3 h. After this time, the samples were centrifuged, and the absorbance of hemoglobin was measured at a wavelength of 540 nm. The percentage of hemoglobin adsorption was calculated from the formula:

$$\text{Adsorption of Hb [\%]} = 100\% - (A_s / A_c \times 100\%)$$

where:

As is the absorbance of the sample containing the alginate composites
Ac is the absorbance of the control (hemoglobin without alginate composites).

3.7. Methemoglobin

The concentration of hemoglobin was measured by the Drabkin method. Absorption spectra of hemoglobin were obtained for the wavelengths ranging from 440 to 700 nm using a spectrophotometer (Jasco V-650, Jasco International Co., Osaka, Japan) connected to a computer. The percentage of met-Hb in the total Hb content, after incubation with composites (1 or 3 h), was calculated from the absorbance at 630 and 700 nm. Hemoglobin treated with potassium ferricyanide (100% metHb) was used as a positive control.

$$\% \text{ of met-Hb} = [(A_{630} - A_{700}) / (A_{630*} - A_{700*})] \times 100\%$$

where:

A₆₃₀—the absorbance of a control sample and sample with composites at 630 nm,
A₇₀₀—the absorbance of a control sample and sample with composites at 700 nm,
A_{630*}—the absorbance of a control sample and sample with composites treated with potassium ferricyanide—100% met-Hb at 630 nm,
A_{700*}—the absorbance of a control sample and sample with composites treated with potassium ferricyanide—100% met-Hb at 700 nm.

3.8. Cell Culture

BJ cells were grown as a monolayer in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% streptomycin. The cultures were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. KERTr cells were grown in Keratinocyte Serum Free Medium (Gibco 1705-042[®]) with added Keratinocytes Supplements (Gibco 3700-015[®]) including Bovine Pituitary Extract (BPE, Gibco 13028-014[®]) and human recombinant epidermal growth factor (EGF, Gibco 10450-013[®]) further supplemented with additional 30 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (EGF), was purchased from Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). The cultures were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. Both cell lines were split for subcultures every 2 days and were kept in log phase by regular passage according to the procedure described previously [56].

3.9. Cytotoxicity Assay

Cell viability was determined by the MTT assay after incubation (3 h) with alginate composites. In brief, BJ cells (5 × 10⁴ cells/well) and KERTr cells (5 × 10⁵ cells/well) were seeded in a 24-well plate and kept overnight in the incubator (37 °C, 5% CO₂). The next day, the medium was replaced with fresh medium and the alginate nanocomposite was added. After 63 h of incubation, cells were washed in PBS and incubated with 0.5 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) at 37 °C for 3 h. Then, the MTT was discarded carefully, and dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to solubilize the formazan crystals [57]. Finally, the absorbance was measured for each well at a wavelength of 570 nm using a Bio-Tek Synergy HT Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). All experiments were performed in six repetitions. Cell viability was calculated as the percent ratio of absorbance of the samples to the reference control, according to the formula:

$$\% \text{ Viability} = As / Ac \times 100\%$$

where: As is the absorbance of the sample and Ac is the absorbance of the control (untreated cells).

3.10. Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS)

To measure changes in the level of reactive oxygen species (ROS) in cells the H2DCFDA fluorescent probe (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) was used. H2DCFDA after deacetylation to DCFH2 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) is oxidized intracellularly emitting fluorescence 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). The fluorescence intensity increases linearly with an increase in the amount of reactive oxygen species in the cell [58]. BJ cells were seeded in black 96-well plates at 1.25×10^4 per well while KERTr cells at 2.5×10^4 per well. After 3 h of incubation with the materials, the medium was removed, and the cells were washed with PBS before 50 μ L 2 μ M H2DCFDA was added. The probe plate incubation time was 15 min. The solution was recovered, and 50 μ L of PBS was added per well. Samples were analyzed using a Fluoroscan Ascent FL microplate reader (BioTek, Synergy HTX multi-mode reader, Winooski, VT, USA) with an excitation wavelength of $\lambda_{ex} = 495$ and emission wavelength of $\lambda_{em} = 529$.

3.11. Assessment of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was estimated using fluorescent probe JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) [59]. Cells were seeded into black 96-well tissue culture plates with a transparent bottom (Greiner) at a density of 5×10^4 cells/well (BJ) or 5×10^5 cells/well (KERTr) in a 100 μ L culture medium and allowed to adhere overnight, and then treated with alginate composites for 3 h. Finally, the cells were preincubated with 5 μ M JC-1 in CO2 incubator at 37 °C for 30 min. The fluorescence was measured on a Bio-Tek Synergy HT Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Results are shown as a ratio of fluorescence of dimers (measured at 530/590 nm) to monomers (measured at 485/538 nm). All compounds were tested in six duplicates and $\Delta\Psi_m$ was calculated from the formula:

$$\Delta\Psi_m = F_d/F_m$$

where:

$\Delta\Psi_m$ —mitochondrial transmembrane potential directly proportional to the fluorescence coefficient,

F_d —dimer fluorescence,

F_m —monomer fluorescence.

3.12. Genotoxicity

The comet assay was performed at pH > 13 essentially according to the published procedure [60]. The experiment assay was modified as described by Blasiak and Kowalik [61]. A freshly prepared suspension of the cells (5×10^4 cells/mL) in 0.75% LMP agarose dissolved in PBS was spread onto microscope slides precoated with 0.5% NMP agarose. The cells were lysed for 1 h at 4 °C in a buffer consisting of 2.5-M NaCl, 100-mM EDTA, 1% Triton X-100, 10-mM Tris, and pH 10. After the lysis, the slides were placed in an electrophoretic buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min to allow the unwinding of DNA. Electrophoresis was conducted in the same buffer at temperature of 4 °C for 20 min at an electric field strength of 0.73 V/cm (28 mA). The slides were then washed in water, drained and stained with 2-mg/ml DAPI, and covered with cover slips. To prevent additional DNA damage, all the steps described above were conducted under dimmed light or in the dark. Each experiment in the alkaline version of the comet assay included a positive control, which were both lines cells incubated with H₂O₂ at 20 mM for 10 min at 4 °C. The comets were observed at 200 magnifications in an Eclipse fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) attached to COHU 4910 video camera (Cohu, San Diego, CA, USA) equipped with a UV-1 filter block (an excitation filter of 359 nm and a barrier filter of 461 nm) and connected to a personal computer-based image analysis system LuciaComet v. 6.0 (Laboratory Imaging, Praha, Czech Republic). Fifty images were randomly selected from each sample.

3.13. Cell Migration

BJ and KERTr cells migration was assessed according to the procedure described previously [56]. Both cell lines were starved overnight in serum-free medium with 0.2% bovine serum albumin (BSA). Cells were prepared in a concentration of 2.5×10^5 cells/mL. ThinCert™ cell culture inserts were placed in a multiwell cell culture plate, thereby forming two compartments: the upper compartment of the insert and the lower compartment of the plate well. Both compartments formed the migration chamber, separated by the porous PET membrane. The plate with cells with alginate composites was incubated for 24 h in an incubator at 37 °C and 5% CO₂ in air. Finally, the viability of the migrating cells was determined using the MTT test and measured spectrophotometrically at 570 nm.

3.14. Measurements of Prothrombin Time (PT)

Prothrombin time (PT) was determined coagulometrically using an Optical Coagulometer K-3002 (Kselmed, Grudziadz, Poland), according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly, after 15 min of pre-incubation with alginate composites, the human plasma (50 µL) was incubated for 2 min at 37 °C in the analyzer thermoblock and then, directly before measurement, 100 µL of Dia-PT liquid (commercial preparation: Diagon, Budapest, Hungary) was added.

3.15. Measurements of Thrombin Time (TT)

Thrombin time (TT) was determined coagulometrically using an Optical Coagulometer K-3002 (Kselmed, Grudziadz, Poland), according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly, after 15 min of pre-incubation with alginate nanocomposites, the human plasma (50 µL) was incubated for 2 min at 37 °C and then, directly before measurement, 100 µL of thrombin (Biomed, Lublin, Poland) was added (at the final concentration of 5 U/mL).

