

Oponentský posudek disertační práce

Autor: Ing. Iveta Danilová,
Fakulta textilní, TUL Liberec

Název: Vývoj nanovláknenných nosičů pro bimedické aplikace

Doktorská práce Ivety Danilové je zaměřena na problematiku imobilizace enzymů na křemičitá nanovláknna a následné využití imobilizovaných enzymů k odstraňování nekrotické tkáně. V této souvislosti autorka věnovala pozornost různým způsobům imobilizace, konkrétním enzymům a to v širších souvislostech (např. testování cytotoxicity finálních produktů).

Vlastní práce má tradiční strukturu (teoretická část, praktická část, výsledky a diskuse, seznam použité literatury). Do teoretické části autorka zařadila vstupní informace ke způsobům odstraňování nekrotické tkáně, chirurgickým způsobem počínaje a enzymatickým konče. Protože chirurgický způsob je účinný, ale bolestivý, je věnována pozornost šetrnějším postupům, mezi které enzymatická metoda nepochybně patří. Autorka se dále soustředila na proteolytické enzymy v souvislosti se štěpením peptidické vazby. Teoretická část práce obsahuje též informace o možnostech imobilizace enzymů a různých typech substrátu, především na bázi nanovláken.

S tímto také souvisí struktura praktické části doktorské práce, jak ukazují názvy jednotlivých kapitol (Křemičitá nanovláknna a vliv teploty stabilizace na jejich vlastnosti, Úprava povrchu nanovláken, Imobilizace proteolytických enzymů apod.). Autorka sleduje řadu dalších faktorů, vztahujících se k testování proteolytické aktivity enzymů, testování stability nanovláken s imobilizovanými enzymy aj. Završením práce jsou pak *in vitro* testy realizované se zkoumanými materiály na prasečí kůži. Jedná se o široce pojatý průzkum dané problematiky, který naznačuje perspektivy a další směřování vědecké činnosti v uvedené oblasti, k čemuž se autorka vyjadřuje v kapitole Doporučení na pokračování ve výzkumu. Mezi výstupy náleží např. použití trypsinu z hovězího pankreatu, metoda úpravy nanovláken pomocí DSC (negativní testy na cytotoxicitu). Autorka též navrhla vhodnou metodu sterilizace vzorků.

Pokud jde o vlastní zpracování doktorské práce, odpovídá požadavkům, kladeným na tento typ prací, text je doplněn řadou přehledných tabulek a názorných obrázků. Některé drobné nedostatky, např. z oblasti chemické terminologie, autorka sama komentuje v kapitole Diskuze a závěr. K disertační práci mám tyto dotazy:

- 1) Jaký význam má použití karbodiimidů při imobilizaci?
- 2) S jakým vymezením tématu se počítá do budoucna?

Disertační práce Ivety Danilové přináší řadu cenných poznatků a svědčí o nevšedním zaujetí autorky pro výzkum uvedené problematiky. Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.



prof. Ing. Karel Kolář, CSc.
Katedra chemie a didaktiky chemie
Pedagogická fakulta UK
Praha

Oponentský posudek disertační práce.

Autor práce: Ing. Iveta Danilová, provdaná Zvercová.

Název práce: *Vývoj nanovláknenných nosičů pro biomedicinské aplikace.*

Předložená disertační práce řeší stále aktuální problém, jakým je odstranění – uvolnění nekrotické tkáně z hojících se ran např. při popáleninách, nebo z obtížně hojitelných ran (proleženiny, event. diabetické vředy apod.). Obecně se ale jedná o tzv. debridement, tj. odstranění nekrotické tkáně, ale také tkáně adherované nebo kontaminované.

Jako vhodný způsob řešení je předložen výzkum a laboratorní vývoj krytu rány z křemičitých nanovláken s imobilizovaným proteolytickým enzymem.

V teoretické části jsou shrnuty základní poznatky o způsobech debridementu, následně se zaměřením na enzymatický debridement, kde následuje diskuse o vhodných typech enzymů pro toto použití a přehled způsobů vazby – imobilizace – enzymů na vhodném nosiči.