3.16. Amidolytic Activity of Thrombin

Thrombin (Biomed, Lublin, Poland; 0.75 U/ml, in the tris-buffered saline/TBS, pH 7.4) was pre-incubated with alginate nanocomposites for 15 min, at 37 °C. The reaction mixture contained 40 µL of 3 mM Chromogenix S-2238® substrate (H-D-Phenylalanyl-L-pipecolylLarginine-p-nitroaniline dihydrochloride; Diapharma, Beckett Ridge, OH, USA) and 280 µL of the thrombin solution, i.e., the control/untreated thrombin or enzyme pre-incubated with the examined alginate composites. Measurements were executed in 96-well microplates, using a kinetic mode of the BMG Labtech Spectrostar Nano microplate spectrophotometer. Absorbance changes were recorded every 15 s for 10 min, at 415 nm. The hydrolytic activity of thrombin in all samples was estimated based on the maximal velocity of the reaction (V_{max}).

3.17. Statistical Analysis

Data are presented as the mean ± SD from minimum of 3 sets of measurements. Statistical differences between the control and treatment groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey' analysis. $p < 0.05$ was taken as statistically significant.

4. Conclusions

Alginate is known both in the literature and even commercially as a promising scaffold for wound dressings. Surprisingly, despite the interest of downsizing metal oxide for biological purposes, few studies have focused on merging alginate and glassy-like metal oxide phase to generate homogenous nanocomposite films. Therefore, we have attempted to embed glassy-like metal oxide inside of the corresponding alginate films and investigated the possible use of the final composites in wound healing. Different films were prepared including alginate-titanium dioxide, alginate-germanium oxide, alginate-iron oxide, alginate-vanadium oxide and alginate-zinc oxide. We have moreover succeeded in varying the amount of the metal oxide grown inside without compromising the flexibility of

the films or their transparency. We have also shown that dissolution of these films provides water-soluble nanoparticles and the alginate shell prevents them from sedimentation.

Among the analyzed alginate composites modified with metal oxides, the most detrimental was the one functionalized by vanadium and iron oxide species. The most promising was the alginate-titanium oxide composite (Alg@(Ti-O-Ti)_n), which showed low cytotoxicity and genotoxicity towards fibroblasts and keratinocytes. It did not cause a significant decrease in the cellular potential and generation of reactive oxygen species. Moreover, it showed the greatest stimulating effect on cell migration in both cell lines, which plays an important role in the healing process. Studies on human blood erythrocytes proved that Alg@(Ti-O-Ti)_n does not show significant hemolytic properties. It also acts as a procoagulant during the prothrombin time. The obtained results complement and extend the current state of knowledge on alginate materials in wound dressings.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23105585/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.K., K.M., and A.E.K.; methodology, M.K., K.M. and A.E.K.; software, M.K. and K.M.; validation, M.K., K.M. and A.E.K.; formal analysis, M.K. and K.M.; investigation, M.K., N.H. and N.K.; resources, K.M. and A.E.K.; data curation, M.K., K.M. and A.E.K.; writing—original draft preparation, M.K.; writing—review and editing, M.K., K.M., J.K.-C., A.E.K., N.H., N.K. and M.B.; visualization, M.K., N.H. and N.K.; supervision, K.M. and A.E.K.; project administration, K.M. and A.E.K.; funding acquisition, K.M., M.B. and A.E.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: A.E.K. thanks UEMF and Académie Hassan II des Sciences et Technique for funding the Nano-Bio-Mat project.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Su, L.; Feng, Y.; Wei, K.; Xu, X.; Liu, R.; Chen, G. Carbohydrate-Based Macromolecular Biomaterials. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 10950–11029. [\[CrossRef\]](#)
2. Gandini, A.; Lacerda, T.M.; Carvalho, A.J.F.; Trovatti, E. Progress of Polymers from Renewable Resources: Furans, Vegetable Oils, and Polysaccharides. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1637–1669. [\[CrossRef\]](#)
3. Wrońska, N.; Anouar, A.; El Achaby, M.; Zawadzka, K.; Kędzierska, M.; Miłowska, K.; Katir, N.; Draoui, K.; Różalska, S.; Piwoński, I.; et al. Chitosan-Functionalized Graphene Nanocomposite Films: Interfacial Interplay and Biological Activity. *Materials* **2020**, *13*, 998. [\[CrossRef\]](#)
4. Frindy, S.; Primo, A.; Qaiss, A.; El Kacem Bouhfid, R.; Lahcini, M.; Garcia, H.; Bousmina, M.; El Kadib, A. Insightful understanding of the role of clay topology on the stability of biomimetic hybrid chitosan-clay thin films and CO₂-dried porous aerogel microspheres. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *146*, 353–361. [\[CrossRef\]](#)
5. Blilid, S.; Kędzierska, M.; Miłowska, K.; Wrońska, N.; El Achaby, M.; Katir, N.; Belamie, E.; Alonso, B.; Lisowska, K.; Lahcini, M.; et al. Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 18354–18365. [\[CrossRef\]](#)
6. El Kadib, A. Green and functional aerogels by macromolecular and textural engineering of chitosan microspheres. *Chem. Rec.* **2020**, *20*, 753–772. [\[CrossRef\]](#)
7. El Kadib, A.; Bousmina, M.; Brunel, D. Recent Progress in Chitosan Bio-Based Soft Nanomaterials. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 308–331. [\[CrossRef\]](#)
8. Ates, B.; Koytepe, S.; Ulu, A.; Gurses, C.; Thakur, V.K. Chemistry, Structures, and Advanced Applications of Nanocomposites from Biorenewable Resources. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 9304–9362. [\[CrossRef\]](#)
9. Teng, K.; An, Q.; Chen, Y.; Zhang, Y.; Zhao, Y. Recent Development of Alginate-Based Materials and Their Versatile Functions in Biomedicine, Flexible Electronics, and Environmental Uses. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*, 1302–1337. [\[CrossRef\]](#)
10. Agulhon, P.; Robitzer, M.; David, L.; Quignard, F. Structural Regime Identification in Ionotropic Alginate Gels: Influence of the Cation Nature and Alginate Structure. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 215–220. [\[CrossRef\]](#)

11. Ruppert, A.M.; Agulhon, P.; Grams, J.; Wachala, M.; Wojciechowska, J.; Świerczyński, D.; Cacciaguerra, T.; Tanchoux, N.; Quignard, F. Synthesis of TiO₂–ZrO₂ Mixed Oxides via the Alginate Route: Application in the Ru Catalytic Hydrogenation of Levulinic Acid to Gamma-Valerolactone. *Energies* **2019**, *12*, 4706. [\[CrossRef\]](#)
12. Agulhon, P.; Robitzer, M.; Habas, J.-P. Quignard, F. Influence of both cation and alginate nature on the rheological behavior of transition metal alginate gels. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *112*, 525–531. [\[CrossRef\]](#)
13. Milowska, K.; Rybczynska, A.; Mosiolek, J.; Durdyn, J.; Szewczyk, E.M.; Katir, N.; Brahmi, Y.; Majoral, J.-P.; Bousmina, M.; Bryszewska, M.; et al. Biological Activity of Mesoporous Dendrimer-Coated Titanium Dioxide: Insight on the Role of the Surface-Interface Composition and the Framework Crystallinity. *ACS Appl. Mater. Interface* **2015**, *7*, 19994–20003. [\[CrossRef\]](#)
14. Delumeau, L.-V.; Asgarimoghaddam, H.; Alkie, T.; Jones, A.J.B.; Lum, S.; Mistry, K.; Aucoin, M.G.; DeWitte-Orr, S.; Musselman, K.P. Effectiveness of antiviral metal and metal oxide thin-film coatings against human coronavirus 229E. *APL Mater.* **2021**, *9*, 111114. [\[CrossRef\]](#)
15. Hammi, N.; Wrońska, N.; Katir, N.; Lisowska, K.; Marcotte, N.; Cacciaguerra, T.; Bryszewska, M.; El Kadib, A. Supramolecular Chemistry-Driven Preparation of Nanostructured, Transformable, and Biologically Active Chitosan-Clustered Single, Binary, and Ternary Metal Oxide Bioplastics. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 61–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Guari, Y.; Larionova, J.; Molvinger, K.; Folch, B.; Guérin, C. Magnetic water-soluble cyano-bridged metal coordination nanoparticles. *Chem. Commun.* **2006**, *24*, 2613–2615. [\[CrossRef\]](#)
17. Anicic, N.; Vukomanovic, M.; Suvorov, D. Design of a multifunctional vanadium pentoxide/polymer biocomposite for implant-coating applications. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 38647–38658. [\[CrossRef\]](#)
18. Aguirre, M.V.; Juaristi, J.A.; Alvarez, M.A.; Brandan, N.C. Characteristics of in vivo murine erythropoietic response to sodium orthovanadate. *Chem.-Biol. Interact.* **2005**, *156*, 55–68. [\[CrossRef\]](#)
19. Hogan, G.R. Peripheral erythrocyte levels, hemolysis and three vanadium compounds. *Experientia* **1990**, *46*, 444–446. [\[CrossRef\]](#)
20. Shirsekar, P.P.; Kanhe, N.; Mathe, V.L.; Lahir, Y.K.; Dongre, P.M. Interaction of Zinc oxides nanoparticles with human red blood cells. *Bionano Front.* **2016**, *9*, 99–104.
21. Khan, M.; Husain, A.; Ahmad, M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Rep.* **2015**, *2*, 765–774. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Keceli, S.A.; Alaynali, H.A. Study on the Evaluation of the Cytotoxicity of Al₂O₃, Nb₂O₅, Ta₂O₅, TiO₂ and ZrO₂. *Turk. J. Eng. Environ. Sci.* **2004**, *28*, 49–54.
23. Horie, M.; Nishio, K.; Fujita, K.; Endoh, S.; Miyauchi, A.; Saito, Y.; Yoshida, Y. Protein Adsorption of Ultrafine Metal Oxide and Its Influence on Cytotoxicity toward Cultured Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 543–553. [\[CrossRef\]](#)
24. Horie, M.; Fujita, K.; Kato, H.; Endoh, S.; Nishio, K.; Komaba, L.K.; Iwahashi, H. Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: Metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics* **2012**, *4*, 350. [\[CrossRef\]](#)
25. García-Hevia, L.; Valiente, R.; Martín-Rodríguez, R.; Renero-Lecuna, C.; González, J.; Rodríguez-Fernández, L.; Aguado, F.; Villegas, J.C.; Fanarraga, M.L. Nano-ZnO lead to tubulin macro tube assembly and actin-bundling triggering, cytoskeletal catastrophe and cell necrosis. *Nanoscale* **2016**, *8*, 10963–10973. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Horie, M.; Nishio, K.; Fujita, K.; Kato, H.; Endoh, S.; Suzuki, M.; Nakamura, A.; Miyauchi, A.; Kinugasa, S.; Yamamoto, K.; et al. Cellular responses by stable and uniform ultrafine titanium dioxide particles in culture-medium dispersions when secondary particle size was 100 nm or less. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 1629–1638. [\[CrossRef\]](#)
27. Yu, S.; Zhang, H.; Zhang, S.; Zhong, M.; Fan, H. Ferrite Nanoparticles-Based Reactive Oxygen Species-Mediated Cancer Therapy. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 651053. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Labouta, H.I.; Schneider, M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: Current status and critical review. *Nanomedicine* **2013**, *9*, 39–54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Shokri, N.; Javar, H.A. Comparison of calcium phosphate and zinc oxide nanoparticles as dermal penetration enhancers for albumin. *Indian J. Pharm. Sci.* **2015**, *77*, 694–704. [\[CrossRef\]](#)
30. Niethammer, P.; Grabher, C.; Look, A.T.; Mitchison, T.J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* **2009**, *459*, 996–999. [\[CrossRef\]](#)
31. Rizk, M.Z.; Ali, S.A.; Hamed, M.A.; El-Rigal, N.S.; Alya, H.F.; Sala, H.H. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles: Effect of dose and time on biochemical disturbance, oxidative stress and genotoxicity in mice. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *90*, 466–472. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Hunt, N.C.; Shelton, R.M.; Grover, L.M. Reversible mitotic and metabolic inhibition following the encapsulation of fibroblasts in alginate hydrogels. *Biomaterials* **2009**, *32*, 6435–6443. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Grigore, A.; Sarker, B.; Fabry, B.; Boccaccini, A.R.; Detsch, R. Behavior of Encapsulated MG-63 Cells in RGD and Gelatine-Modified Alginate Hydrogels. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20*, 15–16, 2140–2150. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. George, S.; Pokhrel, S.; Xia, T.; Gilbert, B.; Ji, Z.; Schowalter, M.; Rosenauer, A.; Damoiseaux, R.; Bradley, K.A.; Madler, L.; et al. Use of a rapid cytotoxicity screening approach to engineer a safer zinc oxide nanoparticle through iron doping. *ACS Nano* **2010**, *4*, 15–29. [\[CrossRef\]](#)
35. Strianese, M.; Basile, A.; Mazzone, A.; Morello, S.; Turco, M.C.; Pellicchia, C. Therapeutic potential of a pyridoxal-based vanadium (IV) complex showing selective cytotoxicity for cancer vs. healthy cells. *J. Cell. Physiol.* **2013**, *228*, 2202–2209. [\[CrossRef\]](#)

36. Pérez-Torres, I.; Guarner-Lans, V.; Rubio-Ruiz, M.E. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2098. [\[CrossRef\]](#)
37. Starkov, A.A.; Fiskum, G. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD (P) H redox state. *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 1101–1107. [\[CrossRef\]](#)
38. Soares, S.S.; Gutiérrez-Merino, C.; Aureliano, M. Decavanadate induces mitochondrial membrane depolarization and inhibits oxygen consumption. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 789–796. [\[CrossRef\]](#)
39. Mcausland, T.M.; Vloten, J.P.V.; Santry, L.A.; Guilleman, M.M.; Rghei, A.D.; Ferreira, E.M.; Ingraio, J.C.; Arulanandam, R.; Major, P.P.; Susta, L. Combining vanadyl sulfate with Newcastle disease virus potentiates rapid innate immune-mediated regression with curative potential in murine cancer models. *Mol. Ther. Oncol.* **2021**, *20*, 306–324. [\[CrossRef\]](#)
40. Gopalan, R.C.; Osman, I.F.; Amani, A.; De Matas, M.; Anderson, D. The effect of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the Comet assay with UVA photoactivation of human sperm and lymphocytes. *Nanotoxicology* **2009**, *3*, 33–39. [\[CrossRef\]](#)
41. Xie, H.; Mason, M.M.; Wise, J.P. Genotoxicity of metal nanoparticles. *Rev. Environ. Health* **2011**, *26*, 251–268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Klien, K.; Godnić-Cvar, J. Genotoxicity of Metal Nanoparticles: Focus on In Vivo Studies. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **2012**, *63*, 133–144. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Seabra, A.B.; Pasquôto, T.; Ferrarini, A.C.F.; Santos, M.D.C.; Haddad, P.S.; De Lima, R. Preparation, Characterization, Cytotoxicity, and Genotoxicity Evaluations of Thiolated-and S-Nitrosated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Implications for Cancer Treatment. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 1207–1218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Karlsson, H.L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Moller, L. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1726–1732. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Ahamed, M.; Alhadlaq, H.A.; Alam, J.; Khan, M.A.; Ali, D.; Alarafi, S. Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 6681. [\[CrossRef\]](#)
46. Magdolenova, Z.; Drlickova, M.; Henjum, K.; Runden-Pran, E.; Tulinska, J.; Bilanicova, D.; Pojana, G.; Kazimirova, A.; Baran-cokova, M.; Kuricova, M. Coating-dependent induction of cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles. *Nanotoxicology* **2013**, *9*, 44. [\[CrossRef\]](#)
47. Sharma, V.; Shukla, R.K.; Saxena, N.; Parmar, D.; Das, M.; Dhawan, A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. Lett.* **2009**, *28*, 185. [\[CrossRef\]](#)
48. Weng, Y.; Wang, M.; Liu, W. Repair of experimental alveolar bone defects by tissue-engineered bone. *J. Tissue Eng.* **2006**, *6*, 1503. [\[CrossRef\]](#)
49. Dar, A.; Shachar, M.; Leor, J. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *80*, 305. [\[CrossRef\]](#)
50. Glicklis, R.; Shapiro, L.; Agbaria, R. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 344. [\[CrossRef\]](#)
51. Wang, S.; Wang, X.; Neufurth, M.; Tolba, E.; Schepler, H.; Xiao, S.; Müller, W.E.G. Biomimetic Alginate/Gelatin Cross-Linked Hydrogels Supplemented with Polyphosphate for Wound Healing Applications. *Molecules* **2020**, *25*, 5210. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Ter Horst, B.; Chouhan, G.; Moimen, N.S.; Grover, L.M. Advances in keratinocyte delivery in burn wound care. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *123*, 18–32. [\[CrossRef\]](#)
53. Versteeg, H.H.; Heemskerk, J.W.; Levi, M.; Reitsma, P.H. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 327–358. [\[CrossRef\]](#)
54. Lechtenberg, B.C.; Freund, S.M.; Huntington, J.A. An ensemble view of thrombin allostery. *J. Biol. Chem.* **2012**, *393*, 889–898. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Crawley, J.T.; Zanardelli, S.; Chion, C.K.; Lane, D.A. The central role of thrombin in hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 95–101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Kędzierska, M.; Blilid, S.; Miłowska, K.; Kołodziejczyk-Czepas, J.; Katir, N.; Lahcini, M.; El Kadib, A.; Bryszewska, M. Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled Chitosan Nanocomposite Films. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11386. [\[CrossRef\]](#)
57. Mossman, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [\[CrossRef\]](#)
58. Myhre, O.; Andresen, J.M.; Aarnes, H.; Fonnum, F. Evaluation of the Probes 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate, Luminol, and Lucigenin as Indicators of Reactive Oxygen Species Formation. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1575–1582. [\[CrossRef\]](#)
59. Salvio, S.; Ardizzoni, A.; Franceschi, C.; Cossarizza, A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.* **1997**, *411*, 77–82. [\[CrossRef\]](#)
60. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191. [\[CrossRef\]](#)
61. Blasiak, J.; Kowalik, J. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat. Res.* **2000**, *469*, 135–145. [\[CrossRef\]](#)