Praktická část disertační práce začíná výrobou křemičitých vláken a vlivem jejich tepelného zpracování na vlastnosti připravených nanovláken – především biokompatibilitu, která je v tomto konkrétním případě hodnocena na základě rozpustnosti tohoto typu nanovláknů ve fyziologickém roztoku. Následovala modifikace povrchu křemičitanových nanovláken různými typy alkoxysilanů, z nichž jako nejvhodnější se ukázal (3-aminopropyl)triethoxysilan (APTES), který byl použit v dalších experimentech. Následovala funkcionizace aminoskupiny APTES pro reakci s aminoskupinou enzymu – jako proteinu – pro jeho imobilizaci na nosném substrátu. Byly použity tři metody funkcionizace, z nichž jako perspektivní se jeví metoda označená jako B-DSC – funkcionizace sukcinanhydridem a disuccinimidyl karbonátem. Nevhodnost první funkcionizace označené jako A-EDC se ukázala až při testech cytotoxicity, kterým musí být podrobeny všechny obdobné materiály, které přicházejí do kontaktu s živou tkání. Imobilizováno bylo 7 typů proteolytických enzymů, které byly dále testovány na proteolytickou aktivitu také v závislosti na hodnotě pH a teplotě prostředí, kdy se ukázala také nevhodnost některých typů enzymů pro další výzkum. Následovala sterilizace vzorků, jako nezbytný předpoklad pro medicínské použití produktů. Zde bylo dosaženo také řady zajímavých poznatků – především při sterilizaci vhodným typem UV záření. Pro sterilizaci krytu rány jako takového však musí být použito kombinace klasických postupů s kombinací sterilizací pomocí filtrace kapalin. Následovalo testování cytotoxicity vyrobených materiálů in vitro. Také byla testována rozpustnost nanovláken s enzymy, příp. sledována změna hodnoty pH. Práce je doplněna orientačními in vitro testy na prasečí kůži. Výsledky těchto testů vcelku korelují s testy proteolytické aktivity enzymů (kap. 3.4). V kapitole 4. – Výsledky jsou některé výsledky a testování popsané v předchozích kapitolách zpracovány pomocí statistického programu.

K práci mám některé dotazy a připomínky, které je možno prodiskutovat v rámci obhajoby.

1. V úvodu měly být definovány cíle předložené práce. Ty jsou postupně upřesňovány v průběhu řešení v jednotlivých kapitolách na základě dosažení konkrétních výsledků.
2. Při výrobě křemičitých nanovláken (kap. 3.1.) je zdůrazněn význam tepelné stabilizace po zvlákňování na vlastnosti těchto vláken, včetně jejich biokompatibility. K jakým chemickým a strukturním změnám dochází ve vláknech v průběhu této tepelné stabilizace? Mají tato nanovlákná po stabilizaci spíše charakter vláken anorganických, nebo organosilikátů? Získaná vrstva křemičitých nanovláken byla samonosná, nebo bylo třeba použít vhodnou podložku – nosič této vrstvy? Byla tato nanovláknenná vrstva testována (bez vázaných nebo vázaných biologicky aktivních látek) in vivo na laboratorních zvířatech?
3. Bylo by možno nějakým způsobem určit množství (výťažnost) enzymu na vrstvě nanovláken při jeho chemické reakci s upraveným povrchem křemičitanového nanovlákná? Dochází při aplikaci produktu k uvolnění chemicky vázané molekuly enzymu? Je vhodné ve schématech na obr. 16. – 18. naznačovat vazbu nosiče a enzymu s použitím kvarterního dusíku?
4. Na str. 65 je údaj: EDTA inhibuje aktivitu velké řady proteolytických enzym. Jaká je příčina této inhibice?
5. Jakým způsobem byla získána a charakterizována prasečí kůže pro testy in vitro (kap. 3.10.)?
6. Jistě by bylo zajímavé v naznačeném vývoji produktů s imobilizovanými enzymy pokračovat, jak je doporučeno i v kap. 5. Diskuze a závěr (kap. 6) měly být více konkrétní – zdůraznit ty úspěšné varianty a směr řešení, který by vedl k přípravě vzorků, které by bylo možno otestovat in vivo na modelových ranách (popáleninách) laboratorních zvířat.

Celkově je disertační práce zpracována na velmi dobré odborné i formální úrovni za použití moderních analytických i jiných laboratorních metod a postupů testování. Získané výsledky je možno použít jako základ pro pokračování výzkumu v naznačeném směru.

Disertační práce představuje velký objem dobře provedené a vyhodnocené experimentální práce. Oprávněnost výzkumu směrem použití nanovláken na křemičitanové bázi s imobilizovanými organickými sloučeninami potvrzují patenty na jejich výrobu – patentováno v ČR i světový patent (WO 2014026656 A1) školitelky předložené práce doc. Lovětinské - Šlamborové a kolektivu.

Doktorandka prokázala schopnost samostatné a systematické vědecké práce. Určité stupně řešení daného problému jsou doktorandkou zpracovány ve dvou publikacích, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Je rovněž spoluautorkou článku ve Zdravotnických listech 2014(2),6-13.

Práce splňuje všechny nároky na ni kladené, doporučuji ji k obhajobě.



doc. Ing. Ladislav Burgert, CSc.

Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek.

Fakulta chemicko-technologická.

Univerzita Pardubice.

Pardubice, 6. ledna 2021.