Glassy-Like Metal Oxide Particles Embedded on Micrometer Thicker Alginate Films as Promising Wound Healing Nanomaterials

Marta Kedzierska,^{1,*} Nisrine Hammi,² Joanna Kolodziejczyk-Czepas,³ Nadia Katir,² Maria Bryszewska,¹ Katarzyna Milowska,¹ and Abdelkrim El Kadib,^{2,*}

¹ Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland.; marta.kedzierska@biol.uni.lodz.pl (M.K.); maria.bryszewska@biol.uni.lodz.pl (M.B.); katarzyna.milowska@biol.uni.lodz.pl (K.M.)

² Euromed Research Center, Engineering Division, Euro-Med University of Fes (UEMF), Route de Meknes, Rond-point de Bensouda, 30070, Fès, Morocco.; n.hammi@ueuromed.org (N.H.); n.katir@ueuromed.org (N.K.); a.elkadib@ueuromed.org (A.E.K.)

³ Department of General Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland.; joanna.kolodziejczyk@biol.uni.lodz.pl (J.K.-C.)

* Correspondence: marta.kedzierska@biol.uni.lodz.pl; a.elkadib@ueuromed.org

Contents

S1. Experimental section	2
S2. SEM and EDX analysis of alginate-metal oxide films.....	3
S3: DRIFT spectra obtained for alginate-metal oxide films	5
S4: XRD results obtained for alginate-metal oxide films.....	6
S5: TGA results obtained for alginate-metal oxide films.....	7
S6: TEM analysis of alginate-metal oxide solution.....	8

S1. Experimental section

Table S1a: Preparation of Alginate-metal oxide films

Sample	Metal precursors	r_T^a	C (g/L) ^b	TGA residue (%)	r_E^c
Alg@(Ti-O-Ti) _n	Ti(acac) ₂ OiPr ₂	1:1	40	28	1:1.05
Alg@(V-O-V) _n	V(acac) ₃	1:1	40	28	1:1.01
Alg@GeO ₂	Ge(OEt) ₄	1:1	29	34	1:1.06
Alg@ZnO-5:1	Zn (OAc) ₂	5:1	4	-	-
Alg@ZnO-10:1	Zn (OAc) ₂	10:1	2.1	-	-
Alg@ZnO-20:1	Zn (OAc) ₂	20:1	1.05	-	-
Alg@ZnO(Cl)-5:1	ZnCl ₂	5:1	3.1	-	-
Alg@ZnO(Cl)-10:1	ZnCl ₂	10:1	1.5	-	-
Alg@ZnO(Cl)-20:1	ZnCl ₂	20:1	0.7	-	-
Alg@(Fe-O-Fe) _n	Fe(acac) ₃	1:1	40	27	1:1.05

^a: r_T , the theoretical molar ratio of COO:-metal precursor; ^b: C, Concentration of the alcoholic solution of the metal alkoxide precursor (g/L); ^c: r_E , the experimental molar ratio of COO:-metal precursor. The calculation of the molar ratio of Alg@(Ti-O-Ti)_n, Alg@(V-O-V)_n, Alg@GeO₂ and Alg@(Fe-O-Fe)_n was based on the mass residue of TiO₂, VO₂, GeO₂ and Fe₂O₃, respectively, analyzed via TGA under air.

Table S1b: Water-soluble chitosan- coated –metal oxide nanoparticles

7 mg of Alg@(M-O-M)_n films were immersed in aqueous solution and kept under stirring for different periods of time.

Films	Mass (mg)	Solvent	Volume (mL)	Dissolution time (min)
Alg	7	Water	3	<1
Alg@(Ti-O-Ti) _n -1:1	7		3	30
Alg@(V-O-V) _n -1:1	7		3	4
Alg@GeO ₂ -1:1	7		3	2
Alg@(Fe-O-Fe) _n -1:1	7		3	4

S2. SEM and EDX analysis of alginate-metal oxide films

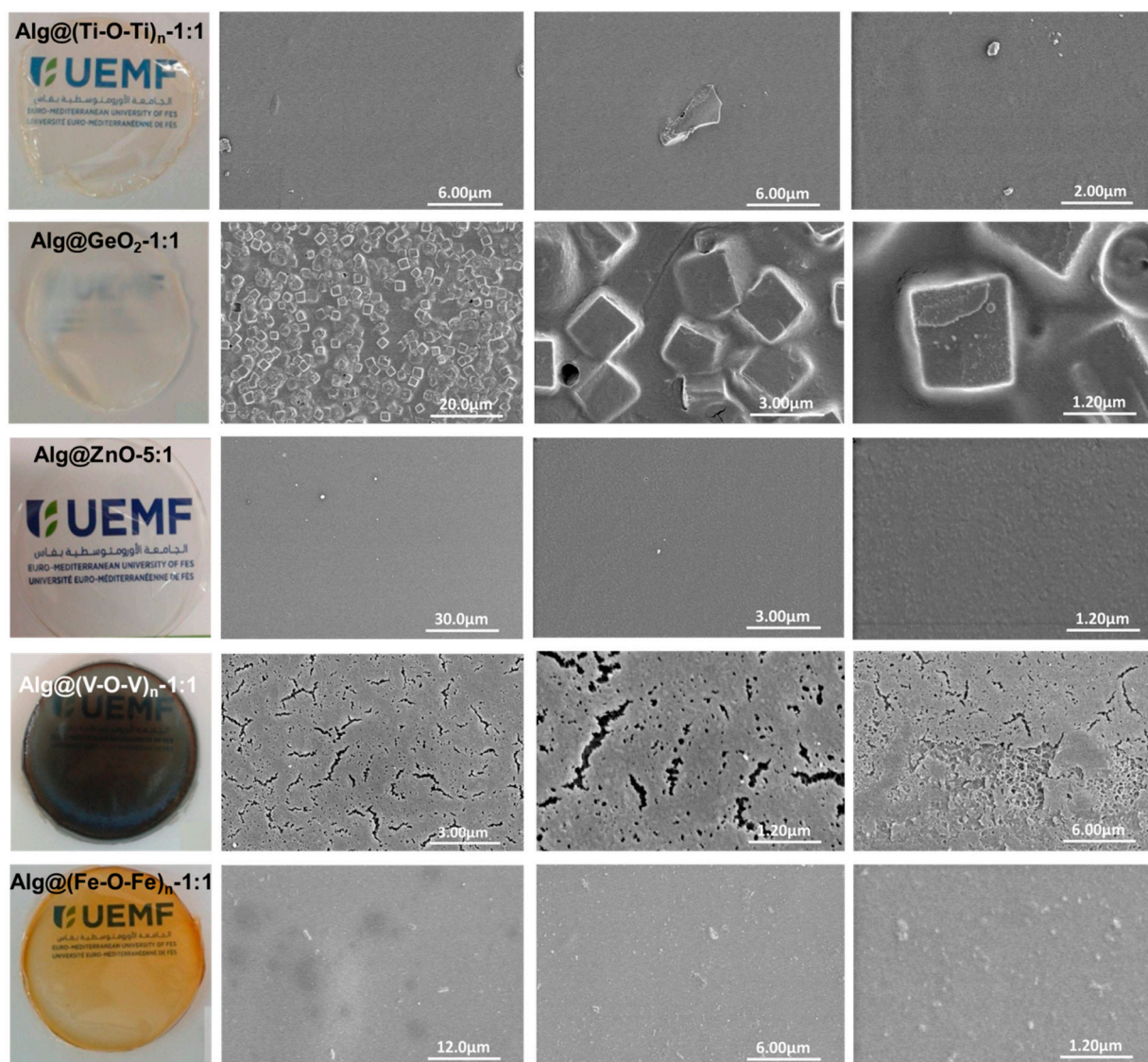


Figure S2a. SEM images obtained for Alg@(M-O-M)_n films

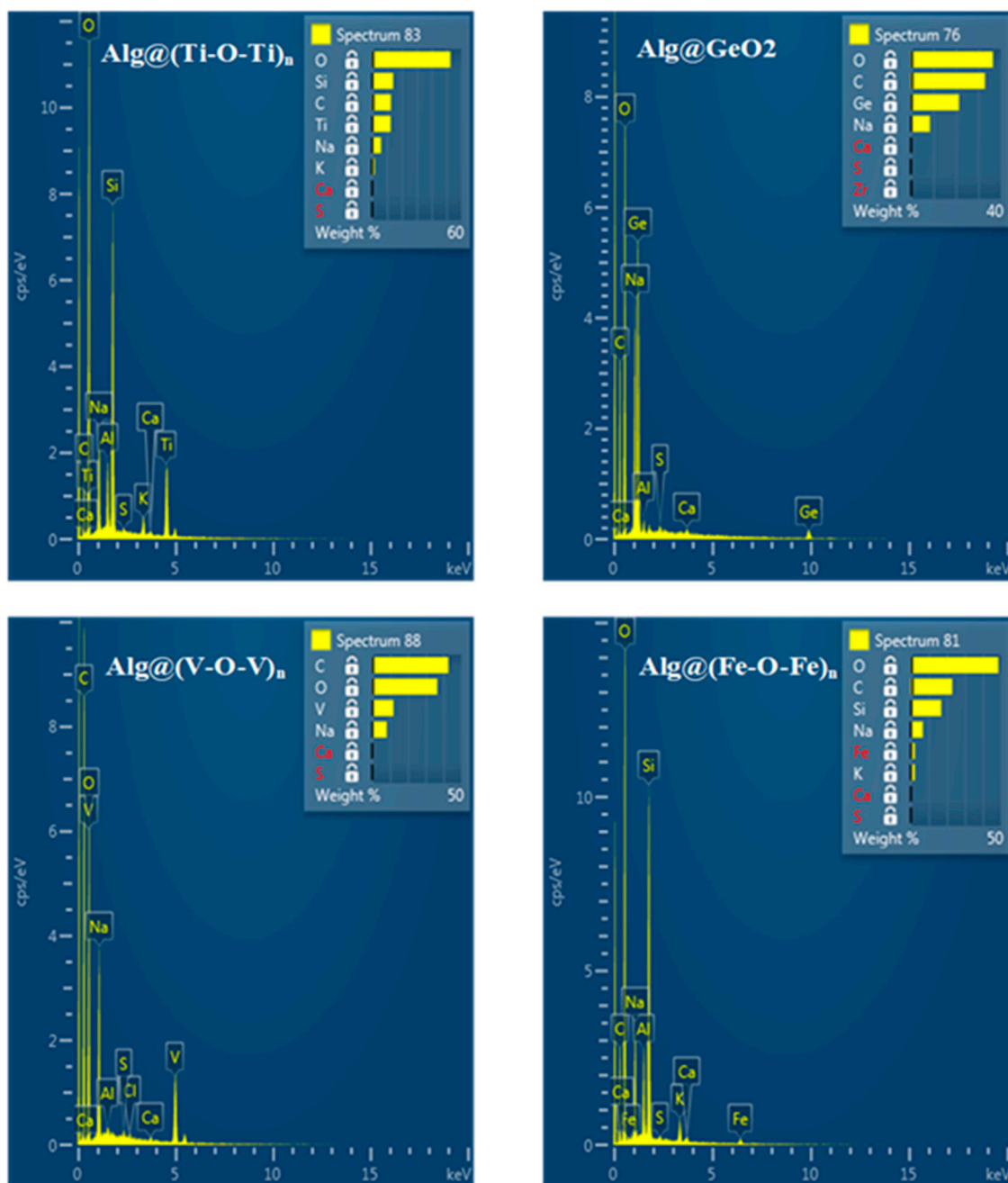


Figure S2b. EDX analysis of Alg@(M-O-M)_n films

S3: DRIFT spectra obtained for alginate-metal oxide films

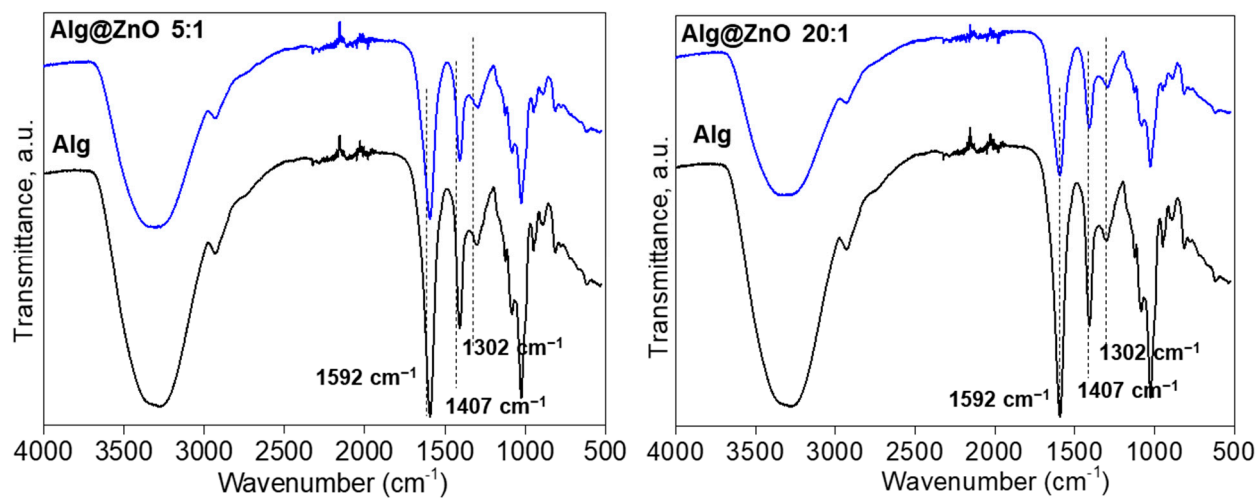


Figure S3. DRIFT spectra obtained for Alg@ZnO films

S4: XRD results obtained for alginate-metal oxide films

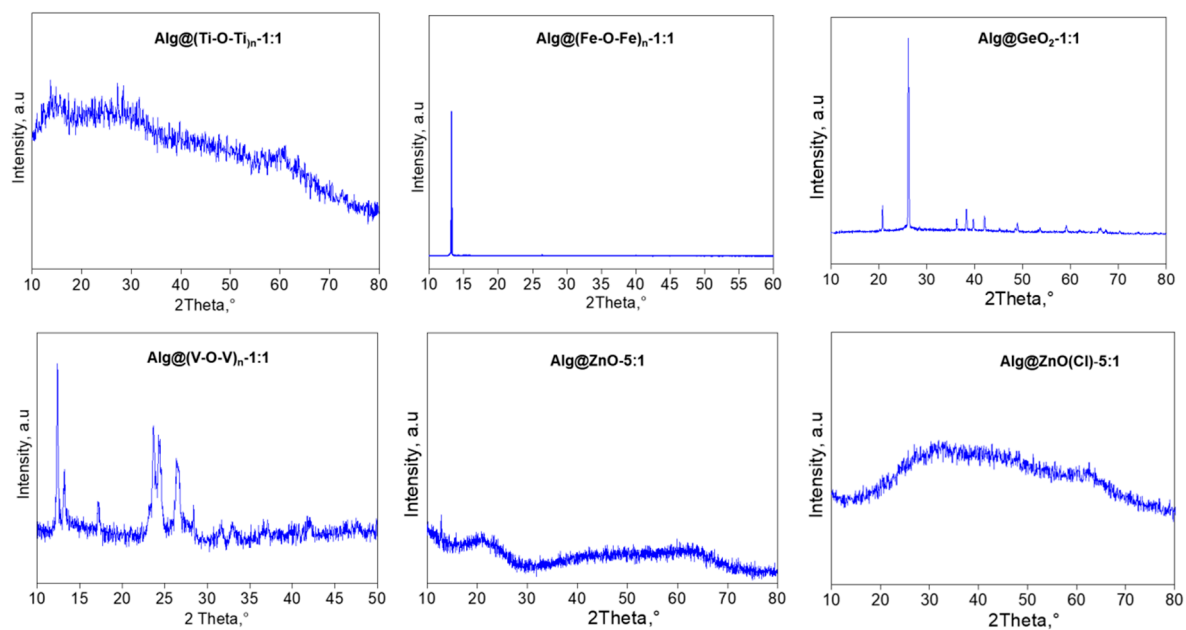


Figure S4. X- ray diffractograms obtained for Alg@(M-O-M)_n films

S5: TGA results obtained for alginate-metal oxide films

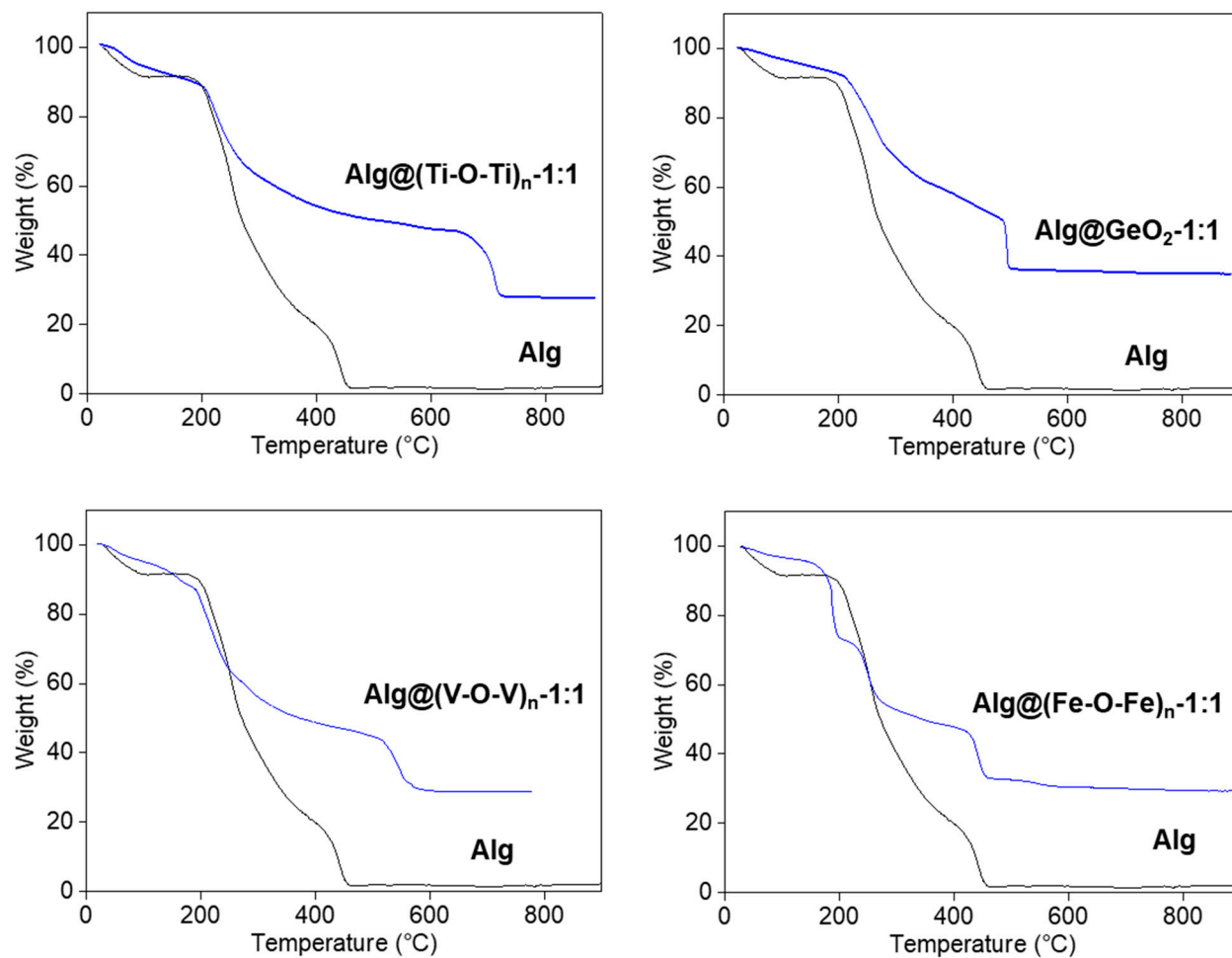
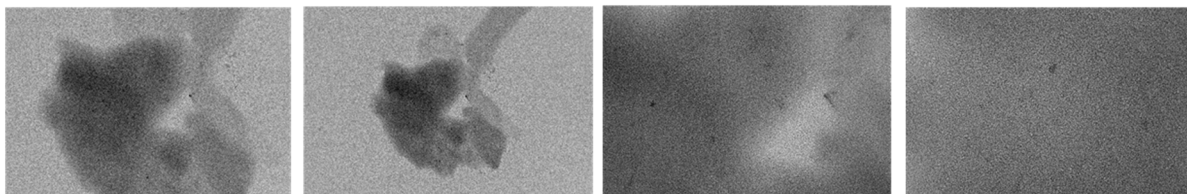


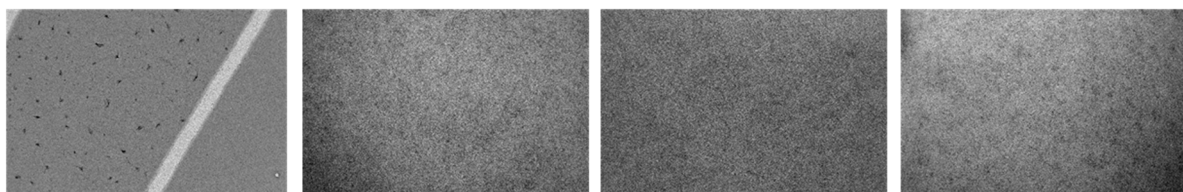
Figure S5. TGA results obtained for alginate-metal oxide Alg@(M-O-M)_n films

S6: TEM analysis of alginate-metal oxide solution

Alg@(Ti-O-Ti)_n-1:1



Alg@(Fe-O-Fe)_n-1:1



Alg@GeO₂-1:1

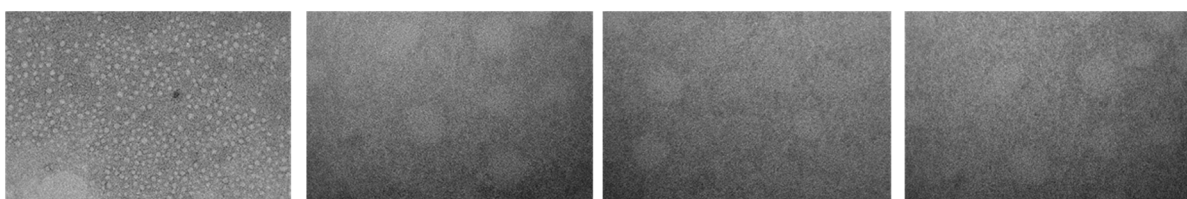


Figure S6. TEM images obtained for Alg@(M-O-M)_n solutions

VII. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PRAC

Mgr Marta Kędzierska
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30.05.2022r.

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna* (2019) Zastosowanie biomateriałów na bazie chitozanu w leczeniu trudno gojących się ran. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 73: 768-781.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale przy tworzeniu koncepcji pracy, zebraniu, analizie i interpretacji zgromadzonej literatury oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu.

Mój udział oceniam na 80 %.



Podpis

Dr hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30.05.2022 ✓

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Kędzierska Marta, **Miłowska Katarzyna*** (2019) Zastosowanie biomateriałów na bazie chitozanu w leczeniu trudno gojących się ran. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 73: 768-781.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale przy tworzeniu koncepcji pracy oraz korekcie merytorycznej przygotowanego tekstu manuskryptu.

Mój udział oceniam na 20 %.

Katarzyna Miłowska

Podpis

Blilid Sara
Euromed Research Center,
Engineering Division,
Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF),
Fès-Shore, Route de Sidi Hrazem, 30070 Fès, Morocco

Fès, 18-05-22.....

Statement of contribution

Applies to publication:

Blilid Sara, Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365.

I declare that my contribution to the publication consisted of the preparation of modified cellulose, chitosan-reinforced films and their characterisation.

I estimate my participation at 25 %.

.....
Signature



Mgr Marta Kędzierska
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 13.12.2021

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Blilid Sara, **Kędzierska Marta**, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale przy tworzeniu koncepcji części biologicznej pracy, współudziale w przygotowaniu wstępu do pracy oraz zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów dotyczących oceny hemotoksyczności kompozytów względem erytrocytów, adsorpcji hemoglobiny do filmów oraz wpływu badanych biomateriałów na stopień utlenienia hemoglobiny i aktywność katalazy. Dokonałam analizy i interpretacji uzyskanych wyników. Ponadto przygotowałam opis materiałów, metod, wyników i dyskusję z części biologicznej i brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów.

Mój udział oceniam na 25 %.



Podpis

Dr hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30.05.2022 r.

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Blilid Sara, Kędzierska Marta, **Miłowska Katarzyna**, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale przy tworzeniu koncepcji części biologicznej pracy oraz na konsultacji naukowej obejmującej interpretację uzyskanych wyników badań.

Mój udział oceniam na 7 %.

.....KikiTonshe.....

Podpis

Dr Natalia Wrońska

Łódź, 24.05.2022 r.

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Uniwersytet Łódzki

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Blilid Sara, Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna, **Wrońska Natalia**, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na wykonaniu oznaczeń mikrobiologicznych oraz opracowaniu i analizie uzyskanych wyników.

Mój udział oceniam na 5 %.

Wrońska Natalia

Podpis



Mounir EL ACHABY
Materials Science and Nano-Engineering (MSN) Department
Mohammed VI Polytechnic University
Lot 660- Hay Moulay Rachid
43150- Benguerir – Morocco
E-mail: mounir.elachaby@um6p.ma
Tel: (+2126) 62010620

Benguerir, May 18, 2022

Statement of contribution

Applies to publication:

Blilid Sara, Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, **El Achaby Mounir**, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365.

I declare that my contribution to the publication consisted of mechanical properties.

I estimate my participation at 4 %.

Signature

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mounir El Achaby', written over a horizontal line.

Katir Nadia

Fès, 05/18/ 2022

Euromed Research Center,
Engineering Division,
Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF),
Fès-Shore, Route de Sidi Hrazem, 30070 Fès, Morocco

Statement of contribution

Applies to publication:

Blilid Sara, Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, **Katir Nadia**, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365.

I declare that my contribution to the publication consisted of characterization of functional cellulose.

I estimate my participation at 4 %.

Nadia KATIR

Signature



Emmanuel Belamie

Montpellier, May 18th 2022

Institut Charles Gerhardt Montpellier,
ICGM, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM,
34296 Montpellier Cedex 5, France,
EPHE, PSL Research University,
75014 Paris, France

Statement of contribution

Applies to publication:

Blilid Sara, Kędzińska Marta, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, **Belamie Emmanuel**, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365

I declare that my contribution to the publication consisted of discussing the results and supervising the manuscript writing. I estimate my participation at 4%.

I estimate my participation at 4 %.



Signature

Alonso Bruno

Montpellier , the 18th of May 2022

Institut Charles Gerhardt Montpellier,
ICGM, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM,
34296 Montpellier Cedex 5, France

Statement of contribution

Applies to publication:

Blilid Sara, Kędzińska Marta, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, **Alonso Bruno**, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365

I declare that my contribution to the publication consisted of discussing the results and supervising the manuscript writing, a task representing about 4% of the work.

Sincerely yours,



.....
Signature

Prof dr hab. Katarzyna Lisowska

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30.05.2021.

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Blilid Sara, Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, **Lisowska Katarzyna**, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na konsultacji naukowej obejmującej interpretację uzyskanych wyników badań mikrobiologicznych.

Mój udział oceniam na 3 %.


.....
Podpis

Lahcini Mohammed

Marrakech 18-05-2022

Laboratory of Organometallic and Macromolecular
Chemistry-Composites Materials, Faculty of Sciences
and Technologies, Cadi Ayyad University,
40000 Marrakech, Morocco;
Chemical & Biochemical Sciences (CBS),
Mohammed VI Polytechnic University (UM6P),
43150 Benguerir, Morocco

Statement of contribution

Applies to publication:

Blilid Sara, Kędzińska Marta, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, **Lahcini Mohammed**, Bryszewska Maria*, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365.

I declare that my contribution to the publication consisted of checking the chemistry part.

I estimate my participation at 4 %.

Signature



Prof dr hab. Maria Bryszewska
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 25/05/2022

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Blilid Sara, Kędzierska Marta, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, **Bryszewska Maria***, El Kadib Abdelkrim* (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(50):18354-18365.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na konsultacji naukowej oraz korekcie językowej pracy.

Mój udział oceniam na 3 %.

.....
Podpis

Prof. Abdelkrim El Kadib
Euro-Mediterranean University of Fez (UEMF),
Route de Meknès. Rond-Point de Bensouda. 30070 Fès, Morocco
E-mail: a.elkadib@ueuromed.org

Prof Abdelkrim El Kadib
Euromed Research Center,
Engineering Division,
Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF),
Fès-Shore, Route de Sidi Hrazem, 30070 Fès, Morocco

Fès, 18-05-2022...

Statement of contribution

Applies to publication:

Blilid Sara, Kędzińska Marta, Miłowska Katarzyna, Wrońska Natalia, El Achaby Mounir, Katir Nadia, Belamie Emmanuel, Alonso Bruno, Lisowska Katarzyna, Lahcini Mohammed, Bryszewska Maria*, **El Kadib Abdelkrim*** (2020) Phosphorylated Micro- and Nanocellulose-Filled Chitosan Nanocomposites as Fully Sustainable, Biologically Active Bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8 (50):18354-18365.

I declare that my contribution to the publication consisted of supervising the material chemistry work.

I estimate my participation at 12 %.


.....
Signature

Mgr Marta Kędzierska
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30.05.2022

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Marta Kędzierska*, Sara Blilid, Katarzyna Miłowska, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Mohammed Lahcini, Abdelkrim El Kadib, Maria Bryszewska. (2021) Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21):11386

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale przy tworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich eksperymentów oraz analizie i interpretacji wszystkich wyników przedstawionych w pracy. Ponadto przygotowałam wersję podstawową wstępu, opis materiałów, metod, wyników i dyskusję. Opracowałam graficznie wyniki badań, zredagowałam tekst manuskryptu i przygotowałam odpowiedzi dla recenzentów.

Mój udział oceniam na 65 %.

.....Marta Kędzierska.....

Podpis

Blilid Sara

Fès, 18-05-22

Euromed Research Center,
Engineering Division,
Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF),
Fès-Shore, Route de Sidi Hrazem, 30070 Fès, Morocco

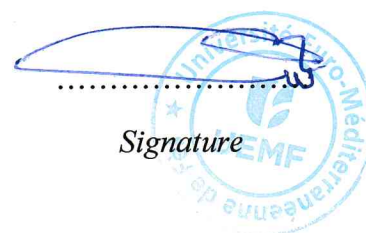
Statement of contribution

Applies to publication:

Marta Kędzierska*, **Sara Blilid**, Katarzyna Miłowska, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Mohammed Lahcini, Abdelkrim El Kadib, Maria Bryszewska. (2021) Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21):11386.

I declare that my contribution to the publication consisted of preparation and characterization of functional cellulose films.

I estimate my participation at 4 %.


.....
Signature

Dr hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30.05.2022 r.

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Marta Kędzierska*, Sara Blilid, **Katarzyna Miłowska**, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Mohammed Lahcini, Abdelkrim El Kadib, Maria Bryszewska. (2021) Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21):11386.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale przy tworzeniu koncepcji pracy oraz pomocy merytorycznej przy pisaniu pracy i interpretacji wyników badań.

Mój udział oceniam na 10 %.

.....K. Miłowska.....

Podpis

Dr hab. Joanna Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30.05.2022.

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Marta Kędzierska*, Sara Blilid, Katarzyna Miłowska, **Joanna Kołodziejczyk-Czepas**,
Nadia Katir, Mohammed Lahcini, Abdelkrim El Kadib, Maria Bryszewska.
(2021) Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-
Chitosan Nanocomposite Films. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21):11386.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na pomocy w zaplanowaniu
części eksperymentów związanych z pomiarem czasów koagulometrycznych oraz pomocy w
interpretacji uzyskanych wyników badań.

Mój udział oceniam na 5 %.

Joanna Kołodziejczyk-Czepas

.....
Podpis

Katir Nadia

Fès, 05/18/ 2022

Euromed Research Center,

Engineering Division,

Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF),

Fès-Shore, Route de Sidi Hrazem, 30070 Fès, Morocco

Statement of contribution

Applies to publication:

Marta Kędzierska*, Sara Blilid, Katarzyna Miłowska, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, **Nadia Katir**, Mohammed Lahcini, Abdelkrim El Kadib, Maria Bryszewska. (2021) Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21):11386.

I declare that my contribution to the publication consisted of preparation and characterization of functional cellulose films.

I estimate my participation at 4 %.

Nadia KATIR

Signature



Lahcini Mohammed

Marrakech 18-05-2022

Laboratory of Organometallic and Macromolecular
Chemistry-Composites Materials, Faculty of Sciences
and Technologies, Cadi Ayyad University,
40000 Marrakech, Morocco;
Chemical & Biochemical Sciences (CBS),
Mohhamed VI Politechnic University (UM6P),
43150 Benguerir, Morocco

Statement of contribution

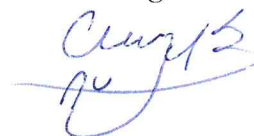
Applies to publication:

Marta Kędzierska*, Sara Blilid, Katarzyna Miłowska, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, **Mohammed Lahcini**, Abdelkrim El Kadib, Maria Bryszewska. (2021) Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21):11386.

I declare that my contribution to the publication consisted of supervising the preparation of cellulose nanocrystals.

I estimate my participation at 4 %.

.....
Signature



Prof. Abdelkrim El Kadib
Euro-Mediterranean University of Fez (UEMF),
Route de Meknès. Rond-Point de Bensouda. 30070 Fès, Morocco
E-mail: a.elkadib@ueuromed.org

Prof Abdelkrim El Kadib
Euromed Research Center,
Engineering Division,
Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF),
Fès-Shore, Route de Sidi Hrazem, 30070 Fès, Morocco

Fès, 18-05-2022

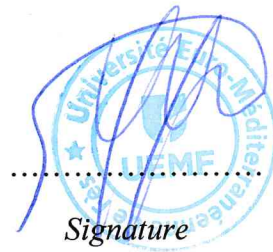
Statement of contribution

Applies to publication:

Marta Kędzierska*, Sara Blilid, Katarzyna Miłowska, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Mohammed Lahcini, **Abdelkrim El Kadib**, Maria Bryszewska.
(2021) Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21):11386.

I declare that my contribution to the publication consisted of writing- review and editing and resources.

I estimate my participation at 5 %.


Signature

Prof dr hab. Maria Bryszewska
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 25.05.2022

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Marta Kędzierska*, Sara Blilid, Katarzyna Miłowska, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Mohammed Lahcini, Abdelkrim El Kadib, **Maria Bryszewska.** (2021) Insight into Factors Influencing Wound Healing Using Phosphorylated Cellulose-Filled-Chitosan Nanocomposite Films. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21):11386.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na konsultacji naukowej oraz korekcie językowej pracy.

Mój udział oceniam na 3 %.


.....
Podpis

Mgr Marta Kędzierska
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30.05.2022

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Marta Kędzierska*, Nisrine Hammi, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Maria Bryszewska, Katarzyna Miłowska, Abdelkrim El Kadib*. (2022) Glassy- like metal oxide particles embedded on micrometer thicker alginate films as promising wound healing nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5585.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale przy tworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich eksperymentów z części biologicznej oraz ich analizie i interpretacji. Ponadto przygotowałam wersję podstawową wstępu, opis materiałów, metod, wyników i dyskusję. Opracowałam graficznie wyniki badań, zredagowałam tekst manuskryptu i przygotowałam odpowiedzi dla recenzentów.

Mój udział oceniam na 50 %.

.....Marta Kędzierska.....

Podpis

Nisrine Hammi

Fès, 18/05/2022

Euromed Research Center,

Engineering Division,

Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF),

Fès-Shore, Route de Sidi Hrazem, 30070 Fès, Morocco

Statement of contribution

Applies to publication:

Marta Kędzińska*, **Nisrine Hammi**, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Maria Bryszewska, Katarzyna Miłowska, Abdelkrim El Kadib*. (2022) Glassy- like metal oxide particles embedded on micrometer thicker alginate films as promising wound healing nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5585.

I declare that my contribution to the publication consisted of preparation and characterization of functional alginate films.

I estimate my participation at 10 %.



Dr hab. Joanna Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30.05.2022

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Marta Kędzierska*, Nisrine Hammi, **Joanna Kołodziejczyk-Czepas**, Nadia Katir, Maria Bryszewska, Katarzyna Miłowska, Abdelkrim El Kadib*. (2022) Glassy- like metal oxide particles embedded on micrometer thicker alginate films as promising wound healing nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5585.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na pomocy w zaplanowaniu części eksperymentów związanych z pomiarem czasów koagulometrycznych oraz pomocy w interpretacji uzyskanych wyników badań.

Mój udział oceniam na 5 %.

Joanna Kołodziejczyk-Czepas

.....
Podpis

Katir Nadia

Fès, 05/18/ 2022

Euromed Research Center,
Engineering Division,
Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF),
Fès-Shore, Route de Sidi Hrazem, 30070 Fès, Morocco

Statement of contribution

Applies to publication:

Marta Kędzierska*, Nisrine Hammi, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, **Nadia Katir**, Maria Bryszewska, Katarzyna Miłowska, Abdelkrim El Kadib*. (2022) Glassy- like metal oxide particles embedded on micrometer thicker alginate films as promising wound healing nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5585.

I declare that my contribution to the publication consisted of preparation and characterization of functional alginate films.

I estimate my participation at 5 %.

Nadia KATIR
Signature



Prof dr hab. Maria Bryszewska
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 25/05/2022

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Marta Kędzierska*, Nisrine Hammi, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, **Maria Bryszewska**, Katarzyna Miłowska, Abdelkrim El Kadib*. (2022) Glassy- like metal oxide particles embedded on micrometer thicker alginate films as promising wound healing nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5585.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na konsultacji naukowej oraz korekcie językowej pracy.

Mój udział oceniam na 5 %.


.....
Podpis

Dr hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30.05.2022r.

Oświadczenie współautora

Dotyczy publikacji:

Marta Kędzierska*, Nisrine Hammi, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Maria Bryszewska, **Katarzyna Miłowska**, Abdelkrim El Kadib*. (2022) Glassy- like metal oxide particles embedded on micrometer thicker alginate films as promising wound healing nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5585.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale przy tworzeniu koncepcji pracy oraz pomocy merytorycznej przy pisaniu pracy i interpretacji wyników badań.

Mój udział oceniam na 10 %.

...K. Miłowska...

Podpis

Prof. Abdelkrim El Kadib
Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF),
Route de Meknès. Rond-Point de Bensouda. 30070 Fès, Morocco
E-mail: a.elkadib@ueuromed.org

Prof Abdelkrim El Kadib

Fès, 18-05-2022

Euromed Research Center,
Engineering Division,
Euro-Mediterranean University of Fes (UEMF),
Fès-Shore, Route de Sidi Hrazem, 30070 Fès, Morocco

Statement of contribution

Applies to publication:

Marta Kędzierska*, Nisrine Hammi, Joanna Kołodziejczyk-Czepas, Nadia Katir, Maria Bryszewska, Katarzyna Miłowska, **Abdelkrim El Kadib***. (2022) Glassy- like metal oxide particles embedded on micrometer thicker alginate films as promising wound healing nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5585.

I declare that my contribution to the publication consisted of writing- review and editing and resources.

I estimate my participation at 15 %.

.....
Signature

